

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



**MODULACE REZISTENCE NÁDOROVÝCH BUNĚK  
PROSTŘEDNICTVÍM INHIBICE VYBRANÝCH LIDSKÝCH  
KARBONYLREDUKTÁZ TYROSINKINÁZOVÝMI INHIBITORY**

**Disertační práce**

Mgr. Lucie Čermáková

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

Hradec Králové, 2024

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele prof. Ing. Vladimíra Wsóla, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové, dne

Mgr. Lucie Čermáková

## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za veškerou pomoc, cenné rady a podnětné připomínky po celou dobu mého doktorského studia.

Velké poděkování patří také RNDr. Bc. Evě Novotné, Ph.D., která mě provedla pregraduálním studiem a v doktorském studiu se stala mou nejbližší kolegyní. Díky jejím zkušenostem a ochotě přispěchat na pomoc jsem úspěšně překonávala úskalí vědecké činnosti. Mé veliké poděkování náleží rovněž doc. RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D., za obrovskou pomoc na začátku mého doktorského studia, a Anselmu Morell García, Ph.D., za obohacující zahraniční příležitost, odborné a přátelské vedení, cenné rady a čas strávený při práci v laboratoři.

Poděkování náleží také všem kolegům z katedry biochemických věd za vytvoření příjemného pracovního prostředí, za nezištnou vědeckou pomoc a spolupráci, a zvláště kolegyním z naší kanceláře za přátelskou atmosféru a ochotu mi pomoci s čímkoliv.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (grant č. 315221) a Univerzitě Karlově (granty č. SVV 260 550 a SVV 260 664).

Největší poděkování směřuje mé rodině, partnerovi a přátelům za jejich neustálou podporu během celého studia.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Mgr. Lucie Čermáková

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

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

Název disertační práce: Modulace rezistence nádorových buněk prostřednictvím inhibice vybraných lidských karbonylreduktáz tyrosinkinázovými inhibitory

Vývoj rezistence na antracyklinová antibiotika (ANT), vysoce účinné chemoterapeutické látky, představuje v oblasti léčby rakoviny významný problém. Rezistence k ANT je kromě jiných mechanismů zprostředkována aktivitou karbonylredukcujících enzymů (CRE) z nadrodiny aldo-ketoreduktáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Tyto enzymy přeměňují ANT na méně aktivní alkoholové metabolity, čímž snižují jejich terapeutickou účinnost. Kromě toho přispívají k rezistenci efluxní ATP-binding cassette (ABC) transportéry, které aktivně odčerpávají ANT z nádorových buněk, čímž snižují jejich intracelulární koncentrace.

Inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy (BTKi) představují nový přístup k překonání rezistence na ANT. V klinických studiích byly BTKi testovány samostatně nebo v kombinaci se standardní chemoterapií zahrnující ANT. Náš výzkum se zaměřuje na hodnocení potenciálu BTKi (akalabrutinib, ACA; ibrutinib, IBR; tirabrutinib, TIR; zanubrutinib, ZAN) inhibovat vybrané CRE (CBR1, AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2) a potencovat účinky daunorubicinu (DAUN) v nádorových buňkách.

V experimentální části byl zkoumán inhibiční potenciál vybraných BTKi na aktivitu příslušných rekombinantních CRE deaktivujících DAUN na jeho metabolit daunorubicinol (DAUN-OL). Ze všech studovaných CRE všechny BTKi vykazovaly nejvyšší inhibiční potenciál pro AKR1C3, zatímco ostatní studované reduktázy byly inhibovány nevýznamně. Tento inhibiční účinek byl ověřen také na buněčné úrovni pomocí buněčné linie HCT116 tranzientně transfekované AKR1C3. Všechny BTKi účinně inhibovaly aktivitu AKR1C3 v intaktních buňkách. Následné studie zkoumaly

účinek kombinace DAUN s vybranými BTKi na úrovni nádorových buněčných linií s tranzientní nebo endogenní expresí AKR1C3.

Po kvantitativní analýze vztahu dávka/účinek vykazovaly všechny vybrané BTKi synergický účinek s DAUN a významně zvyšovaly cytotoxický účinek DAUN na nádorové buňky s tranzientní nadměrnou expresí AKR1C3. Tento synergický účinek byl ověřen na buněčné linii A549 s endogenní expresí AKR1C3. Kombinace DAUN s BTKi (ACA, IBR, ZAN) vedly ke snížení účinné dávky DAUN a zlepšení synergických parametrů v závislosti na dávce BTKi. Za účelem zjištění, zda je synergický účinek kombinace DAUN s vybranými BTKi (TIR, ZAN) ovlivněn změnami v expresi AKR1C3, byly zkoumány možné změny v hladinách mRNA AKR1C3. Výsledky nenaznačily žádnou upregulaci mRNA AKR1C3. Dále byl zkoumán vliv vybraných BTKi (TIR, ZAN) na efluxní aktivitu ABC transportérů. Oba BTKi významně inhibovaly ABC transportéry (ABCB1, C1 a G2), což naznačuje další mechanismus boje proti rezistenci na ANT.

Naše zjištění naznačují, že BTKi mohou sloužit jako účinné modulátory rezistence vůči ANT. Kombinovaná terapie představuje slibný přístup ke zlepšení klinických výsledků léčby nádorových onemocnění založené na ANT.

# ABSTRACT

Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Lucie Čermáková

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

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

Title of Doctoral Thesis: Modulation of cancer cell resistance through inhibition of selected human carbonyl reductases by tyrosine kinase inhibitors

In cancer therapy, developing resistance to anthracycline antibiotics (ANTs), highly effective chemotherapeutic agents, poses a significant challenge. Besides other mechanisms, ANT resistance is mediated through the activity of carbonyl reducing enzymes (CREs) from the superfamily of aldo-ketoreductases (AKRs) and short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). These enzymes convert ANTs into less active alcohol metabolites, reducing their therapeutic efficacy. In addition, ATP-binding cassette (ABC) efflux transporters contribute to resistance by actively pumping ANTs out of cancer cells, thereby reducing their intracellular concentrations.

Bruton's tyrosine kinase inhibitors (BTKis) represent a novel approach to overcoming ANT resistance. In clinical trials, BTKis have been tested alone or in combination with ANT-containing standard chemotherapy. Our research focuses on evaluating the potential of BTKis (acalabrutinib, ACA; ibrutinib, IBR; tirabrutinib, TIR; zanubrutinib, ZAN) to inhibit selected CREs (CBR1, AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2), and to potentiate the effects of daunorubicin (DAUN) in cancer cells.

In the experimental part, the inhibitory potential of selected BTKis on the activity of the respective recombinant CREs and the reductive conversion of DAUN to its metabolite daunorubicinol (DAUN-OL) was investigated. Of all the CREs studied, all BTKis showed the highest inhibitory potential for AKR1C3, whereas the other studied reductases were inhibited insignificantly. This inhibitory effect was verified at the cellular level using the HCT116 cell line transiently transfected with AKR1C3. All BTKis effectively inhibited AKR1C3 activity in intact cells. Subsequent studies investigated the effect of combining DAUN with selected BTKis at the level of cancer cell lines with

transient or endogenous expression of AKR1C3. After quantitative analysis of dose-response relationships, all selected BTKis exhibited a synergistic effect with DAUN, significantly enhancing the cytotoxic effect of DAUN on cancer cells transiently overexpressing AKR1C3. This synergistic effect was verified in the A549 cell line with endogenous expression of AKR1C3. Combinations of DAUN with BTKis (ACA, IBR, ZAN) led to a decrease in the effective dose of DAUN and an improvement in the synergistic parameters as a function of the dose of BTKi. To assess whether the synergistic effect of combining DAUN with selected BTKis (TIR, ZAN) is affected by changes in AKR1C3 expression, potential alterations in AKR1C3 mRNA levels were investigated. The results indicated no upregulation of AKR1C3 mRNA. Furthermore, the effect of selected BTKis (TIR, ZAN) on the efflux activity of ABC transporters was investigated. Both BTKi significantly inhibited ABC transporters (ABCB1, C1, and G2), suggesting an additional mechanism to combat ANT resistance.

Our findings suggest that BTKis may effectively modulate ANT resistance by targeting multiple resistance mechanisms. Combination therapy represents a promising approach to improving clinical outcomes in ANT-based cancer treatment.

# OBSAH

1	Úvod.....	11
2	Nádorová onemocnění .....	12
2.1	Protinádorová terapie .....	12
2.1.1	Konvenční protinádorová chemoterapie.....	13
2.1.1.1	Antracyklinová antibiotika .....	14
2.1.2	Cílená protinádorová terapie .....	17
2.1.2.1	Inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy .....	19
2.1.2.1.1	Ibrutinib .....	21
2.1.2.1.2	Akalabrutinib .....	23
2.1.2.1.3	Zanubrutinib .....	24
2.1.2.1.4	Tirabrutinib .....	24
2.1.2.1.5	Další BTKi v klinických studiích .....	26
2.2	Léková Rezistence .....	27
2.2.1	Biotransformační enzymy .....	29
2.2.1.1	Karbonyl redukující enzymy .....	30
2.2.1.1.1	Dehydrogenázy/Reduktázy se středně dlouhým řetězcem ..	31
2.2.1.1.2	Dehydrogenázy/Reduktázy s krátkým řetězcem .....	31
2.2.1.1.3	Aldo-ketoreduktázy .....	33
3	Cíle disertační práce.....	37
4	Materiál a metody .....	38
4.1	Chemikálie a reagenty .....	38
4.2	Stanovení metabolismu DAUN rekombinantními CRE .....	38
4.3	Kvantifikace hlavního metabolitu DAUN-Olu pomocí UHPLC .....	39
4.4	Buněčné kultury .....	40
4.5	Přechodná transfekce buněk HCT116.....	40
4.6	Inhibiční studie.....	40
4.7	Kombinační studie .....	41
4.8	Indukční studie .....	42
4.9	Akumulační studie .....	43



4.10	Statistická analýza .....	43
5	Výsledky .....	44
5.1	Akalabrutinib a ibrutinib a jejich vliv na aktivitu reduktáz přeměňujících DAUN na DAUN-OL .....	44
5.1.1	ACA a IBR inhibují redukci DAUN zprostředkovanou reduktázami z nadrodin AKR a SDR .....	44
5.1.2	Inhibitory BTK působí proti rezistenci léčby DAUN prostřednictvím inhibice AKR1C3 v buněčné linii HCT116 .....	47
5.1.3	BTKi synergizují cytotoxicitu DAUN v nádorové buněčné linii A549 .....	51
5.2	Zanubrutinib a jeho inhibiční potenciál k reduktázám z nadrodin AKR a SDR .....	53
5.2.1	ZAN inhibuje redukci DAUN zprostředkovanou reduktázami z nadrodin AKR a SDR .....	53
5.2.2	Vliv ZAN na rezistenci k léčbě DAUN v buněčné linii HCT116 .....	54
5.2.3	ZAN překonává rezistenci vůči DAUN v buněčné linii A549 .....	56
5.2.4	ZAN zvyšuje akumulaci DAUN inhibicí efluxní aktivity ABC transportérů .....	57
5.2.5	ZAN neovlivňuje expresi AKR1C3 .....	58
5.3	Tirabrutinib a jeho schopnost inhibovat reduktázy přeměňující DAUN na DAUN-OL .....	60
5.3.1	Interakce TIR s reduktázami z nadrodin AKR a SDR .....	60
5.3.2	TIR synergizuje s DAUN a překonává rezistenci na léčbu ANT prostřednictvím inhibice AKR1C3 .....	61
5.3.3	TIR nemá žádný vliv na intracelulární hladiny exprese AKR1C3 .....	64
5.3.4	TIR zvyšuje intracelulární hladinu DAUN v intaktních buňkách .....	64
6	Diskuse .....	66
7	Závěr .....	71
8	Zkratky .....	73
9	Podíl autorky na publikacích zahrnutých v disertační práci .....	76
10	Podíl autorky na publikacích nevztahujících se k tématu disertační práce ..	77
11	Konference .....	78

11.1	Ústní prezentace .....	78
11.2	Posterové prezentace .....	78
12	Seznam použité literatury .....	79
13	Přílohy .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
13.1	Seznam publikací zahrnutých v disertační práci	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

# 1 ÚVOD

Léková rezistence představuje významnou výzvu v moderní medicíně. Tento jev může být způsoben širokou škálou biochemických a fyziologických mechanismů, které vedou ke snížení účinnosti léčiv a odolávání buněk farmaceutickým zásahům. Rezistence se vyskytuje u různých typů infekcí, včetně bakteriálních, virových, plísňových a parazitárních onemocnění. Rezistence na antibiotika je jednou z nejkritičtějších oblastí zájmu, protože některé bakteriální kmeny si dokázaly vyvinout rezistenci vůči více antibiotikům, což představuje vážné komplikace v léčbě (Davies & Davies, 2010). Rovněž v terapii nádorových onemocnění představuje rozvoj lékové rezistence hlavní překážkou úspěšné léčby. Nádorová onemocnění patří mezi nejzávažnější zdravotní komplikace a v roce 2020 byla příčinou bezmála 10 milionů úmrtí (Sung et al., 2021). I v tomto případě rezistence nastává, když si nádorové buňky vyvinou obrané mechanismy, které vedou ke snížení účinnosti terapie. Mezi tyto mechanismy patří např. mutace cílových proteinů, eflux léčiv prostřednictvím lékových transportérů nebo aktivita biotransformačních enzymů. Celosvětově incidence nádorových onemocnění stále narůstá, což představuje obrovskou fyzickou a emocionální zátěž pro jednotlivce a finanční zátěž pro zdravotní systémy. Pochopení a překonání mechanismů rezistence je zásadní pro zvýšení účinnosti léčby nádorových onemocnění a zlepšení klinických výsledků pacientů.

## 2 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nádorová onemocnění jsou různorodou skupinou chorob, která může postihovat jakýkoliv orgán nebo tkáň v lidském těle. Za normálních podmínek podléhají buňky cyklické obnově, která je pod kontrolou řady mechanismů. Charakteristickým rysem nádorového onemocnění je selhání v těchto kontrolních mechanismech, které vedou k nekontrolovatelné autonomní proliferaci abnormálních buněk, jejich migraci a rezistenci vůči apoptóze. Takto změněné buňky mohou napadat okolní tkáň a šířit se do dalších orgánů (metastazování) (Zámečník, 2019).

Mechanismy vzniku nádorových onemocnění jsou poměrně komplexní. Nádorová onemocnění jsou řazena mezi genetická onemocnění polygenního charakteru. Vznikají ve vícestupňovém procesu přeměnou normálních buněk na nádorové buňky. Postupně dochází k celé řadě získaných somatických mutací v genech kontrolujících buněčný cyklus a diferenciaci (protoonkogeny a supresorové geny), v genech regulujících apoptózu a v genech zodpovědných za reparaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Motofei, 2018; Zámečník, 2019).

Tyto mutace mohou vznikat působením různých chemických karcinogenů či záření, endogenních faktorů (volné kyslíkové radikály), tak i enviromentálních mutagenů. Nejčastěji však vznikají spontánně v důsledku chyb při replikaci a reparaci DNA. Izolované mutace jednoho genu zpravidla nevedou k rozvoji maligní transformace buňky. Aby se buňka zvrhla v nádorovou, musí se v ní nahromadit více genetických změn (Seyfried & Huysentruyt, 2013).

Významným mechanismem podílejícím se na karcinogenezi jsou epigenetické modifikace genové exprese. Nejčastěji se uplatňuje metylace DNA, při které dochází k zastavení či obnově transkripce genu i bez změny jeho sekvence DNA, dále posttranslační modifikace histonů (např. acetylace, metylace nebo fosforylace). Důležitou roli v regulaci genové exprese zastávají ribonukleová kyselina (RNA) interference, zejména mikroRNA (Chik et al., 2011).

### 2.1 Protinádorová terapie

Na počátku 20. století byla léčba založena především na chirurgické resekci nádorů. Postupem času technologický vývoj přinesl radioterapii, hormonální terapii a chemoterapii. Současně byla vyvinuta také imunoterapie, i když v menším měřítku, ve

světle ohromujícího pokroku chemoterapie a radioterapie (DeVita & Chu, 2008; Liauw et al., 2013). V dnešní době existuje široká škála terapeutických nástrojů pro péči o onkologické pacienty. V klinické praxi se pak běžně kombinuje chemoterapie s jinými cytostatiky, cílenými léčivy, radioterapií a chirurgií (Hennequin et al., 2019).

Neustálý rozvoj v oblasti molekulární patologie nádorových onemocnění umožňuje navrhovat nová léčiva, která působí na specifické molekulární cíle, trénovat imunitní systém a zvyšovat jeho účinnost, a vyvíjet stále účinnější terapeutické strategie (Pina-Sanchez et al., 2021).

### **2.1.1 Konvenční protinádorová chemoterapie**

Podstatou chemoterapie je podávání různorodých cytotoxických sloučenin, souhrnně označovaných jako cytostatika. Cytostatika působí různými mechanismy, kterými způsobují poruchy DNA nebo ovlivňují buněčné struktury nutné k dělení buněk. Výsledkem je zastavení růstu nebo smrti zasažených buněk (Baudino, 2015).

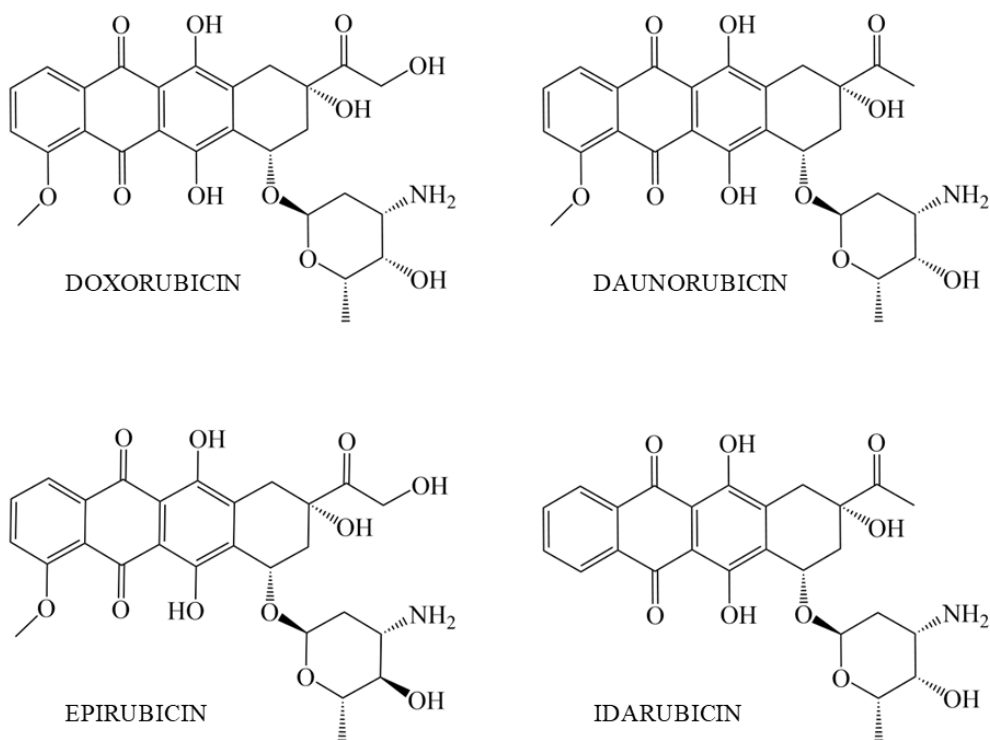
Na základě jejich mechanismu účinku mohou být rozdělena na: alkylační činidla, která interferují s nukleovými kyselinami, destabilizují DNA během replikace a transkripce, což vede k mutacím a vyvolání apoptózy (např. cyklofosamid); antimetabolity, které inhibují syntézu DNA, RNA nebo jejich stavebních bloků (metotrexát, 5-fluorouracil); mitotické jedy, které cílí na buněčné pochody spojené s dělením buněk neboli mitózou (paklitaxel, vinkristin); inhibitory topoizomeráz, které brání správnému odvíjení DNA během replikace a transkripce (topotekan, etoposid); a cytotoxická antibiotika, která uplatňují antineoplastické účinky různými mechanismy, včetně interkalace DNA, inhibice topoizomeráz či nadměrné tvorby reaktivních forem kyslíku (ANT). Právě touto skupinou chemoterapeutických látek se budeme v této disertační práci zabývat podrobněji. Dále se v konvenční chemoterapii uplatňují hormony a příbuzné látky (glukokortikoidy, progestiny, antiestrogeny, antiandrogeny), enzymy (L-asparagináza) či hydroxyurea (Galluzzi et al., 2015; Goodman & Gilman, 2018).

Chemoterapie je založena na inhibici dělení rychle proliferujících buněk, což je charakteristické pro nádorové buňky. Avšak současně chemoterapie ovlivňuje i normální buňky s rychlou proliferací, jako jsou buňky gastrointestinálního traktu, kostní dřeň a vlasové folikuly. Chemoterapie má proto řadu nežádoucích účinků, jako jsou změny v krevním obrazu, změny na sliznicích zažívacího traktu, alopecie, průjem a nespočet dalších (Perez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

### 2.1.1.1 Antracyklinová antibiotika

ANT jsou třídou silných chemoterapeutických činidel široce používaných při léčbě mnoha forem nádorových onemocnění, například rakoviny prsu, leukémií, lymfomů a sarkomů. Byly objeveny v 60. letech 20. století a rychle se staly základními kameny v léčbě nádorových onemocnění díky své širokospektrální protinádorové aktivitě (Minotti et al., 2004). Prvním zástupcem byl daunorubicin (DAUN; daunomycin), který byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces peucetius*. Záhy následoval doxorubicin (DOX; adriamycin) izolovaný ze *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (Grein, 1987).

Ve snaze zlepšit terapeutický index bylo připraveno mnoho jejich analogů. Idarubicin (IDA), derivát DAUN; a epirubicin, semisyntetický derivát DOX, jsou analogy přirozeně produkovaných ANT. Liší se jen nepatrně chemickou strukturou, ale mají poněkud odlišný farmakokinetický profil. DAUN a IDA se primárně používají u akutních leukémií, zatímco DOX a epirubicin vykazují aktivitu proti široké škále solidních nádorových onemocnění (Edwardson et al., 2015).



Obr. 1 Chemické struktury vybraných ANT

Protinádorová aktivita ANT je primárně připisována jejich schopnosti interkalovat do DNA, narušit funkci topoizomerázy II, vytvářet volné radikály a indukovat apoptózu.

Tyto mechanismy společně narušují základní procesy, vedou k inhibici replikace a transkripce DNA, což nakonec vede ke smrti nádorových buněk (Mattioli et al., 2023). Prvním z mechanismů, kterými ANT uplatňují své protinádorové účinky je interkalace DNA. Tento proces zahrnuje inzerci molekuly ANT mezi páry bází v molekule DNA a inhibici syntézy makromolekul nezbytných pro přežití buněk, čímž přímo ovlivňují transkripci, replikaci a reparaci DNA (Minotti et al., 2004). Kromě toho působí také jako tzv. topoizomerázové jedy. Vyvolávají nevratné poškození DNA tvorbou ternárního komplexu ANT-topoizomeráza-DNA. Topoizomeráza II je klíčový enzym pro replikaci a transkripci DNA, který indukuje dvouřetězcové zlomy na 3'-fosfátovém skeletu, čímž umožňuje průchod řetězce a odvíjení nadšroubovicového vinutí DNA. Tvorbou ternárního komplexu s ANT dochází ke stabilizaci komplexu DNA-topoizomeráza II, což vede k zástavě replikace, k inhibici opětovné vazby řetězců DNA, akumulaci zlomů a následně k apoptóze (Nitiss, 2009).

Předpokládalo se, že k cytotoxickým účinkům ANT by mohla dále přispívat tvorba volných radikálů, zejména reaktivní formy kyslíku (ROS). Mechanismus toho procesu zůstává stále nejasný, avšak zvýšený počet ROS a přítomnost deoxyglykonu v moči po podání ANT naznačuje možnost tohoto mechanismu (Shandilya et al., 2020) (Bachur, 1979).

Kromě toho mohou ANT způsobit i jiné typy poškození, např. indukci apoptózy prostřednictvím komplexních signálních drah, zesíťování DNA tvorbou aduktů s formaldehydem, narušení telomer a genové stability interakcí s telomerickou DNA, narušení proteasomální funkce či peroxidace lipidů důsledkem tvorby ROS (Minotti et al., 2004).

Ačkoli jsou ANT ceněny pro svou širokospektrální protinádorovou aktivitu, jejich klinické použití je omezeno mnoha vedlejšími účinky, jako je nauzea, zvracení, průjem, alopecie, gastrointestinální poruchy a útlum kostní dřeně, až po dlouhodobé vedlejší účinky, jako kardiotoxicita či malignity související s léčbou. Riziko nežádoucích účinků závisí na dávce, délce léčby a individuálních rizikových faktorech pacienta (Mattioli et al., 2023).

Kardiotoxicita je nejvýznamnějším a nejlépe prozkoumaným vedlejším účinkem, který může mít za následek srdeční kontraktlní dysfunkci, kardiomyopatii, ventrikulární dysfunkci, syndrom perikarditidy-myokarditidy, arytmie a srdeční selhání (Shinlapawittayatorn et al., 2022). Nejnebezpečnější je chronická forma toxicity, kdy dochází k ireverzibilním změnám v morfologii myocytů a jejich následné smrti. Tyto

změny mohou v dlouhodobém horizontu progredovat až do městnavého srdečního selhání (Mattioli et al., 2023). Molekulární mechanismy ANT-dependentní kardiotoxicity jsou prakticky stejné jako mechanismy působení léčiva na nádorová onemocnění, včetně interkalace DNA, inhibice topoizomerázy II, indukce oxidačního stresu a apoptózy (Mattioli et al., 2023). Léčba kardiotoxicity zůstává i dnes velmi obtížná, protože přesná příčina jejího vzniku není zcela objasněna. Hlavním cílem tedy zůstává její prevence nebo omezení. Nejjednodušším přístupem je úprava dávkovacího režimu, např. prodloužení intervalu mezi jednotlivými dávkami (van Dalen et al., 2016). Další strategií v prevenci kardiotoxicity je použití liposomálních formulací ANT (Xing et al., 2015) nebo jejich analogů. Avšak v případě analogů bylo prokázáno, že při srovnání s protinádorovou účinností je incidence kardiotoxicity podobná (Iarussi et al., 2005). Široce zkoumanou oblastí je farmakologická kardioprotekce, kde se nejčastěji používá dexrazoxan, chelátor železa, který snižuje tvorbu ROS (McGowan et al., 2017).

Spolu s kardiotoxicitou indukuje ANT chemoterapie také rezistenci na ANT, která je hlavní příčinou selhání chemoterapie u nádorových onemocnění. Existuje mnoho mechanismů zodpovědných za vznik ANT rezistence, mezi něž patří změna/mutace topoizomerázy II, změny intracelulární koncentrace ANT, změny metabolismu ANT, změny v indukci proliferace, DNA reparačních drahách či v inhibici apoptózy (Mattioli et al., 2023). Významným mechanismem přispívajícím k rezistenci vůči ANT je jejich metabolismus biotransformačními enzymy. ANT jsou metabolizovány třemi hlavními drahami: redukcí, tvorbou semichinonu a tvorbou deoxyglykonu. Vlivem těchto drah dochází k dramatickému snížení cytotoxických účinků (Edwardson et al., 2015). Heiben et al. popsali roli biotransformačních enzymů, konkrétně aldo-ketoreduktáz, v rezistenci na ANT. Poukázali na to, že zatímco exogenně přidaný DOX se lokalizuje v jádře buněk prsního nádoru, exogenní doxorubicinol (DOX-OL) se hromadí v lysozomech. To naznačuje, že redukce ANT brání vstupu léčiva do jádra. Navíc pozorovali, že DOX-OL má ve srovnání s DOX výrazně nižší afinitu k DNA, což může být také důvodem nedostatečné lokalizace DOX do jádra buněk (Heibein et al., 2012).

Zavedení ANT do klinické praxe představovalo jeden z největších úspěchů moderní onkologie. Navzdory jejich nežádoucím vedlejším účinkům a často vznikající rezistenci mají ANT stále nezastupitelnou roli v léčbě mnoha nádorových onemocnění. Tento fakt neustále pohání výzkum zaměřený na zlepšení jejich účinnosti a bezpečnosti při léčbě, stejně jako na jejich kombinaci s jinými léčivy za účelem dosažení vyšší terapeutické účinnosti (Mattioli et al., 2023).



## 2.1.2 Cílená protinádorová terapie

Nedostatečná specifita chemoterapie a s ní související nežádoucí vedlejší účinky vedly k vývoji molekulárně cílených terapií, které ovlivňují procesy přímějším a specifitějším způsobem. Z farmakologického hlediska je cílem dosáhnout vysoké koncentrace nebo aktivity léčiv ve specifických tkáních a zároveň minimalizovat jejich akumulaci v ostatních tkáních, a tím dosáhnout vyšší účinnosti a nižší toxicity (Min & Lee, 2022).

Myšlenkou této terapie je blokovat specifické molekulární dráhy, které u nádorových buněk řídí růst a progresi nádorového onemocnění. Cílem je inhibice klíčových signálních mechanismů zapojených do buněčné proliferace, přežití, angiogeneze a metastáz, tj. molekulární cíle (receptory, růstové faktory, kinázové kaskády nebo molekuly související s apoptózou a angiogenezí), které jsou nadměrně exprimovány nebo mutovány v nádorových buňkách. Dále stimulovat imunitní systém nebo zacílit podávání chemoterapeutických látek specificky proti nádorovým buňkám, čímž se minimalizuje množství zasažených normálních buněk a zamezuje vzniku nežádoucích vedlejších účinků (Goodman & Gilman, 2018; Perez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

Hnacími faktory progresu nádorových onemocnění jsou onkogenní dráhy v maligních buňkách samotných (např. mutantní receptory a kinázy), reakce nádorového mikroprostředí (např. angiogeneze) a únik maligních buněk z imunitního dozoru hostitele. Na základě toho jsou primárními nástroji pro zacílení onkogenních drah monoklonální protilátky a inhibitory kináz s malou molekulou (Hanahan & Weinberg, 2011; Perez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

Monoklonální protilátky jsou jedinečné ve své schopnosti přímo zabíjet nádorové buňky. Zaměřují se na extracelulární ligandy (např. bevacizumab cílí na VEGF), membránové receptory (např. trastuzumab cílí na HER2, cetuximab a panitumumab cílí na EGFR) a membránově vázané proteiny, jako jsou receptory růstových faktorů nebo receptorové ligandy (např. rituximab cílí na CD20) (Min & Lee, 2022; Zahavi & Weiner, 2020).

Nízkomolekulární inhibitory kináz mohou vstupovat do buněk a interagovat s intracelulárními cíli zapojenými do signalizace nádorových buněk, z nichž mnohé jsou kinázy. Často inhibují více enzymů s různou selektivitou, a proto mají pravděpodobně širší spektrum cílů a produkují širší spektrum požadovaných účinků, ale i účinků mimo

cíl a nežádoucích účinků než monoklonální protilátky (Goodman & Gilman, 2018). Většina inhibitorů inhibuje proteinkinázy, které jsou zapojené do transformace, růstu, proliferace a přežití nádorových buněk. Proteinové kinázy lze dělit na receptorové tyrosinkinázy, nereceptorové (cytoplazmatické) tyrosinkinázy, serin/threoninkinázy a lipidové kinázy na základě jejich subcelulární lokalizace, typu substrátu a charakteristické roli v nádorovém onemocnění (Garcia-Aranda & Redondo, 2017). Inhibitory proteinkináz působí vazbou na tyto kinázy v různých konformacích, aby inhibovaly jejich aktivitu. Inhibitory kinázy typu I se vážou na adenosintrifosfát (ATP)-vazebnou kapsu aktivní konformace enzymu. Část inhibitorů typu I a inhibitory typu II se vážou enzym v neaktivní konformaci. Inhibitory typu III a typu IV alostericky potlačují aktivitu kinázy vazbou v kinázové doméně, buď vedle kapsy vázající ATP, nebo vzdálené od kapsy vázající ATP. Inhibitory typu V působí jako bivalentní inhibitory vázající se na dvě různé části kinázového laloku. Inhibitory typu VI jsou kovalentní inhibitory (Bhullar et al., 2018).

Dalšími nástroji v cílené léčbě jsou hormonální činidla, jako jsou antagonisté estrogenového receptoru (ER) a inhibitory aromatázy, které se používají k léčbě hormonálně závislému karcinomu prsu (Min & Lee, 2022). Dále se využívají cílená cytotoxická činidla, která mohou být konjugována s monoklonálními protilátkami či peptidovými ligandy, nebo zahrnuta do nanonosičů (např. metotrexát, inhibitor dihydrofolátreduktázy). Tímto způsobem se překonává nedostatek specifčnosti konvenční chemoterapie, což umožňuje dosáhnout vyšších koncentrací cytotoxických molekul v nádorové tkáni a snížit periferní toxicitu (Peters, 2019).

Ve srovnání s konvenční chemoterapií mají cílená terapeutická činidla výrazné protinádorové účinky s méně vedlejšími účinky. Nicméně i při cílené terapii dochází k určité úrovni interference s fyziologickými signálními drahami a tím k výskytu vedlejších účinků. Nejčastěji se objevuje únava, nevolnost, kožní a gastrointestinální toxicita, jako jsou vyrážky a průjem (Lacouture & Sibaud, 2018). Podobně jako u konvenční chemoterapie i cílená terapie je ohrožena vznikem lékové rezistence, např. mutace v kinázových doménách (např. EGFR T790M) (Sharma et al., 2007) či aktivace bypassových signálních drah (Wheeler et al., 2010).

Molekulárně cílené terapie způsobily revoluci v léčbě nádorových onemocnění a poskytují účinné možnosti s obecně menším množstvím vedlejších účinků ve srovnání s tradiční chemoterapií. Přestože dosahují vynikajících výsledků u vybraných typů nádorů, není pravděpodobné, že by v dohledné době nahradily cytotoxické látky. Klinické studie

spíše prokázaly silnou synergii mezi cílenými molekulami a konvenčními chemoterapeutiky, díky čemuž jsou často kombinovány (Min & Lee, 2022).

### 2.1.2.1 Inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy

Brutonova tyrosinkináza (BTK) je nerekceptorová tyrosinkináza nezbytná v signální dráze B-buněčného receptoru (BCR), která hraje klíčovou roli ve vývoji, diferenciaci a funkci B-lymfocytů. Byla objevena v roce 1993, kdy mutace v různých doménách BTK se ukázaly jako příčina dědičného onemocnění X-vázané agamaglobulinémie, které je charakterizováno zástavou vývoje B-lymfocytů a hlubokou humorální imunitní nedostatečností (Vetrie et al., 1993)

Spolu s dalšími čtyřmi kinázami patří BTK do rodiny TEC nerekceptorových tyrosinkináz. Jeho gen kóduje protein o 659 aminokyselinách, který obsahuje pět různých proteinových interakčních domén, včetně homologní domény SRC (SH) (pojmenované SH3 a SH2) a kinázové domény s enzymatickou aktivitou (Bradshaw, 2010; Brullo et al., 2021; Hyvonen & Saraste, 1997; Wen et al., 2021). Domény SH2 a SH3 obsahují autofosforylační místo Tyr223, zatímco katalytická doména obsahuje dvě fosforylační místa (Tyr551 a Cys481) cílená ireverzibilními inhibitory. Tyto strukturální charakteristiky jsou zásadní pro návrh různých typů inhibitorů BTK (BTKi) (Bradshaw, 2010). BTK je v podstatě cytoplazmatický protein, který je prostřednictvím interakce jedné z jeho domén s fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátem (PIP3) přechodně translokován do membrány v rámci zapojení do signalizačních drah (Hendriks et al., 2014; Satterthwaite et al., 1997).



Obr. 2 Struktura nerekceptorové tyrosinkinázy BTK. Převzato z: (Pal Singh et al., 2018)

Krátce po svém objevení byla popsána primární role BTK v downstream signalizaci B-lymfocytů zprostředkované BCR (Hendriks et al., 2014; Mao et al., 2001). Tento receptor je exprimován na povrchu B-lymfocytů a jeho exprese je nezbytná pro přežití během několika fází vývoje B-lymfocytů, ale také ve zralých, klidových B-lymfocytech (Kraus et al., 2004; Niino & Clark, 2002). BCR se skládá ze dvou identických těžkých a lehkých imunoglobulinových řetězců spojených disulfidickými můstky (Gauld et al., 2002). Imunoglobulinové řetězce BCR jsou nekovalentně asociovány se signálními

proteiny BCR CD79A (Ig $\alpha$ ) a CD79B (Ig $\beta$ ), které po navázání antigenu podléhají fosforylaci na imunoreceptorových aktivačních motivech na bázi tyrosinu (ITAM) kinázami rodiny SRC. Fosforylované ITAM mají široké spektrum interakcí s adaptorovými molekulami a kinázami, včetně SYK kinázy, která je spolu s kinázami rodiny SRC schopna fosforylovat a aktivovat BTK (Afar et al., 1996; Cheng et al., 1994).

K aktivaci BTK dochází ve dvou krocích. Po translokaci do buněčné membrány je BTK nejprve fosforylována v poloze Y551 v kinázové doméně BTK kinázami rodiny SYK a SRC (Rawlings et al., 1996). Fosforylace BTK na Y551 podporuje její katalytickou aktivitu a následně vede k její autofosforylaci na pozici Y223 v doméně SH3 (Park et al., 1996). Předpokládá se, že druhá fosforylace stabilizuje aktivní konformaci a plně aktivuje BTK kinázu (Marcotte et al., 2010). Takto aktivovaná kináza může být zapojena v přenosu signálu v signalizační kaskádě BCR, klíčové dráze B-lymfocytů (Hendriks et al., 2014).

BTK je zapojena do mnoha dalších signálních drah v B-lymfocytech, včetně signalizace Fc receptoru (Chang et al., 2011; Jongstra-Bilen et al., 2008; Nimmerjahn & Ravetch, 2008), Toll-like receptoru (TLR) a chemokinových receptorů CXCR4 a CXCR5 spojených s G-proteinem, které jsou nezbytné pro transport a navádění B-buněk do tkání (Bajenoff et al., 2006; de Gorter et al., 2007; Ortolano et al., 2006). Kináza BTK není omezena pouze na B-lymfocyty, ale je exprimována ve většině buněčných linií hematopoetického systému, s výjimkou T-lymfocytů. V myeloidních buňkách se účastní různých signálních drah. Mutace v těchto signálních drahách vedou k rozvoji B-buněčných malignit a autoimunitních onemocnění (Pal Singh et al., 2018).

Hromadí se důkazy, že aktivita BTK je klíčová pro buněčné přežití a proliferaci leukemických B-lymfocytů, jejich retenci v lymfatických tkáních a interakce s buňkami mikroprostředí nádoru (Pal Singh et al., 2018). V případě chronické lymfocytární leukemie (CLL) signalizace BTK podstatně přispívá k zahájení nebo udržení CLL. Onemocnění je charakterizováno akumulací neproliferujících monoklonálních CD5+ zralých B-buněk v krvi, které vykazují chronickou signalizaci zprostředkovanou BCR (Muzio et al., 2008). V souladu s chronickou aktivací BCR vykazují CLL buňky nadměrnou expresi a konstitutivní fosforylaci BTK, která je nezbytná pro dráhy zapojené do přežití buněk, včetně AKT, ERK a NF-KB (Herman et al., 2011; Ponader et al., 2012; Singh et al., 2017). Podobně je tomu i u lymfomu z plášťových buněk (MCL). MCL vzniká z maligní transformace B-lymfocytů v plášťových zónách lymfatických tkání obklopujících germinální centra. BTK je v případě buněk MCL silně exprimována a

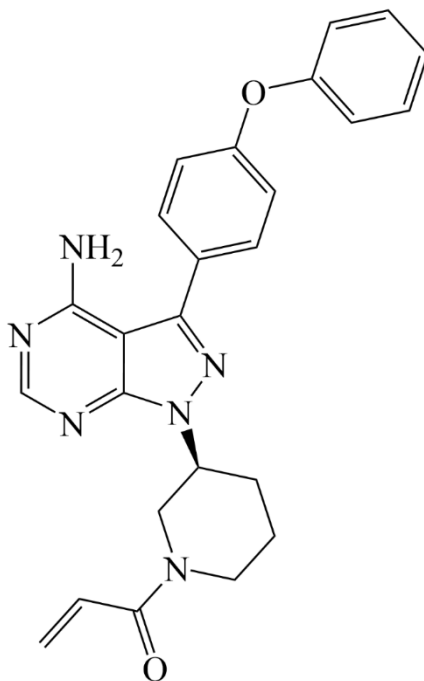
konstitutivně I v případě MCL buněk je BTK silně exprimována a konstitutivně fosforylována na Y223, což je klíčové pro retenci v lymfatických tkáních (Chang et al., 2013). Také další onemocnění sdílejí společné patogenní mechanismy zahrnující BTK a souvisejících signální dráhy, včetně Waldenströmovy makroglobulinémie (WM) (Yang et al., 2013), mnohočetného myelomu (MM) (Tai et al., 2012), folikulárního lymfomu (FL), lymfomu marginální zóny (MZL), a difuzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL) s podtypem lymfomu podobným aktivovaným B-lymfocytům (ABC) (Davis et al., 2010).

Vzhledem k tomu, že široká škála důkazů poukazuje na zásadní roli BTK signalizace u nejběžnějších typů B-buněčných lymfoproliferativních onemocnění, existuje v současné době značný zájem o inhibici BTK jako protinádorovou terapii nejen u B-buněčných malignit, ale také u dalších hematologických malignity a solidní nádorů (Grassilli et al., 2016; Kokabee et al., 2015). Během několika posledních let bylo vynaloženo značné úsilí na vývoj BTKi. Na základě mechanismů účinku a vazebných režimů lze BTKi rozdělit do dvou skupin: ireverzibilní inhibitory, charakterizované Michaelovou akceptorovou skupinou schopnou vytvořit kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem Cys481 v ATP-vazebném místě BTK; a reverzibilní inhibitory, které se vážou na specifickou kapsu v doméně SH3 prostřednictvím slabých, reverzibilních interakcí (např. vodíkových vazeb nebo hydrofobních interakcí), čímž způsobuje neaktivní konformaci enzymu. Nedávno se objevil nový typ hybridních BTKi, které jsou schopny vytvářet reverzibilní kovalentní vazby se zbytkem Cys481 a dočasně inaktivovat enzym (Liang et al., 2018).

#### **2.1.2.1.1 Ibrutinib**

Ibrutinib (Imbruvica®; IBR) je ireverzibilní inhibitor BTK první generace. Kovalentně se váže na cysteinový zbytek (Cys-481) v blízkosti ATP-vazebné kapsy kinázové domény BTK, čímž dochází k trvalé inhibici kinázové aktivity BTK a downregulaci signalizace NF- $\kappa$ B. Tímto mechanismem drasticky snižuje růst nádoru a podporuje apoptózu (Brown, 2013; Saleh et al., 2017). Kromě inhibice BTK ovlivňuje také další kinázy rodiny TEC, jako je interleukin-2-indukovatelná T-buněčná kináza (ITK), čímž modifikuje buněčnou adhezi v mikroprostředí nádoru, moduluje chemotaxi a signalizaci mezi buňkami (Li et al., 2018).

IBR byl prvním BTKi schváleným a testovaným v klinických studiích u pacientů s B-buněčnými lymfomy (Brown, 2013). V roce 2013 úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration; FDA) schválil IBR k léčbě pacientů s MCL a v roce 2014 přidal také schválení pro léčbu pacientů s CLL (de Claro et al., 2015). Dále byl schválen k léčbě WM, MZL, malého lymfocytárního lymfomu (SLL) a u pacientů s chronickou reakcí štěpu proti hostiteli (cGVHD) (FDA, 2024c).



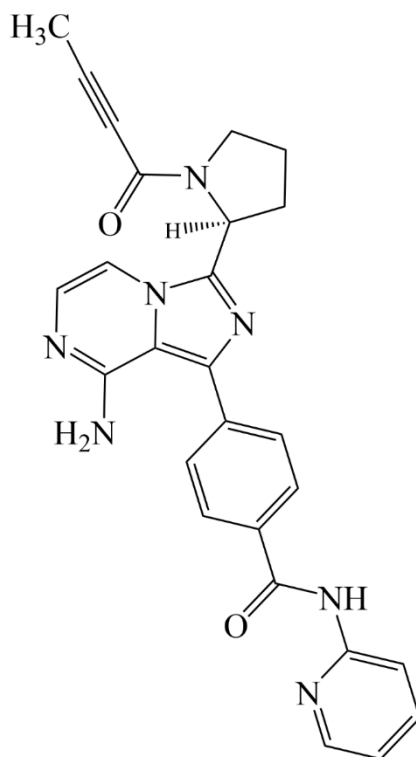
Obr. 3 Chemická struktura IBR

Kromě BTK vykazuje IBR významnou inhibiční aktivitu proti 10 dalším proteinkinázám, včetně B-lymfoidní tyrosinkinázy (BLK), kinázy kostní dřeně na chromozomu X (BMX), nереceptorové tyrosinkinázy (TEC), také blokuje aktivaci receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), receptoru lidského epidermálního růstového faktoru 2 (HER2), receptoru Erb-B2 tyrosinkinázy 3 (ErbB3) a receptoru Erb-B2 tyrosinkinázy 4 (ErbB4), čímž dosahuje zvýšené apoptózy buněk karcinomu prsu (Honigberg et al., 2010; Chen et al., 2016; Wang et al., 2016). Tyto nespécifické vazby jsou způsobeny ekvivalentními cysteinovými zbytky v aktivních místech jiných kináz (Liu et al., 2013). Nedostatek selektivity přináší řadu nežádoucích účinků souvisejících s léčbou, nejčastěji průjem, únava, nevolnost, infekce horních cest dýchacích, neutropenie, anémie, dermatologické problémy a kardiální nežádoucí příhody včetně hypertenze a fibrilace síní (Coutre et al., 2019; Treon et al., 2015).

Je ale důležité zdůraznit, že díky necílené inhibici EGFR, ITK a dalších, může IBR cílit na jiné onkogenní dráhy než BTK v nádorových buňkách a působit jako modulátor T-buněk v kombinované imunoterapii. Je ironií, že nové, vysoce selektivní BTKi nemusí mít tyto potenciálně cenné „vedlejší účinky“ IBR (Lin et al., 2020; Pal Singh et al., 2018).

#### 2.1.2.1.2 Akalabrutinib

Akalabrutinib (Calquence®; ACA) je ireverzibilní inhibitor BTK druhé generace schválený FDA k léčbě relabujících/refrakterních (R/R) MCL, CLL a SLL (FDA, 2024b).



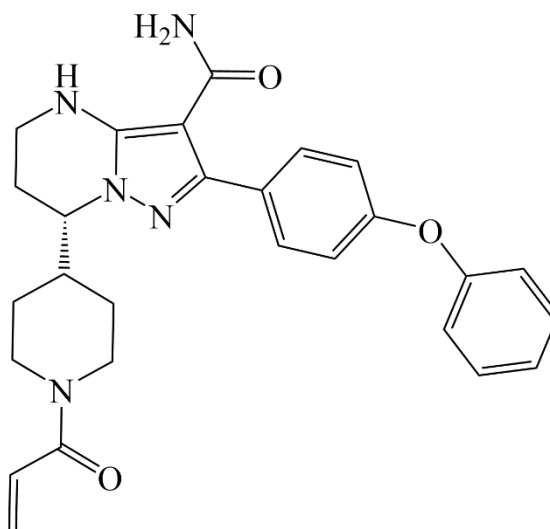
Obr. 4 Chemická struktura ACA

BTKi druhé generace byly navrženy tak, aby maximalizovaly účinky a selektivní obsazení BTK se sníženou aktivitou proti necílovým kinázám. ACA se kovalentně váže na C481, avšak s vyšší selektivitou a účinností. Specificky inhibuje BTK bez ovlivnění EGFR, ITK nebo TEC, čímž je minimalizován výskyt vedlejší účinků (Wu et al., 2016). Ve srovnání s IBR má tedy ACA vyšší stupeň specifity pro BTK (Barf et al., 2017). U pacientů s CLL léčených ACA došlo k významnému snížení výskytu kardiovaskulární toxicity, především fibrilace síní a k poklesu přerušení léčby související s nežádoucími účinky oproti léčbě IBR (Byrd et al., 2021).

I přesto, že byl ACA optimalizován tak, aby byl selektivnější, stále způsobuje některé nežádoucí účinky. Nejčastěji se jedná o bolesti hlavy, průjem, infekce horních cest dýchacích, nevolnost a únava (Furman et al., 2021).

#### 2.1.2.1.3 Zanubrutinib

Zanubrutinib (Brukinsa®; ZAN) je ireverzibilní inhibitor BTK druhé generace, který byl schválen FDA pro léčbu dospělých pacientů s MCL, WM, MZL, CLL a SLL (FDA, 2024a).



Obr. 5 Chemická struktura ZAN

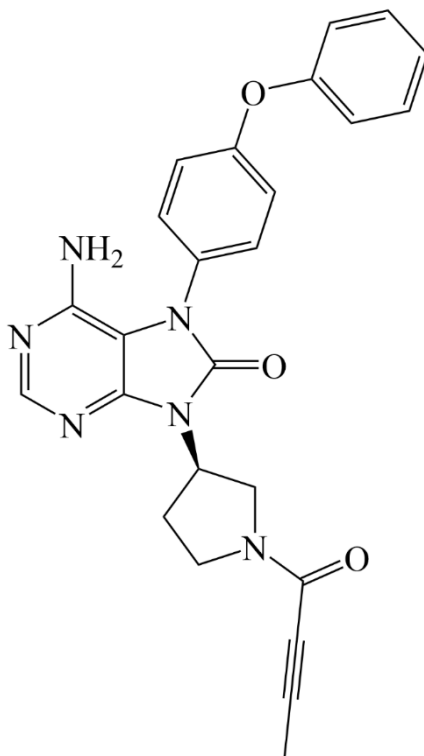
Stejně jako předchozí inhibitory se i ZAN kovalentně váže na C481 v aktivním místě BTK, aby inhiboval aktivitu BTK. ZAN si ve své struktuře zachovává elektrofilní akrylamidovou a difenyletherovou skupinu IBR, ale neobsahuje pyrimidinový kruh. Díky tomuto strukturnímu rozdílu je ZAN selektivnější a vykazuje srovnatelně nižší mimocílovou aktivitu než IBR pro strukturně příbuzné kinázy, jako je EGFR, ITK a TEC (Liu et al., 2021). Díky tomu má mnohem méně vedlejších účinků než IBR, včetně sníženého výskytu fibrilace síní, kardiovaskulární toxicity, hypertenze a krvácení (Tam et al., 2022). Nejčastějšími vedlejšími účinky byly infekce horních cest dýchacích, vyrážka, kontuze, bolesti, neutropenie a průjem (Tam et al., 2022).

#### 2.1.2.1.4 Tirabrutinib

Tirabrutinib (Velebru®; TIR) je dalším ireverzibilní inhibitor BTK druhé generace, specifitou podobný ACA. Byl schválen pro léčbu rekurentního nebo

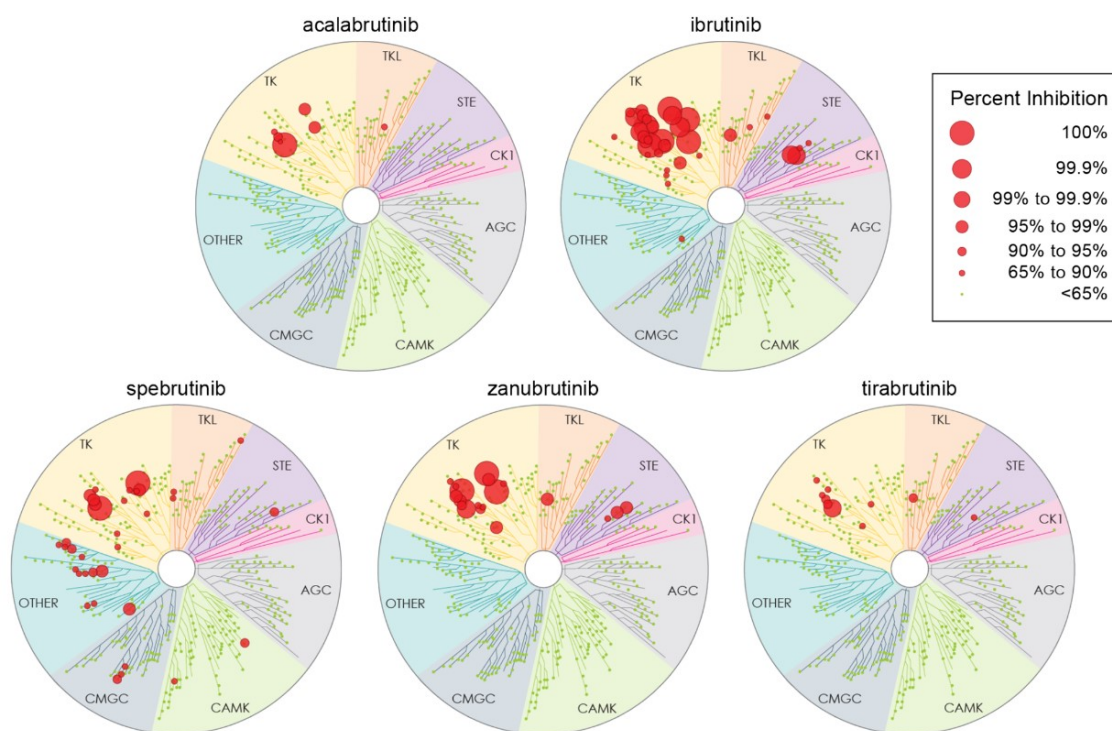


refrakterního primárního lymfomu centrálního nervového systému (PCNSL) a později pro WM japonskou agenturou pro farmaceutické a zdravotnické prostředky (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) (Dhillon, 2020).



Obr. 6 Chemická struktura TIR

TIR působí specificky na Cys481 za vzniku ireverzibilní inhibice fosforylace tyrosinkinázy. Inhibuje BTK s hodnotou poloviční maximální inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) čtyřikrát vyšší než IBR. Avšak hodnoty  $IC_{50}$  pro příbuzné tyrosinkinázové rodiny Src (Lck, Lyn, Fyn) jsou významně vyšší, což naznačuje, že TIR má vyšší selektivitu pro BTK než IBR (Liu et al., 2021).



Obr. 7 Účinek a selektivita vybraných BTKi, převzato z: (Kaptein et al., 2018).

#### 2.1.2.1.5 Další BTKi v klinických studiích

Dalším schváleným BTKi je orelabrutinib, ireverzibilní inhibitor druhé generace, který získal v Číně podmíněné schválení pro léčbu pacientů s MCL a CLL/SLL, kteří podstoupili alespoň jednu předchozí terapii (Dhillon, 2021).

Mimo výše zmíněné BTKi se klinické studie zabývají stále novějšími ireverzibilními inhibitory druhé generace, jako jsou např. branebrutinib (Watterson et al., 2019) a evobrutinib (Jurczak et al., 2021) (navrženy k léčbě autoimunitních onemocnění) či spebrutinib (Brown et al., 2016).

I přes zlepšenou selektivitu BTKi druhé generace, ireverzibilní vazba stále představuje riziko selektivity, protože asi 10 dalších lidských kináz obsahuje ekvivalentní zbytky Cys v aktivních místech (Liu et al., 2013). Také mutace na BTK Cys481 významně snižují účinnost a způsobují vznik rezistence (Woyach et al., 2014). I proto existuje zájem o vývoj BTKi třetí generace s novými vazebnými mechanismy. Mezi BTKi třetí generace řadíme např. BMS-986142, fenebrutinib, nemtabrutinib, pirtobrutinib, rilzabrutinib či vecabrutinib (Alu et al., 2022). Za zmínku stojí vysoce selektivní pirtobrutinib schválený v roce 2023 pro léčbu MCL, CLL a SLL (FDA, 2024d).

## 2.2 Léková Rezistence

Lékovou rezistenci lze definovat jako schopnost nádorového onemocnění vyvinout si obrané mechanismy, které vedou ke snížení účinnosti terapie. To představuje hlavní překážku v léčbě nádorových onemocnění a ovlivňuje celkové přežití pacienta (Gottesman, 2002). První zmínka o rezistenci se začala objevovat v souvislosti s bakteriemi a jejich rezistencí vůči určitým antibiotikům (Davies & Davies, 2010). Později byly pozorovány identické mechanismy i u jiných nemocí, včetně nádorových onemocnění (Szakacs et al., 2014).

V zásadě lze lékovou rezistenci rozdělit do dvou typů: vrozená a získaná rezistence. Již v raných stádiích jsou nádorová onemocnění tvořena heterogenní populací buněk s různou citlivostí na terapii. Výsledkem je, že každá nádorová buňka exprimuje různé pole genů lékové rezistence (Gottesman, 2002). V průběhu terapie dochází k zmenšení nádorové populace, avšak vzhledem k její heterogenitě existuje určité procento nádorových buněk, které jsou vůči léčbě rezistentní a přežívají. Tyto buňky bývají často tzv. nádorové kmenové buňky, které bývají příčinou recidivy onemocnění. Vrozená rezistence je tedy schopnost nádorových buněk odolávat léku ještě před jeho podáním (Wang et al., 2019). Příkladem může být dobře zdokumentovaná vrozená rezistence u pacientů s BRAF-mutantním melanomem léčených inhibitory BRAF, jako je vemurafenib a dabrafenib. U pacientů s mutací BRAF V600E dochází ke ztrátě tumor supresorového genu PTEN, který vede k aktivaci dráhy PI3K/AKT, která může podporovat přežití a proliferaci buněk nezávisle na signalizaci BRAF (Flaherty et al., 2010; Chapman et al., 2011).

Naopak získaná rezistence se rozvíjí až po podání léčiva, kdy jsou citlivé nádorové buňky postupně eradikovány a rezistentní buňky přetrvávají. Genetická a epigenetická nestabilita nádorových buněk vede k postupnému získávání dalších genetických a epigenetických abnormalit, které významně přispívají k získané lékové rezistenci (Wang et al., 2019). Příkladem získané rezistence je získaná mutace v genu BCR-ABL u pacientů s CML. Mutace T315I v genu BCR-ABL vede ke konformační změně v kinázové doméně, která brání účinné vazbě tyrosinkinázových inhibitorů, jako je imatinib (Jabbour et al., 2008).

Lékovou rezistenci lze dále rozdělit na farmakodynamickou a farmakokinetickou. Rezistence spojená s farmakodynamickým mechanismem může být způsobena změnou cíle léčiva nebo jeho efektorových struktur, změnou v DNA reparačních drahách či

defekty v apoptóze. Nejčastěji se jedná o mutace cílových proteinů nebo vzájemné ovlivňování různých signálních drah (cross-talk) (Shelton et al., 2016). Mutace cílových proteinů primárně narušují vazebný potenciál molekul léčiv tím, že mění topologii vazebného místa. Příkladem může být již zmíněná mutace T315I v genu BCR-ABL (Jabbour et al., 2008). Naproti tomu mechanismus cross-talk zahrnuje prolínání dvou signálních drah, které disponují složkami se stejnou funkcí v obou drahách. Příkladem může být selektivní modulace signální dráhy ER, jejíž fungování je kompenzováno signální dráhou HER2 v důsledku křížení těchto dvou drah, což vede k neúčinnosti léčby (Chen et al., 2015).

Na druhé straně, farmakokinetické mechanismy rezistence zahrnují buď eflux léčiv prostřednictvím lékových transportérů přítomných na buněčných membránách nebo degradaci léčiv biotransformačními enzymy (Alfarouk et al., 2015; Rochat, 2009; Vadlapatla et al., 2013).

Jedním z nejvíce studovaných mechanismů lékové rezistence je snížená akumulace léčiv zvýšením efluxu, tedy transportu léčiv ven z buněk. Primárně je zprostředkován prostřednictvím energeticky závislých transmembránových transportních proteinů, známých jako ATP-binding cassette (ABC) proteiny (Vasiliou et al., 2009). Transportéry lze identifikovat podle dvou jedinečných domén: vysoce konzervované nukleotidové vazebné domény (NBD) a variabilnější transmembránové domény (TMD) (Kiss et al., 2015; Locher, 2009). Po navázání substrátu na transmembránovou doménu dochází k hydrolyze ATP na vazebném místě nukleotidu, která vede ke konformačním změnám a k vypuzení substrátu z buňky (Schneider & Hunke, 1998).

ABC transportéry jsou přítomny na plazmatické membráně buněk, kde mají různé klíčové funkce, včetně regulace iontů, lipidů, hormonů a aktivního efluxu xenobiotik (Vasiliou et al., 2009). Zvýšení exprese těchto transportérů vede k celkovému snížení intracelulární koncentrace léčiv, a nakonec k necitlivosti na chemoterapeutika (Michael & Doherty, 2005; Ramos et al., 2021). Bylo identifikováno přibližně 48 členů ABC transportérů, z nichž nejvýznamnější v lékové rezistenci jsou: permeabilní glykoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1), protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí 1 (MRP1, ABCC1) a breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) (Bailey-Dell et al., 2001). Všechny tři zmíněné transportéry mají širokou substrátovou specifitu a jsou schopny odvádět z buněk celou řadu strukturně nesouvisejících léčiv, čímž chrání nádorové buňky před mnoha chemoterapiemi. Tento jev je známý jako mnohočetná léková rezistence (Housman et al., 2014).

Ve srovnání s transportéry je mnohem méně prozkoumána role biotransformačních enzymů, které stojí za změnou struktury xenobiotik. V nádorových buňkách dochází k jejich deaktivaci a redukci jejich parentní účinné formy (Vadlapatla et al., 2013). Biotransformační enzymy jsou lokalizovány především v játrech a ledvinách, v menší míře i v dalších orgánech, ale lze je nalézt také v různých nádorových tkáních, kde může být jejich exprese změněna. Změněná exprese biotransformačních enzymů v nádorových buňkách často vede k rezistenci vůči lékům. Nízká exprese a aktivita enzymů může snížit aktivaci proléčiv v nádorových buňkách (Ruparelia et al., 2018), zatímco nadměrná exprese vede ke zvýšenému metabolismu léčiv (Siegel et al., 2012; Zhu et al., 2015). V obou případech dochází ke snížení účinné koncentrace léčiv v cílovém místě a způsobit následný relaps nádoru a špatnou prognózu. Vzhledem k tomu, že biotransformační enzymy jsou exprimovány i v normálních buňkách je tedy na místě selektivní inhibice nádorově specifických enzymů. Použití silných inhibitorů může nejen zvrátit lékovou rezistenci, ale také zvýšit farmakokinetiku a tkáňovou distribuci léků, což může vést ke zvýšené toxicitě na organismus (Pathania et al., 2018).

### **2.2.1 Biotransformační enzymy**

Biotransformační enzymy katalyzují metabolismus endogenních látek a xenobiotik, včetně léčiv a toxinů. Přidáním funkčních skupin se zvyšuje rozpustnost sloučenin ve vodě a usnadňuje se jejich vyloučení z těla (Goodman & Gilman, 2018).

Biotransformační reakce obecně probíhají ve dvou fázích. První fáze biotransformace je počáteční fází metabolismu xenobiotik. Zahrnuje oxidační, redukční a hydrolytické reakce, při kterých dochází k zavedení či odkrytí funkčních skupin, které umožňují následnou konjugaci s endogenní molekulou. Tyto reakce vedou většinou k inaktivaci léčiva, avšak v určitých případech mohou vést i k bioaktivaci proléčiva (Huttunen et al., 2011). Hlavní metabolické enzymy spojené s reakcemi fáze I jsou členy nadrodiny cytochromu P450 (CYP), které přispívají k metabolismu široké škály xenobiotik a endogenních sloučenin. Studie prokázaly, že izoenzymy CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 a 3A4 se podílejí na metabolismu většiny klinicky dostupných léků (Corsini & Bortolini, 2013). Nejvyšší metabolická aktivita byla zjištěna u CYP3A4, který svou velmi širokou substrátovou specifitou metabolizuje zhruba polovinu klinicky používaných léčiv (Guengerich, 1999; Zhou et al., 2007). Dalšími enzymy první fáze biotransformace jsou flavinové monooxygenázy (FMO). Enzymy této nadrodiny

katalyzují oxidaci mnoha substrátů obsahující nukleofilní heteroatom (N, S a P) (Phillips & Shephard, 2008). Neméně významnou skupinou jsou redukční enzymy, z nichž nejvíce popsány jsou CRE, často s významným klinickým dopadem (Oppermann & Maser, 2000).

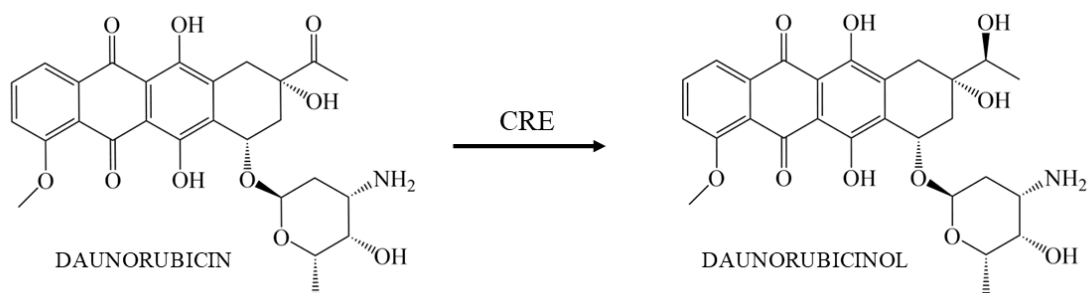
Enzymy druhé fáze biotransformace katalyzují konjugaci metabolitu z první fáze biotransformace s endogenní molekulou (kyselina glukuronová, glutathion). Výsledkem je produkce metabolitů se zvýšenou rozpustností ve vodě, které se snadněji eliminují z organismu prostřednictvím efluxních transportérů. Charakterizováno je několik nadrodin konjugačních enzymů, včetně UDP-glukuronosyltransferázy (UGT) a glutathion-S-transferázy (GST) (Goodman & Gilman, 2018).

### **2.2.1.1 Karbonyl redukující enzymy**

CRE jsou různorodou skupinou enzymů, které katalyzují redukci karbonylových sloučenin na jejich odpovídající alkoholy. Tyto enzymy jsou klíčové v různých biologických procesech, včetně metabolismu endogenních a exogenních sloučenin, detoxikace a syntézy komplexních molekul (Malatkova et al., 2010).

Redukce karbonylu je významným krokem první fáze biotransformace mnoha xenobiotických karbonylových sloučenin. Tvorbou hydroxylové skupiny činí látky hydrofilnější a poskytuje produkt, který může být konjugován, např. glukuronidací nebo sulfatací, čímž se usnadňuje vylučování z organismu (Oppermann & Maser, 2000).

V současnosti je většina charakterizovaných CRE seskupena do tří velkých nadrodin, a to aldo-ketoreduktázy (AKR), dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem (MDR). Tyto enzymy se vyznačují širokou a překrývající substrátovou specifikou. Účastní se metabolismu steroidních hormonů, eikosanoidů, neurotransmiterů, žlučových kyselin a mnoha dalších. Kromě toho metabolizují xenobiotické sloučeniny v první fázi biotransformačních reakcí, včetně léčiv jako jsou ANT, oracin či dolasetron, látek znečišťujících životní prostředí nebo karcinogenů pocházejících z tabáku (Oppermann & Maser, 2000; Pilka et al., 2009).



Obr. 8 Schéma redukce DAUN na DAUN-OL.

### 2.2.1.1.1 Dehydrogenázy/Reduktázy se středně dlouhým řetězcem

Nadrodina MDR je rozsáhlou a heterogenní skupinou enzymů se širokou škálou enzymatických aktivit. Navzdory nízké podobnosti sekvencí mají podobnou velikost a konzervovanou celkovou strukturu tvořenou dvěma doménami: kofaktorovou vazebnou doménou a katalytickou doménou (Knoll & Pleiss, 2008).

Nadrodina MDR čítá více než 600 000 členů a pokrývá všechny hlavní taxonomické větve, včetně prokaryot i eukaryot. V současnosti bylo identifikováno více než 2000 eukaryotických MDR sekvencí (Ostberg et al., 2024). Nadrodinu MDR lze rozdělit do 86 jedinečných klastrů, z nichž každý obsahuje jednu proteinovou rodinu. Největší rodinou MDR jsou alkoholdehydrogenázy s více než 2000 členy. Prvním charakterizovaným členem byla savčí alkoholdehydrogenáza třídy I. Nadrodinu MDR dále tvoří prostaglandinreduktázy, sorbitoldehydrogenázy, chinonoxidoreduktázy, leukotrien B4 dehydrogenázy, polyoldehydrogenázy a mnoho dalších rodin (Ostberg et al., 2024; Persson et al., 2008).

Enzymy MDR se podílejí na metabolismu endogenní i xenobiotických sloučenin, regulačních procesech a ochraně před poškozením buněk. Mezi endogenní substráty patří steroidy, prostaglandiny a monosacharidy, zatímco mezi xenobiotické substráty patří především alifatické a aromatické aldehydy a ketony, a alkoholy (Knoll & Pleiss, 2008; Persson et al., 2008).

### 2.2.1.1.2 Dehydrogenázy/Reduktázy s krátkým řetězcem

SDR představují jednu z nejstarších a nejrozsáhlejších nadrodin enzymů, které jsou přítomny ve všech živých organismech (Persson et al., 2009). V lidském genomu bylo identifikováno 75 SDR genů klasifikovaných do 48 SDR rodin (Gabrielli et al., 2022). Navzdory své nízké sekvenční podobnosti (10–30 %) sdílejí některé charakteristické

rysy. Téměř všechny SDR mají velmi podobné terciální struktury a dvě specifické sekvence, z nichž jedna slouží jako vazebné místo pro kofaktor (TGxxxGxG) a druhá zahrnuje aminokyseliny přímo zapojené do katalýzy různých substrátů SDR (Oppermann et al., 2001).

SDR jsou nadrodinou NAD(P)(H)-dependentních oxidoreduktáz, které zastávají především fyziologické funkce, ale účastní se také první fáze biotransformace některých xenobiotik. Substrátové spektrum SDR sahá od polyolů, retinoidů, steroidů a derivátů mastných kyselin až po xenobiotika, jako jsou ANT, oracin, nabumeton, ketoprofen nebo nitrosaminy (4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon; NNK) specifické pro tabák (Stambergova et al., 2014). Nejvýznamnější publikované enzymy nadrodiny SDR, které se účastní metabolismu xenobiotik, jsou CBR1 a CBR3. Vzhledem k tomu, že pouze CBR1 signifikantně přispívá k metabolismu ANT, byl do naší studie z nadrodiny SDR vybrán právě tento enzym (Bains et al., 2009).

CBR1 (*karbonylreduktáza 1*) je jedním z nejlépe prostudovaných CRE nadrodiny SDR. Lidská CBR1 má velikost 30 kDa a skládá se z 227 aminokyselin. Původně byla zařazena do nadrodiny AKR, ale pozdější strukturální výzkumy odhalily, že je členem nadrodiny SDR (Malatkova et al., 2010). Byla detekována ve většině tkání s nejvyššími koncentracemi v játrech, placentě a mozku (Wirth & Wermuth, 1992). Úroveň exprese CBR1 souvisí s progresí nádoru a bylo zjištěno, že je zvýšená ve tkáních karcinomu plic, prsu, jater, střev a tlustého střeva ve srovnání s normálními tkáněmi (Murakami et al., 2011; Shi & Di, 2017). CBR1 je monomerní cytosolická NAD(P)(H)-dependentních oxidoreduktáza katalyzující redukci rozličných endogenních i xenobiotických substrátů. Spektrum endogenních sloučenin zahrnuje steroidy, eikosanoidy, jako jsou prostaglandiny. Kromě toho několik studií naznačuje kritickou roli CBR1 v metabolismu produktů peroxidace lipidů, jako je vysoce reaktivní a genotoxický 4-oxonon-2-enal, který vzniká při oxidativním stresu, což naznačuje, že CBR1 se účastní stresové reakce a eliminace metabolitů produkovaných ROS (Pilka et al., 2009). CBR1 plní důležitou roli v první fázi biotransformace xenobiotik. Substráty zahrnují aromatické aldehydy a ketony, *o*-chinony odvozené od polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) nebo *p*-chinony, jako je menadion. Metabolizuje mimořádně široké spektrum léčiv a toxikologicky významných substrátů, jako jsou ANT, haloperidol, dolasetron, metyrapon nebo silný karcinogen NNK (Matsunaga et al., 2006; Pilka et al., 2009).



### 2.2.1.1.3 Aldo-ketoreduktázy

AKR jsou nadrodinou NAD(P)H-dependentních oxidoreduktáz, které jsou převážně cytosolické a nejčastěji existují jako monomery o molekulové hmotnosti 37 kDa (Penning et al., 2021). Existuje 15 lidských AKR, a přestože jejich karbonylové substráty mohou být různé, tyto proteiny mají některé společné rysy (Penning et al., 2021). Každý enzym je charakterizován „(β/α)<sup>8</sup>-barelem“ nebo triosa-fosfát izomerázovým soudkem TIM, který poskytuje robustní lešení potřebné pro vazbu široké škály strukturně různorodých karbonylových substrátů. Na zadní straně válce jsou tři velké smyčky, které definují specifičnost substrátu a přinášejí strukturní identitu rodinám. Aktivní místo AKR se nachází na C-konci proteinu a je optimalizováno pro vysoce afinitní interakci s pyridinovými nukleotidy. Jako kofaktor využívají NADPH (Barski et al., 2008; Singh et al., 2015).

Zavedená nomenklatura AKR je založena pouze na podobnosti aminokyselinové sekvence, nikoli na funkční podobnosti. Základní princip při pojmenování je odvozen od nadrodiny CYP. Všichni členové jsou označeni kořenem AKR následovaným arabskou číslicí představující rodinu a velkým latinským písmenem označujícím podrodinu. Jednotliví členové jsou následně očíslováni podle chronologie charakterizace sekvencí a představují unikátní proteinovou sekvenci (Mindnich & Penning, 2009). Webovou stránku s aktuálními informacemi o proteinech AKR spravuje na University of Pennsylvania prof. T. Penning na adrese URL <http://www.med.upenn.edu/akr>.

Obecným rysem AKR je substrátová selektivita. Reakce jsou v zásadě obousměrné, avšak ve většině případů katalyzují redukcí aldehydů a ketonů. AKR se významně účastní metabolismu steroidů, prostaglandinů a xenobiotik, jako jsou léky a environmentální toxiny. Kromě svých metabolických rolí přispívají AKR také k detoxikaci reaktivních karbonylových sloučenin, čímž chrání buňky před oxidačním poškozením a jinými formami stresu. Dále se AKR účastní biosyntézy a metabolismu retinoidů a dalších signálních molekul odvozených od lipidů, což naznačuje jejich význam v buněčných signálních drahách a vývojových procesech (Penning & Drury, 2007).

Nadrodina AKR je skupinou enzymů, která obsahuje více než 190 členů (Penning et al., 2021). Pro tuto disertační práci byly vybrány specifické enzymy AKR na základě jejich prokázané účasti na metabolické konverzi DAUN. Nejvyšší aktivita v přítomnosti DAUN byla naměřena u AKR1C3, což ji činí klíčovým objektem zájmu. Navíc byla prokázána významná aktivita také u AKR7A2, AKR1A1, AKR1B10 a AKR1B1, přičemž

AKR1B1 vykazovala nižší, avšak stále relevantní aktivitu (Bains et al., 2010; Bains et al., 2008). Následující část se zaměřuje na podrobný popis těchto enzymů.

AKR1A1 (*aldehydoreduktáza*) byl identifikován jako klíčový enzym zapojený do biosyntézy kyseliny askorbové. Je exprimován ve většině tkání, s nejvyššími hladinami v proximálních tubulech ledvin. Tato cytosolická, NADPH-dependentní, monomerní oxidoreduktáza vykazuje nízkou substrátovou selektivitu. Preferuje negativně nabitě substráty obsahující karboxylovou skupinu, ale redukuje také aromatické a steroidní aldehydy, stejně jako malé tříuhlíkové aldehydy. Podílí se na detoxifikaci aldehydů generovaných peroxidací lipidů a metabolismu neurotransmiterů (Barski et al., 2008). Vykazuje aktivitu pro sukcinát semialdehyd, benzaldehydy, 4-hydroxynonenal či kyselinu D-glukuronovou (O'Connor et al., 1999). Rovněž byla prokázána účast na metabolismu léčiv DAUN, haloperidol, metyrapon (Bains et al., 2008; Oppermann, 2007).

AKR1B1 (*aldosareduktáza*) je zdaleka nejvíce studovaným členem AKR, kvůli své roli v polyolové dráze, kde převádí vysoké koncentrace glukózy pozorované u diabetiků na sorbitol (první krok v polyolové dráze) (Gabbay, 1975). Aktivita enzymu je spojena s hyperglykemickým poškozením a následnými diabetickými komplikacemi, jako jsou retinopatie, neuropatie a nefropatie (Gabbay, 2004; Chang et al., 2014; Liu et al., 2011). Katalyzuje redukcí různých substrátů včetně AGE prekurzorů, isokortikosteroidů, produktů peroxidace lipidů, konjugátů glutathionu s nenasycenými aldehydy a látek znečišťujících životní prostředí (akrolein) (Barski et al., 2008).

AKR1B10 (*aldosareduktáza* tenkého střeva) je na rozdíl od všudypřítomně exprimované AKR1B1 exprimován především v tenkém a tlustém střevě, játrech, brzlíku a nadledvinkách (Barski et al., 2008). Rovněž je nadměrně exprimován u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), karcinomu prsu, slinivky, a hepatocelulárního karcinomu (Dai et al., 2021; Chung et al., 2012; Kang et al., 2011; Reddy et al., 2017). V případě NSCLC u kuřáků a hepatocelulárního karcinomu byl popsán jako potenciální prognostický a diagnostický marker (DiStefano & Davis, 2019; Penning, 2005). Naopak snížená exprese byla pozorována u karcinomu tlustého střeva, žaludku, hlavy a krku a endometria (Hevir et al., 2013; Laffin & Petrash, 2012). Má podobnou substrátovou specifitu jako AKR1B1. Podílí se na regulaci retinové signalizace přeměnou *all-trans*-retinaldehydu na retinol (Gallego et al., 2007). Vykazuje vysokou katalytickou aktivitu vůči širokému spektru xenobiotik. Redukuje aromatické aldehydy, chinony a ketony včetně léčiv, jako je DAUN a dolasetron (Martin et al., 2006). Podílí se

na detoxikaci reaktivních aldehydů generovaných peroxidací lipidů, toxinů a karcinogenů obsahujících aldehyd, jako jsou toxické aldehydy generované metabolismem NNK specifických pro tabák a dalších karcinogenních látek přítomných v tabákovém kouři (Penning, 2005).

AKR1C3 (*17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza* typ 5) je enzym se širokou substrátovou specifitou. Účinně redukuje širokou škálu steroidních hormonů, prostaglandinů a xenobiotických sloučenin. Jedna z primárních fyziologických rolí AKR1C3 je v metabolismu steroidů. Katalyzuje redukcí 4-androsten-3,17-dionu na testosteron a estronu na 17 $\beta$ -estradiol, což vede k transaktivaci androgenních a estrogenních receptorů. Podílí se také na metabolismu progesteronu a dalších steroidních hormonů. Kromě své role v metabolismu steroidů se AKR1C3 podílí na metabolismu prostaglandinů. Jako prostaglandin (PG) F syntáza katalyzuje redukcí PGH2 za vzniku PGF2 $\alpha$  a stereospecifickou redukcí PGD2 na 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -PGF2 (Byrns et al., 2010). Produkty těchto reakcí podporují progresi hormonálně závislých i nezávislých nádorových onemocnění, ovlivňují zánětlivé reakce a další dráhy spojené se steroidy a prostaglandiny (Basu, 2010; Penning et al., 2008). Nadměrná exprese AKR1C3 byla nalezena u řady nádorových onemocnění, včetně karcinomu prostaty, prsu, akutní myeloidní leukémie (AML), NSCLC, a její upregulace koreluje s invazivitou a agresivitou (Birtwistle et al., 2009; Li et al., 2024; Oduwole et al., 2004; Stanbrough et al., 2006). Prostřednictvím své role v metabolismu xenobiotických sloučenin zprostředkovává AKR1C3 inaktivaci léčiv DOX, DAUN, oracinu, naloxonu (Bains et al., 2010; Matsunaga et al., 2006; Novotna et al., 2008). Je spojen s rizikem karcinomu plic konvertováním PAH, konkrétně *trans*-dihydrodiolů na odpovídající *o*-chinony (Lan et al., 2004). Navíc AKR1C3 je zapojen v rezistenci vůči derivátu cisplatiny, metotrexátu, vinkristinu, irinotekanu, abirateronu či enzalutamidu, která je založena pravděpodobně na odlišném mechanismu, protože tyto látky nejsou prokázány substráty AKR1C3 (Bortolozzi et al., 2018; Liu et al., 2017; Liu et al., 2015; Matsunaga et al., 2013; Matsunaga et al., 2020; Zhao et al., 2014). Jeho enzymatická aktivita je také využívána v selektivní aktivaci proléčiv (např. OBI-3424) (Evans et al., 2019).

AKR7A2 (*aflatoxinreduktáza*) je členem rodiny AKR7, která na rozdíl od monomerních enzymů rodiny AKR1 tvoří funkční dimery. AKR7A2 je zapojen v metabolismu  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA). Má vysokou afinitu a katalytickou účinnost pro sukcinát semialdehyd, který je metabolitem neurotransmiteru GABA. Produktem této reakce je  $\gamma$ -hydroxybutyrát (GHB) (Barski et al., 2008; Lyon et al., 2007).

AKR7A2 je široce distribuován v extrahepatálních tkáních, např. v ledvinách, slinivce břišní, tenkém střevě, kosterním svalu, myokardu a mozku (Ireland et al., 1998). Hladiny exprese AKR7A2 jsou spojeny například s hepatocelulárním karcinomem či neurodegenerativními onemocněními (Dai et al., 2021; Picklo et al., 2001). AKR7A2 se účastní buněčných detoxikačních drah a obrany proti ROS prostřednictvím metabolismu toxických aldehydů odvozených od peroxidace lipidů a interakcí s jinými proteiny reagujícími na stres, jako je cytoglobin (Li et al., 2016; Quinones-Lombrana et al., 2019). Metabolizuje širokou škálu endogenních a exogenních sloučenin obsahujících karbonyl, včetně DOX a DAUN (Bains et al., 2010). Vykazuje aktivitu vůči benzaldehydu, hexanalu, *trans*-2-nonenalu či *trans*-mukonaldehydu. AKR7A2 má nízkou afinitu k akroleinu, avšak je schopen poměrně účinně katalyzovat jeho redukci. To naznačuje, že při vyšších koncentracích těchto aldehydů může AKR7A2 hrát významnou roli při jejich detoxikaci (Li et al., 2012).

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo studium potenciálního inhibičního účinku vybraných inhibitorů BTK na aktivitu CRE, které se podílejí na metabolismu DAUN a zkoumání vlivu jejich kombinace s DAUN na senzitivitu nádorových buněk.

Jednotlivé dílčí cíle zahrnují:

1. Screening schopnosti vybraných BTKi inhibovat biotransformaci DAUN zprostředkovanou vybranými rekombinantními CRE;
2. Stanovení  $IC_{50}$  a inhibiční konstanty ( $K_i$ ) s cílem charakterizovat jejich vliv na konverzi DAUN;
3. Určení typu inhibice pomocí Michaelise a Mentenové a Lineweaver-Burkových grafů;
4. Ověření inhibičního účinku vybraných BTKi v *in vitro* experimentech na úrovni nádorové buněčné linie exprimující studované CRE;
5. Studium a analýza účinku kombinace DAUN s vybranými BTKi v experimentech na úrovni nádorových buněčných linií s tranzientní či endogenní expresí studovaných CRE;
6. Stanovení změn v expresi CRE po expozici BTKi;
7. Studium účinku vybraných BTKi na aktivitu lékových efluxních transportérů pomocí akumulčních metod s využitím nádorových buněčných linií.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Chemikálie a reagensie

BTKi byly zakoupeny od společnosti MedChemExpress LLC (Monmouth Junction, NJ, USA). Nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (NADP<sup>+</sup>), glukóza-6-fosfát, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Roche), fetální hovězí sérum (FBS) a rozpouštědla pro ultra účinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC) byly získány od společnosti Merck (Praha, Česká republika).

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid) byl zakoupen od společnosti Merck (St. Louis, MO, USA). XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) a fenazin methosulfát (PMS) byly zakoupeny od firmy BioTech (Praha, Česká republika). DAUN dodala společnost SelleckChem (Houston, TX, USA). Daunorubicinol (DAUN-OL), C13-hydroxymetabolit DAUN, byl získán od Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Kanada). Transfekční činidlo JetPrime (Polyplus Transfection, Illkirch, Francie) dodala společnost VWR International Ltd. (Radnor, PA, USA). Činidla pro buněčné kultury byla získána od společností Lonza (Walkersville, MD, USA) a Merck (St. Louis, MO, USA). Roztok TRIreagent byl zakoupen od společnosti Molecular Research Center Inc. (Cincinnati, OH, USA). Soupravu pro extrakci RNA dodala společnost Zymo Research (Irvine, CA, USA). Primery specifické pro AKR1C3 (Forward primer: 5'-GCCAGGTGAGGAACTTTTCAC-3', Reverse primer: 5'-AGTTTGACACCCCAATGGAC-3') a oligo-dT byly zakoupeny od společnosti Genери Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Pufr ProtoScript II, dithiothreitol (DTT), směs dNTP a reverzní transkriptáza ProtoScript II byly získány z New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). Směs qPCR SG byla pořízena od Institutu aplikovaných biotechnologií (Praha, Česká republika).

### 4.2 Stanovení metabolismu DAUN rekombinantními CRE

Lidské rekombinantní CRE (CBR1, AKR1A1, 1B1, 1B10, 7A2 a 1C3) byly produkovány v expresním systému *Escherichia coli* (E.coli) BL21(DE3) (Skarydova et al., 2014) a purifikovány pomocí NGC chromatografického systému vybaveného 1 ml kolonou HisTrap FF (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) (Novotna et al., 2018b).

Rekombinantní CRE byly použity k testování potenciálu BTKi (ACA, IBR, TIR, ZAN) inhibovat konverzi DAUN na DAUN-OL. Reakce byly prováděny v 0,1 M pufru fosforečnanu sodného (pH 7,4) obsahujícím NADPH regenerační systém (2,54 mM NADP<sup>+</sup>, 19,72 mM glukóza-6-fosfát, 10 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,88 U glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza), enzym (1 µg AKR1A1, 5 µg 1B1, 5 µg 1B10, 1,5 µg 1C3 nebo 0,2 µg CBR1) a BTKi (10 a 50 µM) nebo dimethylsulfoxidu (DMSO) (vehikulum). Po 10 min preinkubace byly enzymatické reakce zahájeny přidáním DAUN (500 µM) a inkubovány při 37 °C. Po 30 min byla každá reakce zastavena 300 µl methanolu. Vzorky se nechaly vysrážet při 4 °C po dobu 1 h, odstředily (9050 x g, 10 min), přefiltrovaly přes 0,2 µm PTFE membránu, a nakonec byly analyzovány pomocí UHPLC podle dříve popsáných metod (Novotna et al., 2018b).

Hodnota IC<sub>50</sub> byla stanovena pomocí různých koncentrací BTKi (0,1–100 µM). Pro stanovení hodnoty K<sub>i</sub> a typu inhibice bylo inkubováno 1,5 µg rekombinantního AKR1C3 s BTKi (1–10 µM) nebo DMSO a různé koncentrace DAUN (200–2000 µM). Kinetické parametry Michaelise a Mentenové byly vypočteny a transformovány do Lineweaver-Burkova grafu pomocí GraphPad Prism. K identifikaci těsné vazby BTKi byly stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub> BTKi (0,01–50 µM) při různých koncentracích AKR1C3 (1,35, 0,81, 0,40 a 0,13 µM) a přizpůsobeny Morrisonově kvadratické rovnici, implementované v programu GraphPad Prism (K<sub>m</sub> = 387,2 ± 36,01 µM), pro kvantifikaci zdánlivých hodnot K<sub>i</sub> (K<sub>i</sub><sup>app</sup>). Detekce metabolitů byly provedeny pomocí UHPLC podle dříve popsáných metod (Novotna et al., 2018b).

### **4.3 Kvantifikace hlavního metabolitu DAUN-OLu pomocí UHPLC**

Množství DAUN-OLu bylo stanoveno pomocí chromatografického systému UHPLC Agilent 1290 Series vybaveného kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 × 50 mm, 1,8 µm) s inline filtrem Infinity 1290 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Pro analýzu UHPLC bylo použito následující nastavení: fluorescenční detekce (excitační a emisní vlnové délky 480 a 560 nm), izokratická eluce 0,7 ml/min, mobilní fáze: 0,1% kyselina mravenčí/acetonitril v poměru 74:26 (v/v).

## 4.4 Buněčné kultury

Buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu HCT116 a buňky lidské kostní dřeně AML KG1 $\alpha$  byly získány z European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK). Buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic A549 a buněčná linie lidského karcinomu jater HepG2 byly získány z American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Buňky A549, HCT116 a HepG2 byly udržovány v DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) doplněném 10 % FBS a kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Leukemické buňky KG1 $\alpha$  byly udržovány v IDMEM (Iscove's DMEM) doplněném 20 % teplem inaktivovaným FBS a 2 mM L-glutaminem. V experimentech byly použity buňky v pasážích 10–25. Všechny kultivace a experimenty byly prováděny v médiu bez antibiotik a pravidelně testovány na mykoplazmatické infekce. BTKi byly rozpuštěny v DMSO. Koncentrace rozpouštědla nepřesáhla 0,5 % (v/v) a neměla žádný nebo zanedbatelný účinek na buněčné linie.

## 4.5 Přejídná transfekce buněk HCT116

Pro přejídnou expresi lidského rekombinantního AKR1C3 byl vytvořen a purifikován vektor kódující AKR1C3 (pCI\_AKR1C3) a pro účely kontrolního měření i prázdný vektor pCI (pCI\_EV) z *E. coli* HB101, jak bylo popsáno dříve (Hofman et al., 2014).

Buňky HCT116 (přibližně  $30 \times 10^4$  buněk/jamku) byly nasazeny na 24-jamkové destičky a kultivovány po dobu 24 h za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Transfekční směs (0,25  $\mu$ g plazmidu a 0,75  $\mu$ l transfekčního činidla jetPRIME® v jetPRIME pufru) byla připravena podle protokolu výrobce (Polyplus Transfection, Illkirch, Francie) a inkubována po dobu 10 min při pokojové teplotě. Poté bylo vyměněno médium a k buňkám byla přidána transfekční směs (37,5  $\mu$ l), která byla inkubována po dobu 24 h za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Expres rekombinantního AKR1C3 byla ověřena pomocí western blotu podle dříve popsanych metod (Sorf et al., 2019).

## 4.6 Inhibiční studie

Po 24h inkubaci bylo transfekovaným buňkám HCT116 odebráno médium a nahrazeno inkubační směsí obsahující DAUN (1  $\mu$ M) a zvyšující se koncentrace BTKi



(1, 5, 10 a 50  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO. Buňky byly inkubovány (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) po dobu 2 a 4 h (TIR, ZAN) nebo po dobu 2,5 a 5 h (ACA, IBR). Po uplynutí stanovených časových intervalů bylo médium odebráno a buňky byly lyzovány v 200  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru (25 mM Tris, 150 mM NaCl a 1 % Triton X-100, pH 7,8) po dobu 10 min při pokojové teplotě. Odebrané médium bylo kombinováno s buněčným lyzátem pro další extrakci a analýzu metabolitů. DAUN a DAUN-OL byly dvakrát extrahovány 1 ml ethylacetátu a organická fáze byla odpařena ve vakuu. Zbytky byly rozpuštěny ve 40  $\mu\text{l}$  mobilní fáze a měřeny pomocí UHPLC.

## 4.7 Kombinační studie

Synergický účinek BTKi na cytotoxicitu DAUN byl hodnocen v transfekovaných buňkách HCT116 (ACA, IBR, TIR, ZAN) a buňkách A549 (ACA, IBR, ZAN). 24 h před experimentem byly transfekované buňky HCT116 (přibližně  $8 \times 10^3$  buněk/jamku) nasazeny do 96-jamkových destiček (ACA, IBR a TIR). V případě ZAN byly buňky HCT116 transfekovány stejným postupem, jak je popsáno výše, ale optimalizovaným pro 96-jamkovou destičku. Buňky HCT116 (přibližně  $8 \times 10^3$  buněk/jamku) byly nasazeny a kultivovány po dobu 24 h (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). Následující den byly buňky transfekovány pomocí pCI\_AKR1C3 nebo pCI\_EV podle protokolu výrobce, jak je popsáno výše, a inkubovány dalších 24 h za stejných podmínek. V den experimentu bylo kultivační médium nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím rostoucí koncentrace DAUN (0,01-10  $\mu\text{M}$ ) s BTKi (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO. Po 72h inkubaci (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) byla hodnocena životaschopnost buněk pomocí MTT (ACA, IBR, TIR) nebo XTT testu (ZAN).

Buňky A549 (přibližně  $5 \times 10^3$  buněk/jamku) byly nasazeny do 96-jamkových destiček, kultivovány za standardních podmínek (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) po dobu 24 h a poté přímo použity pro experimenty. Následující den bylo médium nahrazeno inkubační směsí obsahující DAUN (0,01–1  $\mu\text{M}$ ) a BTKi (1 a 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO. Po přidání inkubační směsi byly buňky inkubovány po dobu 72 h (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ), poté byla hodnocena životaschopnost buněk pomocí MTT (ACA, IBR, TIR) nebo XTT testu (ZAN). Pomocí Chou–Talalayovy metody byla všechna data podrobena kvantitativní analýze vztahu dávka/účinek (Chou, 2006, 2010). Kombinačním studiím předcházelo stanovení cytotoxicity BTKi (0,1–50  $\mu\text{M}$ ) pro obě buněčné linie (data neuvedena).

### **MTT cytotoxický test**

Prášek MTT (3 mg/ml) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (PBS) a 50  $\mu$ l tohoto roztoku bylo přidáno k buňkám a inkubováno po dobu 10-15 min (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po tomto časovém intervalu byl roztok odstraněn, buňky byly lyzovány v DMSO a absorbance (570 a 690 nm) byla změřena pomocí mikrodestičkové čtečky (Infinite M200; Tecan, Salzburg, Rakousko).

### **XTT cytotoxický test**

Roztok XTT připravený z prášku XTT (1 mg/ml) a PMS (3 mg/ml) v PBS byl přidán k buňkám a inkubován po dobu 1,5 h (HCT116, A549, HepG2) nebo 4 h (KG1 $\alpha$ ). Absorbance byla měřena při 450 a 690 nm pomocí mikrodestičkové čtečky (Infinite M200; Tecan, Salzburg, Rakousko).

## **4.8 Indukční studie**

Před indukčními studiemi byla testována cytotoxicita BTKi (TIR, ZAN) pro všechny buněčné linie (HepG2, KG1 $\alpha$ ) ke stanovení relativně netoxické koncentrace vhodné pro následné experimenty. Buňky HepG2 (přibližně  $18 \times 10^3$  buněk/jamku) a KG1 $\alpha$  (přibližně  $25 \times 10^3$  buněk/jamku) byly nasazeny do 96-jamkových destiček. Buňky KG1 $\alpha$  byly ošetřeny BTKi (0,1–50  $\mu$ M) nebo DMSO ve stejný den, zatímco buňky HepG2 po 24h kultivaci. Po ošetření následovala 48h inkubace za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), po které byl změřen účinek BTKi na životaschopnost nádorových buněk pomocí MTT (TIR) nebo XTT testu (ZAN).

V rámci indukčních studií byly v případě ZAN buňky HepG2 (přibližně  $20 \times 10^4$  buněk/jamku) a KG1 $\alpha$  (přibližně  $35 \times 10^4$  buněk/jamku) nasazeny do 48-jamkových destiček a kultivovány po dobu 24 h za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Zatímco buňky KG1 $\alpha$  byly okamžitě ošetřeny ZAN (0,5  $\mu$ M) nebo DMSO, buňky HepG2 byly ošetřeny až po 24h kultivaci. V případě TIR byly buňky HepG2 (přibližně  $70 \times 10^4$  buněk/jamku) nasazeny do 12-jamkových destiček a kultivovány po dobu 24 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Poté byly buňky ošetřeny TIR (5  $\mu$ M) nebo DMSO a inkubovány 24 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po 24 a 48h (ZAN) nebo 24h (TIR) inkubaci bylo médium odstraněno, buňky byly lyzovány v TRI Reagent a celková RNA byla izolována pomocí Zymo Research Direct-zolTM RNA Miniprep kit a transkribována do cDNA podle pokynů výrobce (ProtoScript II Reverse Transcriptase, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Hladiny mRNA AKR1C3 byly kvantifikovány pomocí kvantitativní

real-time PCR (qRT-PCR). PCR obsahovala 1x koncentrovanou směs XCEED qPCR SG Mix (ZAN) nebo 1x koncentrovanou směs GoTaq® qPCR Master Mix (TIR), primery specifické pro AKR1C3 (1  $\mu$ M) a 20 ng cDNA (ZAN) nebo 40 ng cDNA (TIR). qPCR byla provedena pomocí QuantStudio 6flex (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nastaveného na následující podmínky: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 10 min, následovaná 40 cykly při 95 °C po dobu 15 s a 65 °C po dobu 1 min. Absolutní kvantifikace exprese AKR1C3 byla dosažena porovnáním vzorků se současně amplifikovaným standardem AKR1C3, který byl generován podle předchozího popisu (Hofman et al., 2014).

## 4.9 Akumulační studie

Ke studiu vlivu BTKi (TIR, ZAN) na akumulaci DAUN byly buňky A549 (přibližně  $35 \times 10^4$  buněk/jamku) a KG1 $\alpha$  (přibližně  $50 \times 10^4$  buněk/jamku) nasazeny do 12-jamkových a 24-jamkových destiček. Po 24 h byly buňky A549 inkubovány s BTKi (1, 5, 10 a 25  $\mu$ M), LY335979 (2  $\mu$ M), Ko143 (2  $\mu$ M) nebo MK571 (25  $\mu$ M) (selektivní inhibitory ABC transportérů ABCB1, G2 a C1), zatímco buňky KG1 $\alpha$  byly inkubovány ihned po nasazení. Po 15 min inkubace byl k buňkám přidán DAUN (1  $\mu$ M) a následovala 1 h inkubace. Poté byly buňky dvakrát promyty studeným PBS a použity pro další analýzu pomocí průtokového cytometru Sony SA3800 Spectral Cell Analyser (Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA) s laserem nastaveným na 488 nm. K vyhodnocení dat byl použit software SA3800 (Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA).

## 4.10 Statistická analýza

Všechna data byla zpracována a parametry byly vypočteny pomocí programu GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistická analýza dat byla provedena pomocí jednosměrné analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Dunnettovým post hoc testem, dvousměrného ANOVA testu s následným Bonferroniho post hoc testem nebo nepárovým t-testem s Welchovou korekcí, jak je uvedeno v legendách příslušných obrázků. Statistická významnost byla stanovena na hodnoty  $p < 0,05$ . V případě kombinačních studií byly pomocí Chou-Talalayovy metody, implementované v programu CompuSyn ver. 1.0 (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA), vyhodnoceny kombinační indexy (CI) k rozlišení mezi synergismem ( $CI < 0,9$ ), aditivitou ( $CI = 0,9-1,1$ ) a antagonismem ( $CI > 1,1$ ).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Akalabrutinib a ibrutinib a jejich vliv na aktivitu reduktáz přeměňujících DAUN na DAUN-OL

Výsledky uvedené v následujících podkapitolách popisují schopnost ACA a IBR inhibovat reduktázy z nadrodin AKR a SDR, které se významně podílí na přeměně DAUN na DAUN-OL. Redukce způsobuje deaktivaci cytostatika a byla prokázána jak na úrovni rekombinantních proteinů, tak i vybraných buněčných linií. Výsledky jsou součástí publikace Morell et al. (2021), která byla publikována v časopise Cancers a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

#### 5.1.1 ACA a IBR inhibují redukcí DAUN zprostředkovanou reduktázami z nadrodin AKR a SDR

Prvním krokem bylo provedení screeningu účinku ACA a IBR na různé CRE (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3, 7A2 a CBR1), u kterých je prokázáno, že jsou zapojeny do metabolismu ANT. Za tímto účelem byla hodnocena enzymatická aktivita různých rekombinantních CRE na DAUN při dvou koncentracích BTKi (10 a 50  $\mu\text{M}$ ) (tab. 1).

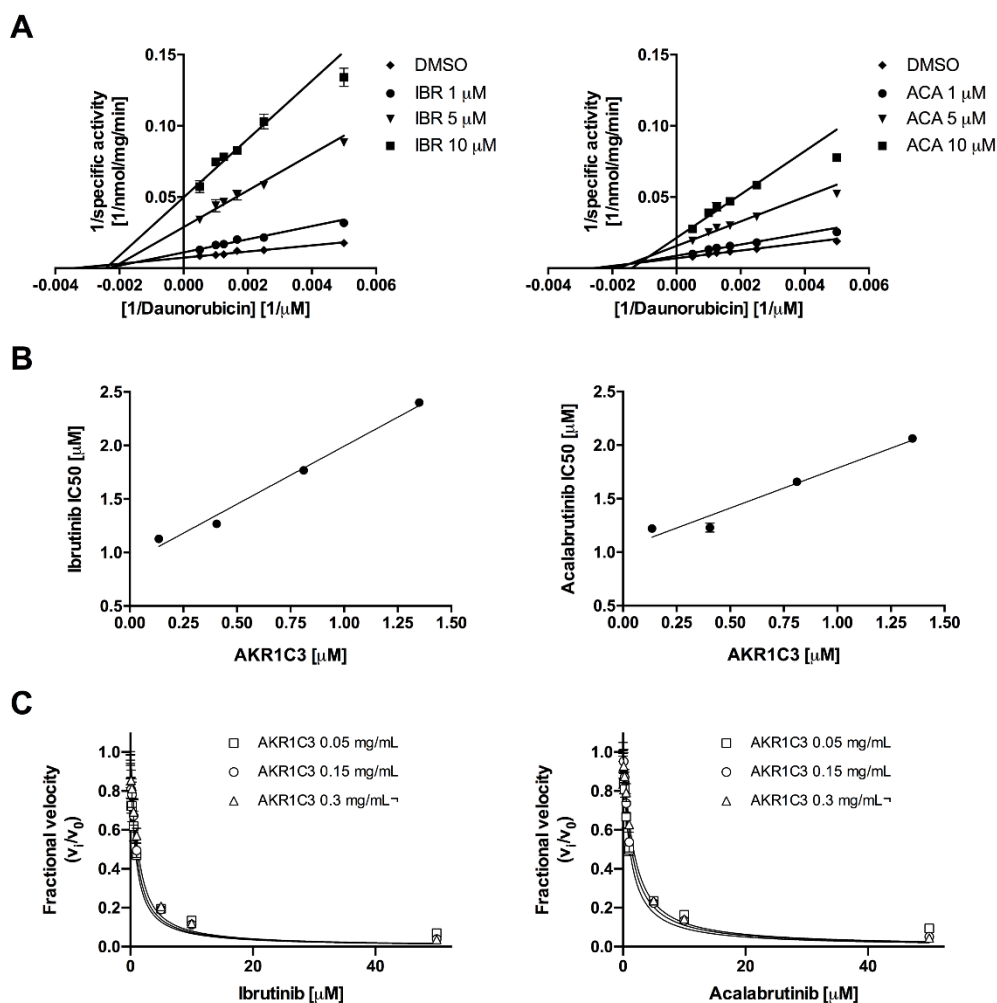
Tab. 1 Screening inhibičního účinku BTKi na redukcí DAUN zprostředkovanou různými CRE

Enzym	ACA 10 $\mu\text{M}$ (% inhibice)	ACA 50 $\mu\text{M}$ (% inhibice)	IBR 10 $\mu\text{M}$ (% inhibice)	IBR 50 $\mu\text{M}$ (% inhibice)
<b>AKR1A1</b>	-1,68 $\pm$ 3,93	-0,93 $\pm$ 2,37	-3,60 $\pm$ 2,63	-7,00 $\pm$ 4,39
<b>AKR1B1</b>	1,94 $\pm$ 3,37	1,56 $\pm$ 2,79	3,77 $\pm$ 0,35	7,60 $\pm$ 5,06
<b>AKR1B10</b>	1,10 $\pm$ 1,49	9,36 $\pm$ 2,53	48,18 $\pm$ 2,10	74,97 $\pm$ 0,87
<b>AKR1C3</b>	89,55 $\pm$ 4,00	96,28 $\pm$ 1,58	92,17 $\pm$ 3,43	96,41 $\pm$ 1,48
<b>AKR7A2</b>	0,89 $\pm$ 21,26	4,06 $\pm$ 13,07	1,27 $\pm$ 4,61	-8,18 $\pm$ 5,13
<b>CBR1</b>	1,10 $\pm$ 1,27	1,43 $\pm$ 1,93	0,32 $\pm$ 1,85	0,66 $\pm$ 2,28

Hodnoty jsou vyjádřeny rozsahem inhibice v procentech vzhledem ke kontrolnímu vzorku obsahujícímu DMSO místo testovaného inhibitoru ( $n = 3$ ; průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD)).

Ze všech studovaných enzymů byl pouze AKR1C3 významně, a navíc i velmi podobně inhibován oběma inhibitory BTK. Koncentrace 10 a 50  $\mu\text{M}$  ACA a IBR snížily aktivitu AKR1C3 o  $89,55 \% \pm 4 \%$  a  $96,28 \% \pm 1,58 \%$  (ACA),  $92,17 \% \pm 3,43 \%$  a  $96,41 \% \pm 1,48 \%$  (IBR). Významnější inhibice byla zaznamenána ještě u AKR1B10, kdy 10 a 50  $\mu\text{M}$  IBR snížily aktivitu o  $48,18 \% \pm 2,10 \%$  a  $74,97 \% \pm 0,87 \%$ , zatímco nejvyšší koncentrace ACA (50  $\mu\text{M}$ ) inhibovala aktivitu AKR1B10 pouze o  $9,36 \% \pm 2,53 \%$ . Ostatní studované reductázy byly inhibovány ACA i IBR nevýznamně.

Dále byl analyzován typ interakce mezi BTKi a AKR1C3. Za tímto účelem byla rekombinantní AKR1C3 inkubována se zvyšujícími se koncentracemi DAUN a s BTKi ve třech koncentracích (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO. Kinetika enzymu byla vyhodnocena pomocí Lineweaver-Burkova dvojitého reciprokého grafu (obr. 9A), který ukázal nekompetitivní/smíšený fenotyp pro obě sloučeniny. Tento způsob inhibice spolu s lineární závislostí hodnoty  $\text{IC}_{50}$  na koncentraci enzymu (obr. 1B) naznačují, že tyto BTKi mohou vykazovat těsnou vazebnou interakci s AKR1C3. Proto byla použita Morrisonova kvadratická rovnice pro těsně se vážající inhibitory (Copeland, 2013) s různými množstvími AKR1C3 (obr. 9C) k výpočtu zdánlivých hodnot  $K_i$  ( $K_i^{\text{app}}$ ) (tab. 2). Obě sloučeniny vykazovaly relativně konstantní hodnoty  $K_i^{\text{app}}$  v rozmezí nM koncentrací.



Obr. 9 Analýza enzymové kinetiky BTKi na redukci DAUN zprostředkovanou rekombinantním AKR1C3. (A) Lineweaver-Burkův graf porovnávající inverzní aktivitu specifickou pro AKR1C3 v přítomnosti DMSO nebo zvyšujících se koncentrací (1, 5 a 10  $\mu$ M) BTKi v závislosti na koncentraci DAUN ( $n = 3$ ; průměr  $\pm$  SD). (B) Naměřené hodnoty IC<sub>50</sub> BTKi v závislosti na koncentraci AKR1C3 ( $n = 3$ ; průměr  $\pm$  SD). (C) Graf koncentrace-odezva BTKi pro aktivitu DAUN katalyzovanou AKR1C3 přizpůsobený Morrisonově kvadratické rovnici. Enzymatická aktivita je vyjádřena jako poměr inhibované a neinhibované reakční rychlosti ( $n = 6$ ; průměr  $\pm$  SD).

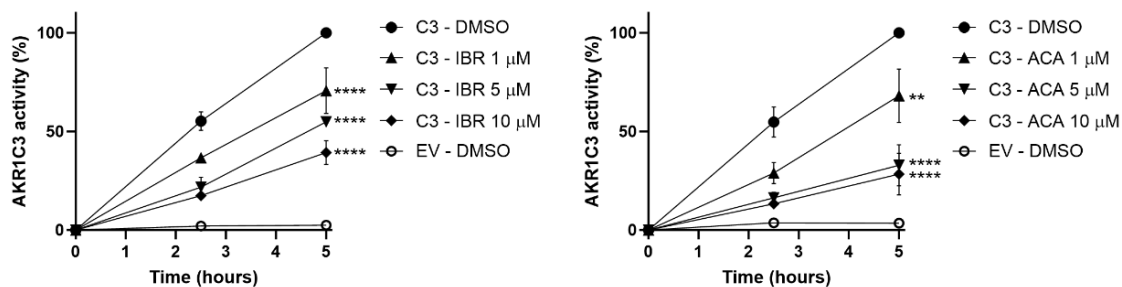
Tab. 2 Hodnoty  $K_i^{app}$  pro BTKi získané z Morrisonovy rovnice pro těsně se vázající inhibitory

BTKi	AKR1C3 (mg/ml)	AKR1C3 ( $\mu$ M)	$K_i^{app}$ ( $\mu$ M)	95% CI ( $\mu$ M)	$R^2$
IBR	0,005	0,135	0,312	0,242 – 0,382	0,881
	0,015	0,405	0,332	0,268 – 0,396	0,944
	0,03	0,811	0,354	0,278 – 0,431	0,951
ACA	0,005	0,135	0,451	0,356 – 0,546	0,946
	0,015	0,405	0,521	0,454 – 0,589	0,983
	0,03	0,811	0,566	0,496 – 0,636	0,987

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD z nejméně tří nezávislých experimentů. 95% interval spolehlivosti (95% CI).

### 5.1.2 Inhibitory BTK působí proti rezistenci léčby DAUN prostřednictvím inhibice AKR1C3 v buněčné linii HCT116

Pro zhodnocení účinnosti ACA a IBR při potlačování intracelulárního metabolismu DAUN, byla vytvořena buněčná linie HCT116 s přechodnou nadměrnou expresí enzymu AKR1C3 (HCT116-AKR1C3) a kontrolní buňky transfekované prázdným vektorem (HCT116-EV). Buněčná linie HCT116 byla vybrána kvůli zanedbatelné endogenní expresi AKR1C3 (Hofman et al., 2014). Buňky HCT116-AKR1C3 byly ošetřeny zvyšujícími se koncentracemi obou BTKi (1, 5 a 10  $\mu$ M) v kombinaci s DAUN (1  $\mu$ M) po dobu 2,5 a 5 h. Obě sloučeniny významně inhibovaly redukci DAUN na DAUN-OL v závislosti na čase a dávce (obr. 10).



Obr. 10 BTKi inhibují metabolismus DAUN zprostředkovaný AKR1C3. Transfekované buňky HCT116 byly inkubovány s 1  $\mu\text{M}$  DAUN v kombinaci s DMSO nebo BTKi (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) po dobu 2,5 a 5 h. Buněčné extrakty byly dále analyzovány pomocí UHPLC. Graf znázorňuje časovou závislost aktivity AKR1C3, přičemž množství DAUN-OLu vzniklé po 5 h v buňkách HCT116-AKR1C3 se považuje za 100 % a v buňkách HCT116-EV za 0 %. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů provedených ve dvou opakováních ( $n = 6$ ). Údaje byly podrobeny statistické analýze pomocí dvousměrného ANOVA testu s následným Bonferroniho post hoc testem. \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vzhledem k DMSO.

Dále bylo analyzováno, zda snížená inaktivace DAUN moduluje rezistenci na ANT v transfekovaných buňkách HCT116. Za tímto účelem byly u buněk HCT116-AKR1C3 a HCT116-EV analyzovány  $\text{IC}_{50}$  DAUN v kombinaci s DMSO nebo stejnými koncentracemi BTKi (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) (tab. 3 a obr. 11A, B, C, D), které dříve vykazovaly inhibiční účinek na metabolismus DAUN. Expres AKR1C3 v buňkách HCT116-AKR1C3 poskytovala větší odolnost vůči cytotoxicitě DAUN, přičemž hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro DAUN byla přibližně dvakrát vyšší než u buněk HCT116-EV. Tyto údaje ukazují, že zvýšená exprese AKR1C3 chrání nádorové buňky před toxicitou DAUN. Rezistence k DAUN u HCT116-AKR1C3 však byla překonána v závislosti na dávce ACA a IBR, přičemž došlo k významným posunům hodnot  $\text{IC}_{50}$  pro 5 a 10  $\mu\text{M}$  obou BTKi. U buněk HCT116-EV nebyly pozorovány žádné významné změny hodnot  $\text{IC}_{50}$  DAUN, což potvrzuje rozhodující úlohu interakce BTKi-AKR1C3 při účinku zvrácení rezistence vůči DAUN. Pomocí Chou-Talalayovy metody byly kvantifikovány CI a vytvořeny grafy závislosti CI na podílu ovlivněných buněk (FA). Buňky, které přežily léčbu, byly považovány za nezasažené. Kombinace DAUN s oběma BTKi (5 a 10  $\mu\text{M}$ ) vykazovala hodnoty CI v rozmezí od synergismu (0,3-0,7) až po silný synergismus (0,1-0,3) u buněk HCT116-AKR1C3. U buněk HCT116-EV byly hodnoty CI pro stejné kombinace

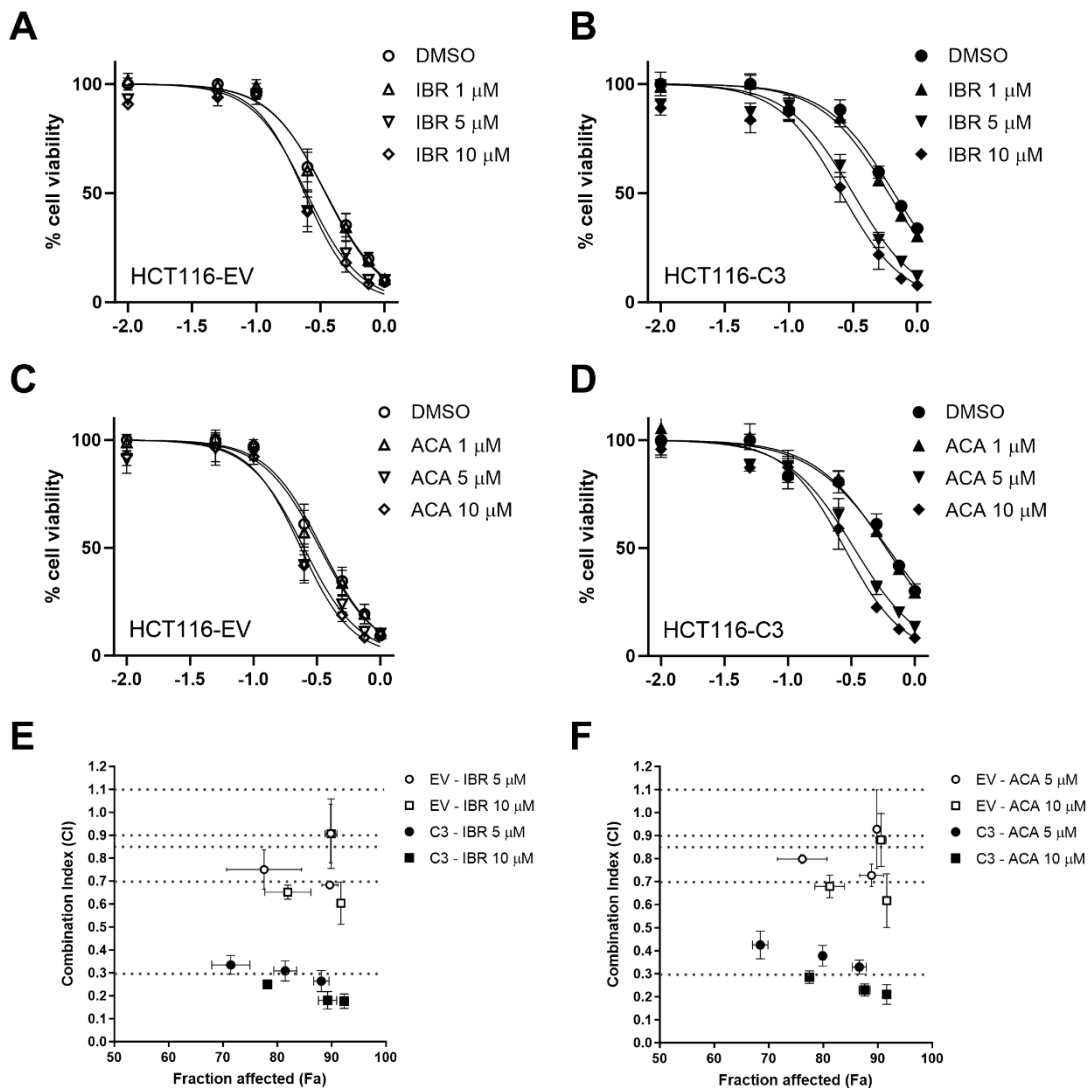


mnohem vyšší a vykazovaly rozmezí od mírného synergismu (0,7-0,85) až po téměř aditivitu (0,9-1,1). Mírný synergismus pozorovaný u HTC116-EV může souviset s dalšími cíli BTKi, ale bez dostatečného příspěvku k významnému zvýšení cytotoxicity DAUN (obr. 11E, F).

Tab. 3 Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  kombinace DAUN s BTKi

BTKi	Koncentrace ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ (95% CI) [ $\mu$ M]	
		HCT116-EV	HCT116-C3
IBR	0	0,35 (0,33-0,37)	0,66 (0,62-0,70)
	1	0,35 (0,32-0,37)	0,59 (0,56-0,63)
	5	0,25 (0,22-0,27)	0,31 (0,29-0,34) **
	10	0,24 (0,22-0,26)	0,25 (0,23-0,28) **
ACA	0	0,34 (0,32-0,37)	0,61 (0,57-0,66)
	1	0,33 (0,31-0,36)	0,59 (0,55-0,64)
	5	0,25 (0,23-0,27)	0,33 (0,31-0,36) **
	10	0,23 (0,22-0,26)	0,28 (0,26-0,30) **

*Hodnoty  $IC_{50}$  byly podrobeny statistické analýze pomocí Studentova t-testu. \*\* $p < 0.001$  a jsou vyjádřeny jako průměr dvou nezávislých experimentů provedených ve třech opakováních.*



Obr. 11 BTKi působí proti rezistenci k léčbě DAUN zprostředkované AKRIC3 u transientně transfekovaných buněk HCT116. (A, B, C, D) HCT116-EV a HCT116-AKRIC3 byly vystaveny působení DMSO nebo různých dávek BTKi (1, 5 a 10 μM) v kombinaci s DAUN (0,01-1 μM) a inkubovány po dobu 72 h. Životaschopnost buněk byla hodnocena pomocí MTT testu. Grafy představují srovnání křivek závislosti dávky na odpovědi pro životaschopnost (%) každé buněčné linie při různých kombinacích (n = 6, průměr ± SD). (E, F) Grafy CI vs. Fa získané po Chou-Talalayově analýze kombinované léčby zahrnující BTKi (5 a 10 μM) s DAUN (0,1-1 μM) (n = 6, průměr ± SD). Přerušované čáry vymezují rozsahy CI pro silný synergismus (0,1-0,3), synergismus (0,3-0,7), střední synergismus (0,7-0,85) a téměř aditivitu (0,9-1,1).

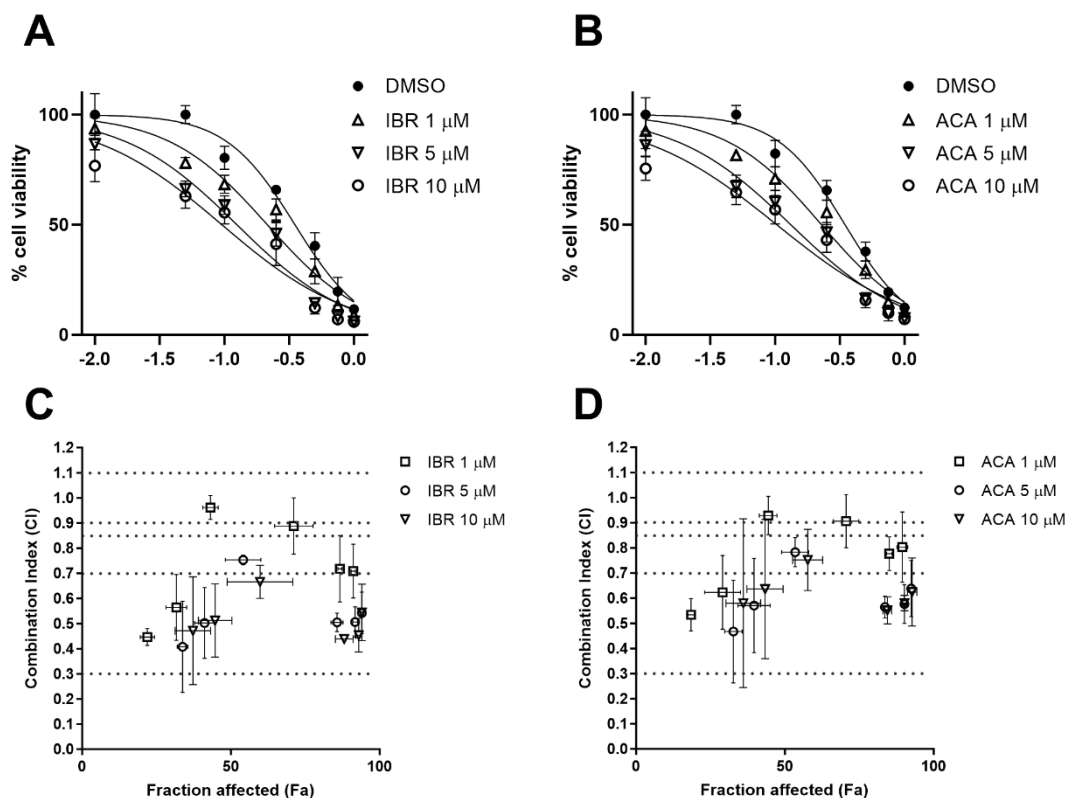
### 5.1.3 BTKi synergizují cytotoxicitu DAUN v nádorové buněčné linii A549

Po potvrzení synergického účinku kombinace léčiv na buněčné linii HCT116 tranzientně exprimující AKR1C3 byly následně provedeny kombinační studie na buněčné linii A549 s endogenní expresí AKR1C3 (Hofman et al., 2014). Opět byla hodnocena cytotoxicita DAUN v kombinaci se stejnými koncentracemi BTKi (obr. 12A, B). Podobně jako u buněk HCT116-AKR1C3 oba BTKi v kombinaci s DAUN vykazovaly významné posuny hodnot  $IC_{50}$  (tab. 4). Současně oba BTKi vykazovaly určitý stupeň cytotoxicity, který, přestože nesouvisí s metabolismem DAUN, může rovněž přispívat k významným posunům  $IC_{50}$  pozorovaným po kombinaci s DAUN. Pomocí Chou-Talalayovy metody byl zjištěn synergický účinek v závislosti na dávce BTKi (obr. 12C, D).

Tab. 4 Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  kombinace DAUN s BTKi

BTKi	Koncentrace ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ (95% CI) [ $\mu$ M]
IBR	0	0,35 (0,33-0,37)
	1	0,21 (0,19-0,23) **
	5	0,12 (0,11-0,14) ***
	10	0,09 (0,08-0,11) ***
ACA	0	0,35 (0,33-0,37)
	1	0,23 (0,21-0,25) **
	5	0,13 (0,12-0,15) ***
	10	0,10 (0,09-0,12) ***

Hodnoty  $IC_{50}$  byly podrobeny statistické analýze pomocí Studentova *t*-testu. \*\**p* < 0,001; \*\*\**p* < 0,0001 a jsou vyjádřeny jako průměr tří nezávislých experimentů provedených ve třech opakováních.



Obr. 12 BTKi synergizují cytotoxicitu DAUN v nádorových buňkách A549. (A, B) Buňky A549 byly inkubovány s DMSO nebo netoxickými dávkami BTKi (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) v kombinaci se zvyšujícími se koncentracemi DAUN po dobu 72 h, následně byl proveden MTT test pro stanovení životaschopnosti buněk. Grafy znázorňují srovnání křivek závislosti dávky na odpovědi životaschopnosti buněk A549 (%) při různých kombinacích ( $n = 9$ , průměr  $\pm$  SD). (C, D) Grafy CI vs. Fa získané po Chou-Talalayově analýze kombinované léčby zahrnující BTKi (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) s DAUN (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 6$ , průměr  $\pm$  SD). Přerušované čáry vymezují rozsahy CI pro silný synergismus (0,1-0,3), synergismus (0,3-0,7), střední synergismus (0,7-0,85) a téměř aditivitu (0,9-1,1).

## 5.2 Zanubrutinib a jeho inhibiční potenciál k reduktázám z nadrodin AKR a SDR

Následující podkapitoly obsahují výsledky popisující ZAN a jeho inhibiční potenciál k reduktázám z nadrodin AKR a SDR, které zprostředkovávají metabolismus DAUN na DAUN-OL. Výsledky prezentované v těchto podkapitolách jsou součástí publikace Čermáková et al. (2022), která byla publikována v časopise *Pharmaceutics* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

### 5.2.1 ZAN inhibuje redukci DAUN zprostředkovanou reduktázami z nadrodin AKR a SDR

Podobně jako v předchozí publikaci byl i zde nejprve proveden základní screening inhibiční aktivity ZAN na různé CRE (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1). Ze všech testovaných CRE vykazoval ZAN nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AKR1C3. V koncentraci 10 a 50  $\mu\text{M}$  snížil aktivitu AKR1C3 o  $79,08\% \pm 1,73\%$  a  $88,52\% \pm 2,18\%$  (tab. 5).

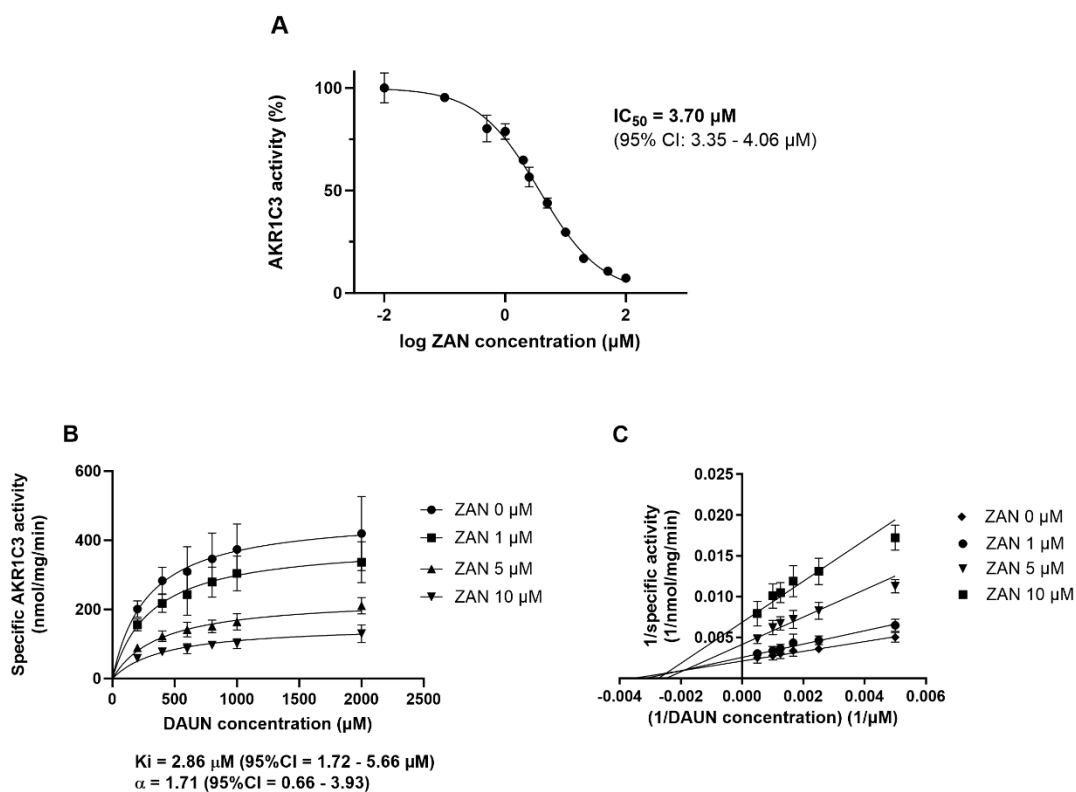
Tab. 5 Screening inhibičního účinku ZAN na redukci DAUN zprostředkovanou různými CRE

Enzym	ZAN 10 $\mu\text{M}$ (% inhibice)	ZAN 50 $\mu\text{M}$ (% inhibice)
<b>AKR1A1</b>	2,81 $\pm$ 0,08	5,56 $\pm$ 0,38
<b>AKR1B1</b>	53,33 $\pm$ 0,33	67,45 $\pm$ 0,01
<b>AKR1B10</b>	41,67 $\pm$ 0,03	74,83 $\pm$ 0,31
<b>AKR1C3</b>	79,08 $\pm$ 1,73	88,52 $\pm$ 2,18
<b>CBR1</b>	3,63 $\pm$ 4,69	4,68 $\pm$ 9,40

*Hodnoty jsou vyjádřeny rozsahem inhibice v procentech vzhledem ke kontrolnímu vzorku obsahujícímu DMSO místo testovaného inhibitoru (n = 3; průměr  $\pm$  SD).*

Nejsilněji inhibovaná rekombinantní reduktáza byla AKR1C3, a proto bylo dalším krokem kvantifikovat inhibiční účinek ZAN na rekombinantní AKR1C3 stanovením  $\text{IC}_{50}$ . Jak je patrné z  $\text{IC}_{50}$  (obr. 13A), ZAN interagoval s AKR1C3 a silně inhiboval

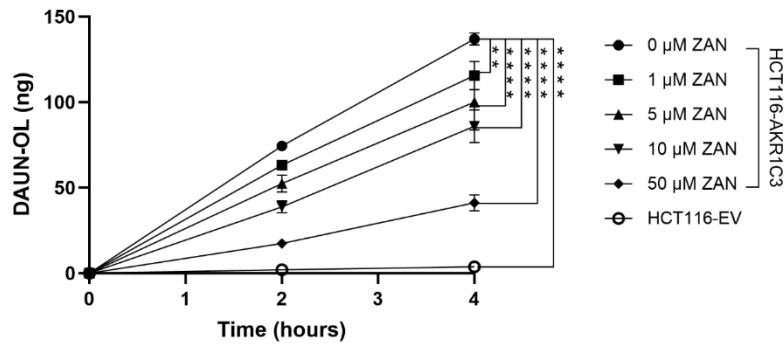
redukci DAUN na DAUN-OL v závislosti na dávce. Enzymová kinetika a Lineweaver-Burkuv dvojitý reciproční graf navíc poskytly důkaz o smíšeném typu inhibice ( $K_i = 2,9 \mu\text{M}$ ,  $\alpha > 1,0$ ) (obr. 13 B,C). Parametr  $\alpha > 1$  naznačuje, že se ZAN přednostně váže na volný enzym (Copeland, 2013).



Obr. 13 ZAN inhibuje redukcí DAUN katalyzovanou lidským rekombinantním AKR1C3. (A)  $\text{IC}_{50}$  inhibice AKR1C3. (B) Stanovení  $K_i$ . (C) Způsob inhibice graficky znázorněný pomocí Lineweaver-Burkova grafu. Všechny údaje jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD z nejméně tří nezávislých experimentů.

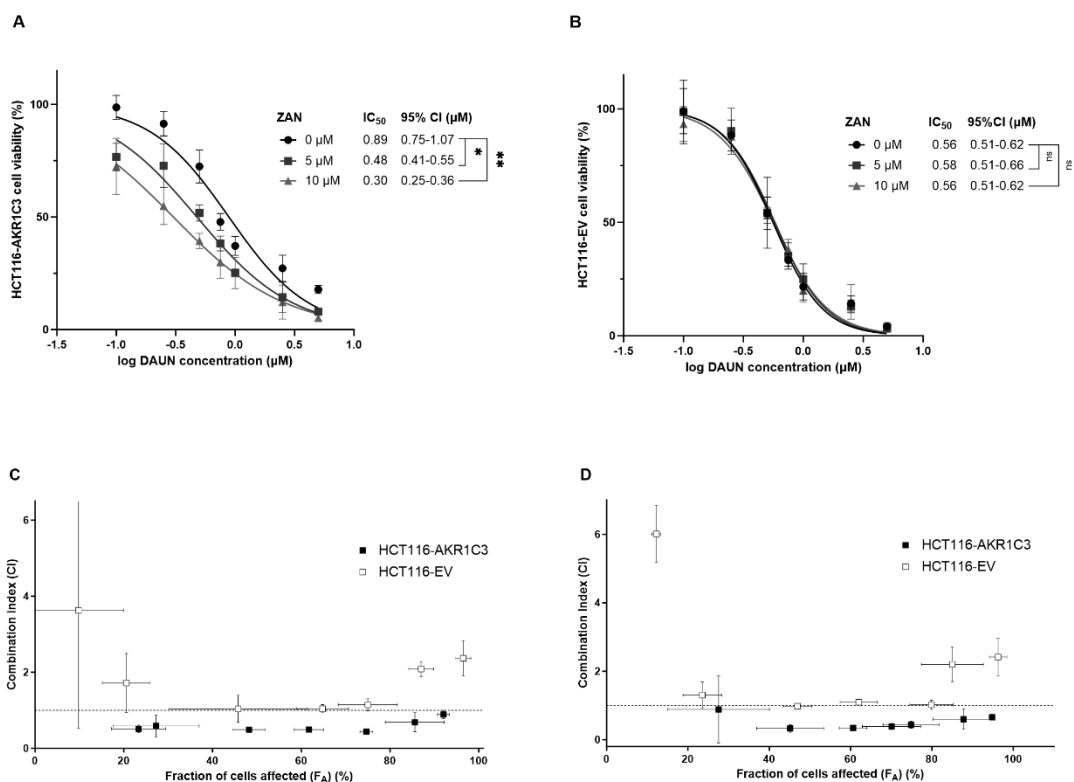
## 5.2.2 Vliv ZAN na rezistenci k léčbě DAUN v buněčné linii HCT116

Dále byl zkoumán vliv ZAN na metabolismus DAUN zprostředkovaný AKR1C3 v transfekovaných buňkách HCT116. Buňky byly ošetřeny DAUN (1  $\mu\text{M}$ ) a ZAN (1, 5, 10 a 50  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO v reakčním intervalu 2 a 4 h. Obrázek 14 ukazuje, že ZAN ve všech testovaných koncentracích významně inhiboval přeměnu DAUN na DAUN-OL v buňkách HCT116-AKR1C3.



Obr. 14 ZAN inhibuje metabolismus DAUN zprostředkovaný AKR1C3 v intaktních buňkách. Transfekované buňky HCT116 byly inkubovány s DAUN (1  $\mu$ M) v kombinaci se ZAN (1, 5, 10 a 50  $\mu$ M) nebo DMSO po dobu 2 a 4 h. Poté byl DAUN-OL extrahován a jeho množství bylo analyzováno pomocí UHPLC. Data byla vyhodnocena pomocí jednosměrného ANOVA testu, po němž následoval Dunnettův post hoc test. \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ve srovnání s kontrolní dávkou DMSO. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů.

Po potvrzení, že ZAN intracelulárně inhibuje AKR1C3, bylo analyzováno, zda snížení metabolismu DAUN úměrně zvyšuje jeho cytotoxicitu na buňky. I v tomto případě u buněk HCT116-AKR1C3 byla hodnota  $IC_{50}$  pro samotný DAUN téměř dvakrát vyšší než hodnota  $IC_{50}$  získaná z experimentů s buňkami HCT116-EV. Z posunů hodnot  $IC_{50}$  je patrné, že rezistence buněk HCT116-AKR1C3 vůči DAUN byla překonána po přidání ZAN (5 nebo 10  $\mu$ M) (obr. 15A). Při pokusech s buňkami HCT116-EV nebyly zjištěny žádné takto významné změny  $IC_{50}$  (obr. 15B), protože kombinace s BTKi nevedla ke zvýšení cytotoxicity DAUN. Dále byla analyzována farmakodynamika kombinace DAUN a BTKi pomocí Chou-Talalayovy metody. Hodnoty CI pro DAUN se ZAN (5 nebo 10  $\mu$ M) vedly u buněk HCT116-AKR1C3 k synergismu ( $CI < 0,9$ ). Nejnižší hodnota CI byla zjištěna pro kombinaci 10  $\mu$ M ZAN s 0,25  $\mu$ M DAUN ( $CI = 0,33 \pm 0,11$ ). Naopak při testování zkoumaných kombinací léčiv u buněk HCT116-EV byla zjištěna aditivita až antagonismus ( $CI = 0,9-10$ ) (obr. 15C, D).

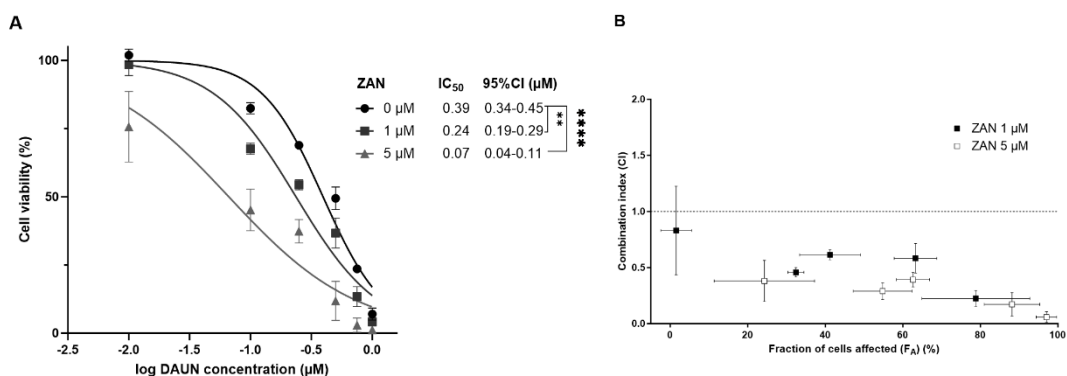


Obr. 15 ZAN působí proti rezistenci na DAUN zprostředkované AKR1C3 u nádorových buněk. Buňky HCT116-AKR1C3 (A) a HCT116-EV (B) byly ošetřeny DMSO nebo ZAN (5 a 10 μM) a zvyšujícími se koncentracemi DAUN (0,1-5 μM). Po 72 h inkubace byla životaschopnost buněk hodnocena pomocí testu XTT. Pro jednosměrný ANOVA test a následný Dunnettův post hoc test byl použit GraphPad Prism 9.3.1. ns = nesignifikantní, \*  $p < 0,05$  a \*\*  $p < 0,01$  v porovnání s kontrolou s DMSO. Chou-Talalayova analýza byla provedena za účelem vytvoření grafů CI vs. FA pro 5 (C) a 10 μM ZAN (D), aby bylo možné rozlišit synergismus ( $<0,9$ ), aditivitu ( $0,9-1,1$ ) a antagonismus ( $>1,1$ ). Tečkovaná čára byla pro lepší orientaci umístěna na CI = 1. Údaje jsou prezentovány jako průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů.

### 5.2.3 ZAN překonává rezistenci vůči DAUN v buněčné linii A549

Po potvrzení synergického účinku kombinace DAUN se ZAN na úrovni transfekovaných buněk HCT116 byly následně provedeny kombinační studie s buněčnou linií A549. Podobně jako u buněk HCT116-AKR1C3 byly po ošetření buněk kombinací DAUN a ZAN (1 a 5 μM) (obr. 16A) zjištěny významné posuny hodnot IC<sub>50</sub>. Při použití metody Chou-Talalaye byl zjištěn synergický účinek v celém rozsahu FA, přičemž nejnižší hodnota CI byla zjištěna pro kombinaci 5 μM ZAN + 0,75 μM DAUN (CI = 0,06 ± 0,05) (obr. 16B).

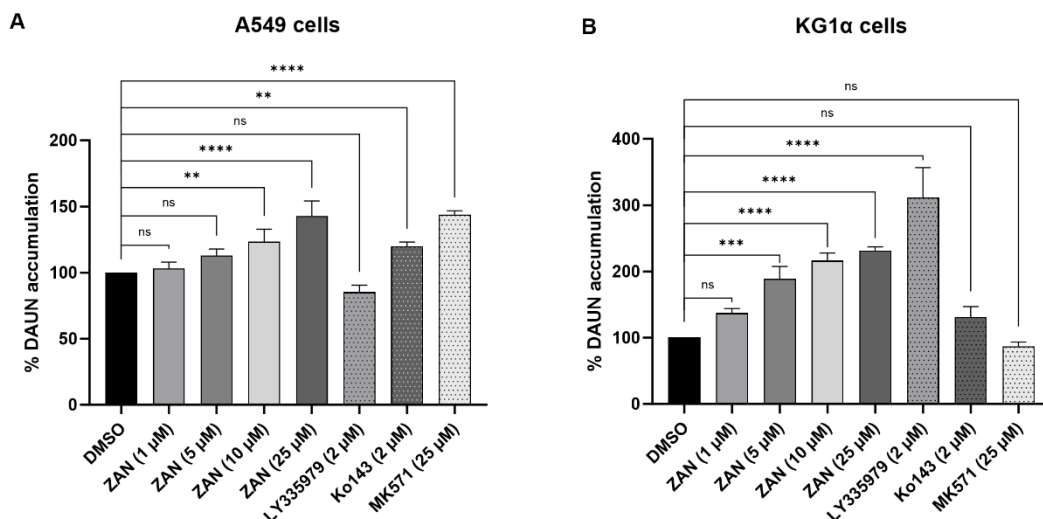




Obr. 16 ZAN působí proti rezistenci na DAUN u buněk A549. (A) Buňky A549 byly ošetřeny DMSO nebo ZAN (1 a 5 μM) a zvyšujícími se koncentracemi DAUN (0,01-1 μM), inkubovány po dobu 72 h a poté byla hodnocena životaschopnost buněk pomocí testu XTT. Pro jednosměrný ANOVA test následovaný Dunnettovým post hoc testem byl použit GraphPad Prism 9.3.1. \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vzhledem ke kontrole s DMSO. (B) Chou-Talalayova analýza byla provedena za účelem vytvoření grafu CI vs. FA pro 1 a 5 μM ZAN a rozlišení synergismu ( $<0,9$ ) od aditivitu (0,9-1,1) a antagonismu ( $>1,1$ ). Přerušovaná čára byla pro orientaci umístěna na CI = 1. Údaje jsou prezentovány jako průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů.

#### 5.2.4 ZAN zvyšuje akumulaci DAUN inhibicí efluxní aktivity ABC transportérů

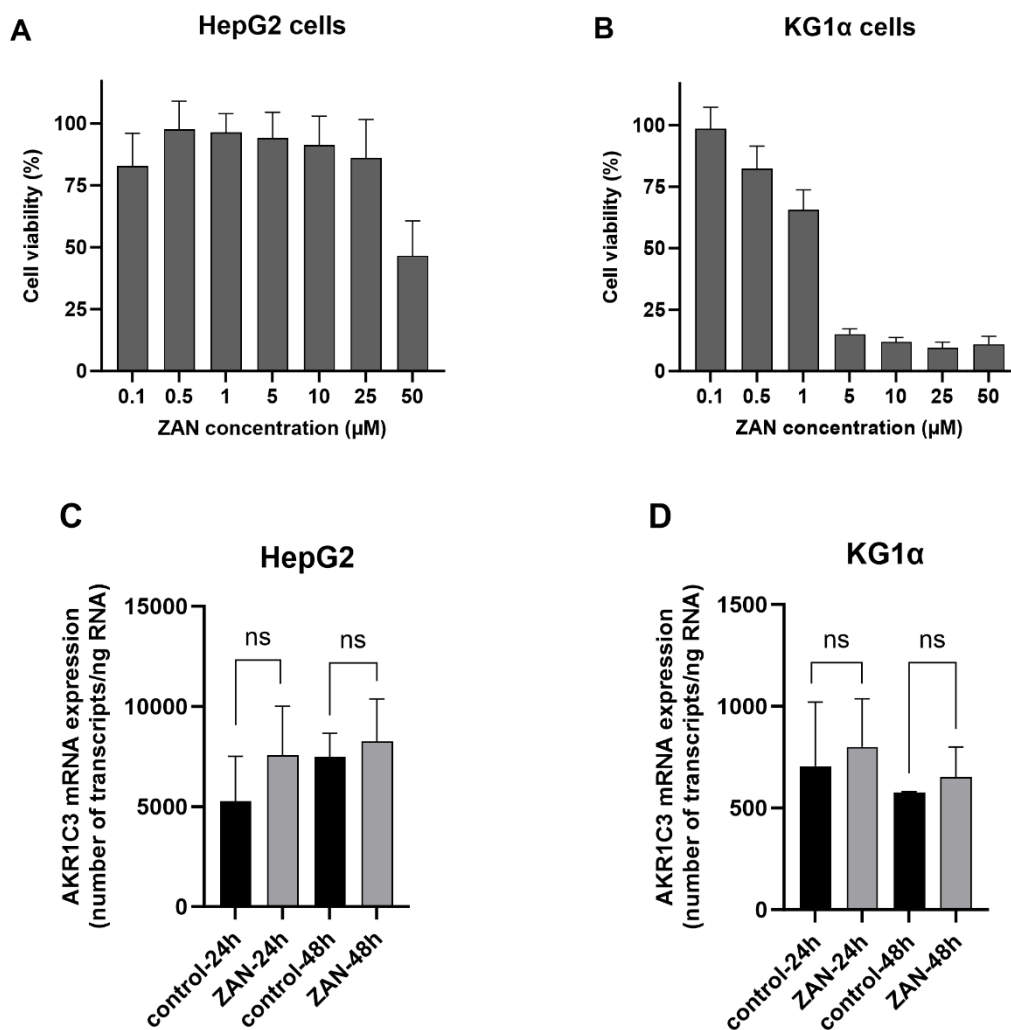
Jak bylo uvedeno v kapitole o lékové rezistenci, nejen deaktivace cytostatik pomocí CRE, ale také ABC transportéry přispívají k ANT rezistenci, a to aktivním odčerpáváním ANT z nádorových buněk. Pro naše experimenty byly vybrány leukemické buňky A549 a KG1α kvůli jejich vysoké expresi ABC transportérů (Grundy et al., 2011; Shi et al., 2020). V tomto experimentu byla hodnocena schopnost ZAN inhibovat eflux DAUN v buňkách A549 a KG1α. Pomocí selektivních modulátorů LY335979 (inhibitor ABCB1), Ko143 (inhibitor ABCG2) a MK571 (inhibitor ABCC1) jsme spolu se substrátem DAUN prokázali funkční přítomnost transportéru ABCB1 u KG1α a přítomnost ABCG2 a ABCC1 u buněčné linie A549 (obr. 17A, B). Dále byly obě buněčné linie inkubovány s kombinací DAUN a ZAN. Získané údaje ukázaly, že ZAN v koncentracích 10 a 25 μM inhiboval eflux DAUN v buňkách A549, zatímco v případě buněk KG1α ZAN interagoval s transportérem ABCB1 v koncentracích 5, 10 a 25 (obr. 17A, B).



Obr. 17 Analýza akumulace DAUN průtokovou cytometrií v buňkách A549 (A) a KG1α (B). Buňky A549 a KG1α byly předem inkubovány se ZAN (1, 5, 10 a 25 μM) nebo selektivními inhibitory ABC transportérů: LY335979 (inhibitor ABCB1), Ko143 (inhibitor ABCG2) nebo MK571 (inhibitor ABCC1). Po preinkubaci byly k buňkám přidány 2 μM (A549) nebo 1 μM DAUN (KG1α). Sloupcové grafy znázorňují akumulaci DAUN v % vzhledem k DMSO kontrole. Data byla analyzována pomocí jednosměrného ANOVA testu a následného Dunnettova post hoc testu; ns = nesignifikantní, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Údaje jsou prezentovány jako průměr ± SD ze tří nezávislých experimentů.

### 5.2.5 ZAN neovlivňuje expresi AKR1C3

Kromě inhibice AKR1C3 mohou i změny exprese AKR1C3 ovlivnit farmakologický osud ANT. Na základě toho byla zkoumána schopnost ZAN ovlivnit intracelulární hladiny mRNA AKR1C3. Spolu s leukemickými buňkami KG1α byla jako jaterní model použita buněčná linie hepatokarcinomu HepG2, aby bylo možné vyhodnotit, zda má ZAN potenciál ovlivnit celotělovou farmakokinetiku DAUN. Nejprve byly testovány cytotoxické účinky ZAN na životaschopnost buněk HepG2 a KG1α k určení koncentrace s přijatelnou cytotoxicitou. Na základě těchto experimentů (obr. 18A, B) byla pro indukční studie použita farmakologicky relevantní (Tam et al., 2019) a zanedbatelně cytotoxická koncentrace 0,5 μM ZAN. Výsledky qRT-PCR ukázaly, že ZAN nezpůsobil žádné významné změny v expresi mRNA AKR1C3 v buňkách KG1α ani HepG2 (obr. 18C, D).



Obr. 18 Účinek ZAN na expresi mRNA AKR1C3 v buněčných liniích HepG2 a KG1 $\alpha$ . Pro nalezení netoxické koncentrace ZAN byly buňky HepG2 (A) a KG1 $\alpha$  (B) ošetřeny ZAN (0,1-50  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO po dobu 48 h a životaschopnost buněk byla hodnocena pomocí testu XTT. Dále bylo u buněk HepG2 (C) a KG1 $\alpha$  (D) provedeno stanovení mRNA AKR1C3 po expozici ZAN (0,5  $\mu\text{M}$ ). qRT-PCR byla použita ke sledování změn exprese mRNA AKR1C3 po 24 a 48h inkubaci. K posouzení statistické významnosti byl použit Studentův nepárový t-test s Welchovou korekcí; ns = nesignifikantní. Údaje představují průměr  $\pm$  SD z nejméně tří nezávislých experimentů.

## 5.3 Tirabrutinib a jeho schopnost inhibovat reduktázy přeměňující DAUN na DAUN-OL

Následující podkapitoly obsahují výsledky popisující inhibiční účinek TIR na reduktázy z nadrodiny AKR a SDR, které se významně podílejí na konverzi DAUN na DAUN-OL. Výsledky jsou součástí publikace, která byla odeslána do časopisu *Frontiers in Pharmacology* a je uvedena v Seznamu publikovaných prací.

### 5.3.1 Interakce TIR s reduktázami z nadrodin AKR a SDR

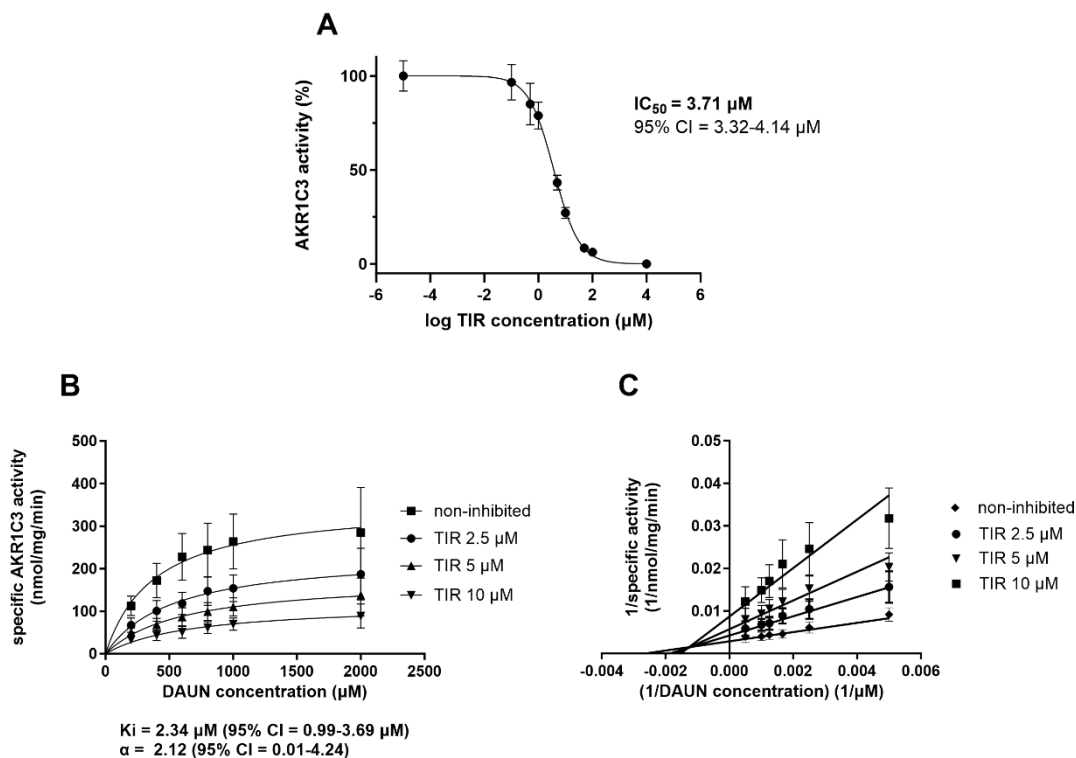
V této studii byla nejprve zkoumána inhibiční aktivita TIR vůči vybraným CRE (AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a CBR1). V dvoubodovém screeningu TIR (10 a 50  $\mu\text{M}$ ) silně inhiboval AKR1C3 (>70 % na obou koncentračních úrovních). Při inkubaci TIR s ostatními enzymy byla zjištěna zanedbatelná (<20 %) nebo žádná inhibice (tab. 6).

Tab. 6 Screening inhibičního účinku TIR na redukci DAUN zprostředkovanou různými CRE

Enzym	TIR 10 $\mu\text{M}$ (% inhibice)	TIR 50 $\mu\text{M}$ (% inhibice)
<b>AKR1A1</b>	0,01 $\pm$ 3,62	-0,22 $\pm$ 1,98
<b>AKR1B1</b>	-9,77 $\pm$ 9,55	-12,36 $\pm$ 0,88
<b>AKR1B10</b>	1,64 $\pm$ 3,89	14,96 $\pm$ 2,98
<b>AKR1C3</b>	73,20 $\pm$ 0,88	90,26 $\pm$ 1,03
<b>CBR1</b>	2,79 $\pm$ 2,74	0,13 $\pm$ 2,21

*Hodnoty jsou vyjádřeny rozsahem inhibice v procentech vzhledem ke kontrolnímu vzorku obsahujícímu DMSO místo testovaného inhibitoru (n = 3; průměr  $\pm$  SD).*

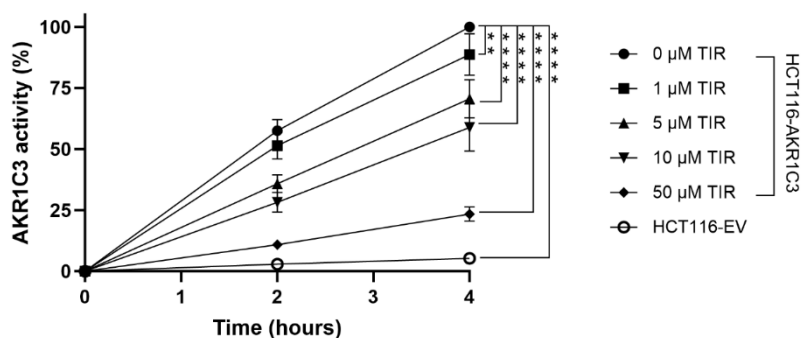
Z toho důvodu se studie zaměřila na AKR1C3. Byly stanoveny hodnoty  $\text{IC}_{50}$ ,  $K_i$  a způsob inhibice. Jak je patrné z výsledků, TIR snižuje aktivitu AKR1C3 v závislosti na dávce s  $\text{IC}_{50}$  v rozmezí 3,32–4,14  $\mu\text{M}$  (obr. 19A). Hodnota  $K_i$  získaná z rovnice pro smíšený model inhibice byla 2,34  $\mu\text{M}$  s  $\alpha = 2,12$  (obr. 19B, C).



Obr. 19 TIR inhibuje rekombinantní AKR1C3. (A) Hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena inkubací TIR (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) s DAUN (500  $\mu\text{M}$ ) v přítomnosti AKR1C3 (1,5  $\mu\text{g}$ ) a systému regenerace NADPH. (B) AKR1C3 (1,5  $\mu\text{g}$ ), DAUN (200-2000  $\mu\text{M}$ ) a TIR (2,5, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) v přítomnosti regeneračního systému NADPH byly použity ke stanovení hodnoty  $K_i$  a vytvoření dvojitého recipročního grafu dle Lineweaver-Burka (C). Datové body jsou průměry  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů provedených ve třech opakováních ( $n = 9$ ).

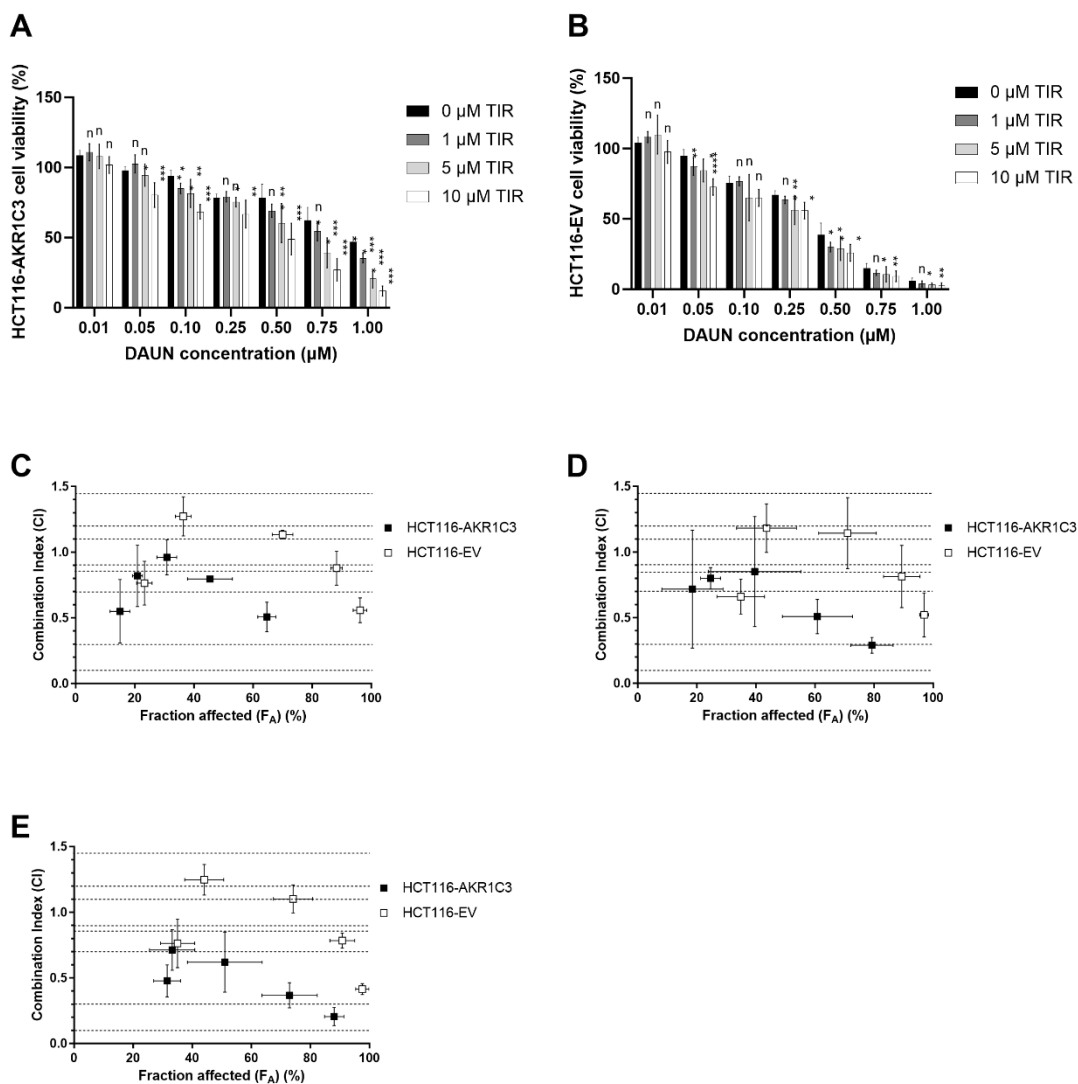
### 5.3.2 TIR synergizuje s DAUN a překonává rezistenci na léčbu ANT prostřednictvím inhibice AKR1C3

Ke zkoumání vlivu TIR na redukci DAUN na DAUN-OL v intaktních buňkách byl použit inhibiční test. Transfekované buňky HCT116-AKR1C3 a HCT116-EV byly inkubovány s DAUN v kombinaci s TIR po dobu 2 a 4 h. Obrázek 20 ukazuje, že TIR významně inhibuje metabolismus DAUN v závislosti na dávce a čase.



Obr. 20 Metabolismus DAUN zprostředkovaný AKR1C3 je inhibován TIR v transfekovaných buňkách HCT116. Buňky HCT116 byly ošetřeny kombinací DAUN (5  $\mu\text{M}$ ) a TIR (1, 5, 10 a 50  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO po dobu 2 a 4 h. Množství extrahovaného metabolitu DAUN-OL bylo analyzováno pomocí UHPLC. Data byla normalizována. Graf znázorňuje aktivitu AKR1C3, kde množství DAUN-OL vzniklé v buňkách HCT116-AKR1C3 + 0  $\mu\text{M}$  TIR po 4 h představuje 100 %. Data byla podrobena statistické analýze pomocí jednosměrného ANOVA testu s následným Dunnettovým post hoc testem. \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ve srovnání s DMSO. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD čtyř nezávislých experimentů ve dvou opakováních ( $n = 8$ ).

Jelikož byla potvrzena schopnost TIR inhibovat aktivitu AKR1C3 na buněčné úrovni, rozhodli jsme se prozkoumat, zda snížená inaktivace DAUN úměrně zvyšuje jeho cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. Z výsledků je patrné že, buňky HCT116-AKR1C3 vykazovaly vyšší rezistenci vůči DAUN než buňky HCT116-EV, podobně jako v přechodných studiích. Tento efekt byl v našich experimentech zvrácen po přidání TIR do buněčné kultury (obr. 21A, B). Kvantitativní analýza vztahů mezi dávkou a účinkem ukázala synergismus až téměř aditivitu pro DAUN a 1  $\mu\text{M}$  TIR (obr. 21C) a silný až střední synergismus mezi DAUN a 5 nebo 10  $\mu\text{M}$  TIR (obr. 21D, E) u buněk HCT116-AKR1C3. Naopak u stejných kombinací DAUN a TIR byl v případě buněk HCT116-EV pozorován synergismus až mírný či středně silný antagonismus (obr. 21C, D, E). Výsledky ukazují, že TIR lépe synergizuje s DAUN u buněk s nadměrnou expresí AKR1C3. Synergismus pozorovaný u některých kombinací DAUN a TIR v buňkách HCT116-EV však naznačuje, že do mechanismu účinku TIR jsou zapojeny další cíle, které přispívají k jeho účinnosti v buňkách HCT116.

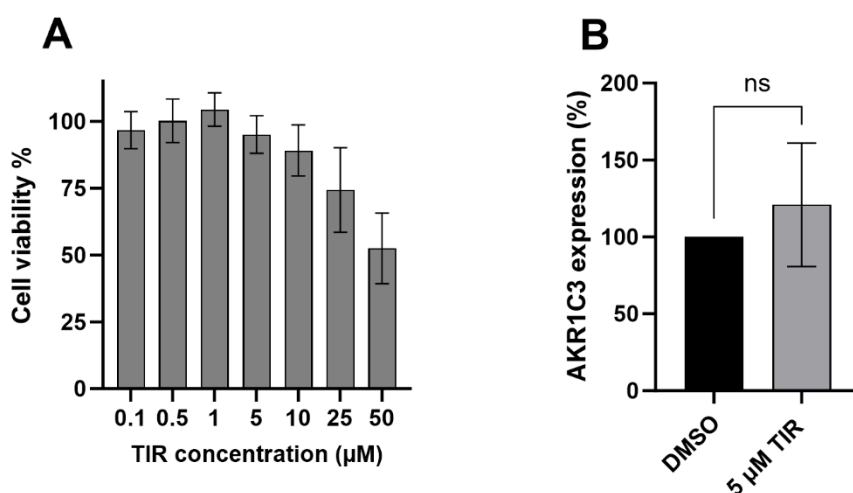


Obr. 21 TIR působí proti rezistenci k DAUN zprostředkované AKR1C3 u transientně transfekovaných buněk HCT116. Buňky HCT116-AKR1C3 (A) a HCT116-EV (B) byly inkubovány s kombinací DAUN (0,01-1  $\mu\text{M}$ ) a TIR (1, 5 a 10  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO. Po 72 h byla měřena životaschopnost buněk pomocí testu MTT. Grafy představují normalizovaná data, přičemž média obsahující <0,5 % DMSO (v/v) jsou považována za 100% životaschopnost buněk a média obsahující 10 % DMSO (v/v) za 0% životaschopnost buněk. Data byla vyhodnocena pomocí jednosměrného ANOVA testu s následným Dunnettovým post hoc testem;  $n$  = nesignifikantní, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$  ve srovnání s DMSO. Údaje jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů ve třech opakováních ( $n = 9$ ). Metoda Chou-Talaye byla použita k získání údajů potřebných k vytvoření grafů CI v závislosti na FA. TIR 1  $\mu\text{M}$  (C), 5  $\mu\text{M}$  (D) a 10  $\mu\text{M}$  (E) byl kombinován s DAUN (0,1-1  $\mu\text{M}$ ). Údaje pocházejí ze tří nezávislých experimentů provedených ve třech opakováních ( $n = 9$ ). Přerušované čáry vymezují rozsahy CI pro silný synergismus (0,1-0,3), synergismus (0,3-0,7), střední

*synergismus (0,7-0,85), téměř aditivitu (0,9-1,1), mírný antagonismus (1,1-1,2), středně silný antagonismus (1,2-1,45) a antagonismus (>1,45).*

### 5.3.3 TIR nemá žádný vliv na intracelulární hladiny exprese AKR1C3

K posouzení možných změn intracelulárních hladin exprese mRNA AKR1C3 po léčbě TIR jsme provedli qRT-PCR. Buněčná linie HepG2 poskytla systémový model pro hodnocení účinku TIR na celotělovou farmakokinetiku DAUN. Nejprve jsme hodnotili cytotoxický účinek TIR, abychom vybrali necytotoxickou koncentraci léčiva v buňkách HepG2 (obr. 22A). Poté jsme pokračovali v indukčních experimentech s 5  $\mu$ M TIR. Výsledky ukazují, že za našich studijních podmínek TIR nevyvolal v buňkách HepG2 žádné významné změny v expresi AKR1C3 (obr. 22B).



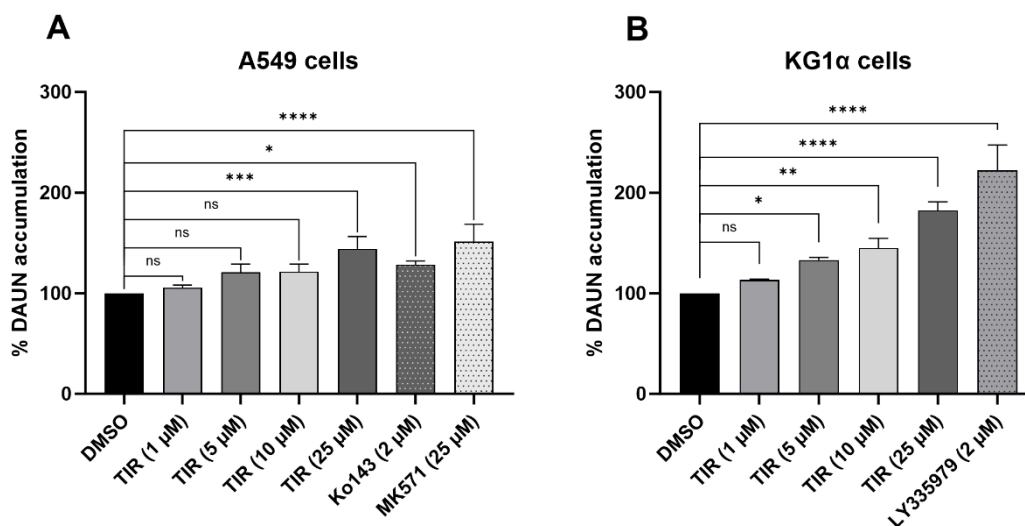
Obr. 22 Cytotoxický účinek TIR (A) a jeho vliv na expresi mRNA AKR1C3 (B) v buněčné linii HepG2. Buňky HepG2 byly ošetřeny TIR (0,1-50  $\mu$ M) nebo DMSO po dobu 48h expozice a životaschopnost buněk byla hodnocena pomocí MTT testu. Stanovení exprese AKR1C3 po expozici TIR (5  $\mu$ M) v buňkách HepG2. Po 24 h byla exprese mRNA AKR1C3 sledována pomocí qRT-PCR. K posouzení statistické významnosti byl použit Studentův nepárový t-test s Welchovou korekcí; ns = nesignifikantní. Údaje představují průměr  $\pm$  SD z nejméně tří nezávislých experimentů provedených v tetraplikátech ( $n = 12$ ).

### 5.3.4 TIR zvyšuje intracelulární hladinu DAUN v intaktních buňkách

Podobně jako v předchozí studii byl zkoumán potenciální vliv TIR na akumulaci DAUN v buňkách A549 a KG1 $\alpha$ . Funkční přítomnost ABC transportérů (ABCC1 a G2 u A549 a ABCB1 u buněčné linie KG1 $\alpha$ ) byla popsána v předchozích experimentech.



Potenciální vliv TIR na akumulaci DAUN byl prokázán pomocí kombinace DAUN a TIR (1, 5, 10 a 25  $\mu\text{M}$ ). TIR inhiboval eflux DAUN v buněčné linii A549 v koncentraci 25  $\mu\text{M}$ , zatímco 5, 10 a 25  $\mu\text{M}$  TIR inhiboval eflux DAUN v buňkách KG1 $\alpha$  (obr. 23A, B).



Obr. 23 Akumulace DAUN v buněčných liniích A549 (A) a KG1 $\alpha$  (B). Buňky byly inkubovány s DMSO, zvyšujícími se koncentracemi TIR (1-25  $\mu\text{M}$ ) nebo selektivními inhibitory ABC transportérů: 2  $\mu\text{M}$  Ko143 nebo 25  $\mu\text{M}$  MK571 (A549), 2  $\mu\text{M}$  LY335979 (KG1 $\alpha$ ) po dobu 15 min. Po preinkubaci byl k buňkám přidán 1  $\mu\text{M}$  DAUN a inkubován po dobu 45 min a poté byla průtokovou cytometrií měřena akumulace DAUN v buňkách jako fluorescence. Sloupcové grafy znázorňují akumulaci DAUN v % vzhledem k DMSO, což je kontrolní látka. Data byla analyzována pomocí jednosměrného ANOVA testu a následného Dunnettova post hoc testu; ns = nesignifikantní, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  a \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Údaje jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SD tří nezávislých experimentů provedených ve dvou opakováních ( $n = 6$ ).

## 6 DISKUSE

Nádorová onemocnění představují jednu z největších výzev moderní medicíny, přičemž chemoterapie zůstává klíčovým nástrojem v léčbě toho onemocnění. Mezi nejúčinnější a široce používané chemoterapeutické látky jsou řazeny ANT, známé svou schopností efektivně zasahovat do buněčného cyklu a způsobovat poškození DNA nádorových buněk vedoucí k buněčné smrti. Přestože jsou ANT vysoce účinné v terapii nádorových onemocnění, jejich dlouhodobé používání je značně omezeno vedlejšími účinky a rozvojem rezistence nádorových buněk. Rezistence na ANT je komplexní fenomén zahrnující řadu mechanismů, jako jsou alterace cílových molekul, aktivace opravných mechanismů DNA, aktivita lékových transportérů či biotransformačních enzymů (Mattioli et al., 2023).

Významným mechanismem přispívajícím k rezistenci vůči ANT je jejich metabolismus biotransformačními enzymy, které mohou léčiva deaktivovat a redukovat tak množství parentní účinné formy. Dosud popsané biotransformační enzymy odpovědné za redukční metabolismus DOX a DAUN jsou zařazeny buď do nadrodiny SDR nebo AKR. Signifikantní schopnost redukční přeměny byla popsána u CBR1 patřící do nadrodiny SDR a AKR1A1, 1B1, 1B10, 1C3 a 7A2 patřící do nadrodiny AKR (Bains et al., 2010; Bains et al., 2009; Hofman et al., 2015; Kassner et al., 2008; Ohara et al., 1995). Tyto reduktázy, tedy popsané reduktázy s významnou redukční přeměnou k ANT, byly předmětem našich studií a publikované práce jsou zahrnuty do této disertační práce. V roce 2008 byla poprvé popsána redukce DOX katalyzovaná AKR1C3 (Kassner et al., 2008). Publikace se zaměřila na testování enzymových aktivit SDR a AKR pomocí purifikovaných enzymů a lidských tkání. Nejvyšší katalytickou aktivitu vykazovala AKR1C3, následovaná CBR1. V menší míře také AKR1B10, 1A1 a 1C4. Žádnou nebo velmi nízkou aktivitu zaznamenali u AKR1C1, 1C2 a CBR3. O dva roky později byla publikována studie, která porovnávala aktivity CRE v přítomnosti DOX i DAUN. Výsledkem bylo, že DAUN je signifikantně lepším substrátem AKR1C3 než DOX. Nejvyšší aktivitu v přítomnosti DAUN naměřili s CBR1, AKR1C3, 7A2, 1A1 a 1B10 (Bains et al., 2010). Metabolismem ANT zprostředkovaným AKR1C3 se rovněž zabývala naše výzkumná skupina. Autoři publikovali kinetické studie s purifikovaným rekombinantním enzymem AKR1C3 vůči DOX, DAUN a IDA. Podobně jako v přechozí studii byl nejúčinněji metabolizován DAUN, následovaný IDA a DOX (Hofman et al., 2014). Kromě kinetických studií s purifikovaným rekombinantním enzymem AKR1C3

byla prokázána rozsáhlá metabolická konverze DAUN zprostředkovaná nadměrně exprimovaným AKR1C3 v intracelulárních podmínkách. Ve své studii transfekovali vybrané buněčné linie (A549, HeLa, MCF7 a HCT116). Potvrzením AKR1C3 zprostředkované redukce DAUN v intaktních buňkách prokázali, že tento metabolický proces přispívá k ANT rezistenci v nádorových buňkách (Hofman et al., 2014). Zvýšená enzymatická redukce ANT na jejich méně účinné sekundární C13-hydroxy metabolity byla popsána jako jeden z mechanismů, který způsobuje farmakokinetickou rezistenci na ANT v nádorových buňkách (Ax et al., 2000; Gavelova et al., 2008; Heibein et al., 2012; Plebuch et al., 2007; Soldan et al., 1996; Zhong et al., 2011). Současně byla u řady nádorových onemocnění zjištěna nadměrná exprese AKR1C3, včetně karcinomu prostaty, prsu, AML a NSCLC, přičemž její upregulace korelovala s invazivitou a agresivitou těchto nádorů (Birtwistle et al., 2009; Li et al., 2024; Oduwole et al., 2004; Stanbrough et al., 2006).

Detailní znalost metabolismu ANT poskytla významný přínos v oblasti překonání lékové rezistence a jejich vedlejších účinků. Na základě této skutečnosti vznikají nové přístupy v terapii nádorových onemocnění, např. využití inhibitorů v kombinované terapii. Verma et al. (2016, 2019) ve svých studiích ukázal potenciál několika inhibitorů AKR1C3 silně synergizovat cytotoxický účinek DAUN na buněčné linii AML nadměrně exprimující AKR1C3. Kombinovaná léčba vyvolávala silný účinek, který potencoval cytotoxicitu DAUN více než 10krát (Verma et al., 2016; Verma et al., 2019). Naše výzkumná skupina rovněž zaznamenala inhibici AKR1C3 jako necílový účinek inhibitoru cyklin-dependentní kinázy (CDK) dinaciklibu, inhibitoru fosfoinositid-3-kinázy (PI3K) buparlisibu a inhibitoru tyrosinkinázy 3 receptoru podobné FMS (FLT3) midostaurinu (Bukum et al., 2019; Morell et al., 2021; Novotna et al., 2018a).

Cílem této práce bylo studium BTKi (ACA, IBR, TIR, ZAN) a jejich schopnosti inhibovat CRE. Ze všech studovaných CRE, které se podílejí na metabolismu DAUN, byl nejvýznamněji inhibován enzym AKR1C3. Podobných výsledků bylo dosaženo také v našich předchozích studiích (Bukum et al., 2019; Morell et al., 2021). Vzhledem k tomu, že AKR1C3 je spojen s rezistencí nádorových buněk a současně je nejaktivnější DAUN-reduktázou z nadrodiny AKR, se tento enzym jeví jako slibný terapeutický cíl. V našich experimentech všechny testované BTKi inhibovaly aktivitu rekombinantní formy AKR1C3 s nízkými hodnotami  $IC_{50}$ ,  $K_i^{app}$ , či  $K_i$ . Důležité je, že vypočtené maximální plazmatické koncentrace ( $c_{max}$ ) BTKi ( $\sim 1,8 \mu M$  ACA;  $\sim 0,34 \mu M$  IBR;  $\sim 1,8 \mu M$  TIR;  $\sim 1,4 \mu M$  ZAN (Munakata et al., 2019; Patel et al., 2018; Scheers et al., 2015; Tam et al.,

2019)) se pohybují v podobném koncentračním rozmezí s hodnotami stanovenými v našich experimentech. Lze tedy očekávat, že by se u onkologických pacientů mohla a měla projevit interakce mezi AKR1C3 a BTKi. Rovněž všechny BTKi vykazovaly nekompetitivní/smíšený typ inhibice. Nekompetitivní typ inhibice často vykazují pevně se vázající inhibitory (anglicky *tight binding inhibitors*), které se ireverzibilně váží na enzym a jsou charakterizovány vysokou afinitou k cílovému enzymu. Tyto inhibitory jsou zvláště cenné, protože jejich prodloužené působení může vést k účinnějším a trvalejším terapeutickým účinkům, které často umožňují nižší a méně časté dávkování (Copeland, 2013). Pomocí Morrisonovy kvadratické rovnice pro pevně se vázající inhibitory s různým množstvím AKR1C3 byly stanoveny hodnoty  $K_i^{app}$ . V případě ACA a IBR byly zjištěny relativně konstantní hodnoty  $K_i^{app}$ , nezávislé na koncentraci enzymu, čímž jsme prokázali, že se jedná o pevně se vázající inhibitory. V našich experimentech vybrané BTKi inhibovaly AKR1C3 nejen na úrovni rekombinantního enzymu, ale také v intaktních buňkách s nadměrnou expresí AKR1C3. Pro tyto experimenty byla vybrána buněčná linie HCT116 kvůli zanedbatelné endogenní expresi AKR1C3, která byla transfekována vektorem kódujícím enzym AKR1C3. Nejprve byly provedeny inhibiční studie, při kterých všechny BTKi významně snížily aktivitu AKR1C3 a inhibovaly tak metabolismus DAUN na DAUN-OL. To dokazuje, že BTKi vstupují do nádorových buněk a ovlivňují intracelulární aktivitu tranzientně exprimovaného AKR1C3.

Jak už bylo popsáno výše, zvýšená exprese AKR1C3 chrání nádorové buňky před cytotoxicitou DAUN (Hofman et al., 2014). Podobného výsledku bylo dosaženo také v našich experimentech na buněčné linii HCT116-AKR1C3. Tento efekt byl zvrácen po přidání studovaných BTKi do buněčné kultury. Důležité je, že v případě HCT116-EV nevedla kombinace DAUN s BTKi k významným změnám, což potvrzuje rozhodující úlohu interakce BTKi-AKR1C3 při překonávání rezistence vůči DAUN. Po kvantitativní analýze vztahů mezi dávkou a účinkem, všechny studované BTKi vykazovaly střední až silný synergismus s DAUN v koncentraci 5 nebo 10  $\mu$ M. V případě TIR bylo dosaženo synergismu až téměř aditivity také v koncentraci 1  $\mu$ M. Současně bylo dosaženo synergismu až středně silného antagonismu také v buňkách HCT116-EV, což naznačuje, že do mechanismu účinku mohou být zapojeny další cíle, které přispívají k jejich účinnosti v buňkách. Po potvrzení schopnosti BTKi zvrátit rezistenci vůči DAUN v buňkách tranzientně exprimujících AKR1C3, bylo vhodné synergický efekt kombinace ověřit na buněčné linii A549 s endogenní expresí AKR1C3. Podobně jako u buněčné linie HCT116-AKR1C3, i u buněk A549 byla rezistence vůči DAUN překonána přidáním

BTKi (ACA, IBR, ZAN). Kombinace léčiv vedla ke snížení účinné dávky DAUN a ke zlepšení synergických parametrů v závislosti na dávce BTKi. U všech tří BTKi byl pozorován synergismus již při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ , což lze vysvětlit jejich schopností vykazovat duální inhibiční účinky.

Expres ABC transportérů je dalším faktorem, který snižuje účinnost ANT léčby jejich aktivním efluxem z nádorových buněk. Dinaciklib a midostaurin, stejně jako IBR, byly popsány jako specifické inhibitory MRP1/ABCC1 (Cihalova et al., 2015; Hsiao et al., 2019; Zhang et al., 2014). Naše výzkumná skupina identifikovala duální mechanismus midostaurinu u buněčné linie KG1 $\alpha$ , kde midostaurin synergicky zvyšoval cytotoxicitu DAUN inhibicí metabolismu AKR1C3 a zároveň zvyšoval intracelulární akumulaci DAUN inhibicí transportéru MRP1/ABCC1 (Morell et al., 2021). Na základě těchto poznatků jsme prozkoumali schopnost duálního mechanismu také u inhibitorů TIR a ZAN. Získané výsledky ukázaly, že oba BTKi inhibovaly eflux DAUN v buněčné linii A549 i KG1 $\alpha$ , čímž bylo vysvětleno pozorované zlepšení synergických parametrů kombinace léčiv u buněčné linie A549. Pomocí selektivních modulátorů LY335979 (inhibitor ABCB1), Ko143 (inhibitor ABCG2) a MK571 (inhibitor ABCC1) byla také prokázána funkční přítomnost transportéru ABCB1 u KG1 $\alpha$  a přítomnost ABCG2 a ABCC1 u buněčné linie A549. Což koreluje s předchozími studii o expresi a/nebo funkční aktivitě zkoumaných transportérů ve vybraných buněčných modelech (Grundy et al., 2011; Shi et al., 2020).

Farmakologický osud ANT a jejich účinek ve spojení s BTKi může být ovlivněn změnami v expresi AKR1C3. Proto jsme studovali vliv BTKi na regulaci mRNA AKR1C3 v buněčných liniích HepG2 (TIR, ZAN) a KG1 $\alpha$  (ZAN). Nebyla pozorována žádná upregulace mRNA AKR1C3. BTKi neovlivňují systémový metabolismus DAUN (TIR, ZAN) ani neposilují fenotyp rezistence vůči DAUN uvnitř nádorových buněk podporou změn exprese AKR1C3.

Primární indikací BTKi je léčba B-buněčných malignit, jako jsou CLL, SLL, MCL, MZL, WM (Alu et al., 2022). Z nichž CLL/SLL a indolentní lymfomy (nízce agresivní) se vyznačují pomalou progresí onemocnění, avšak v důsledku genetické nestability buněčné populace dochází ke změnám vedoucím k blastické transformaci (Gascoyne, 2015). Prognóza pacientů s transformovaným lymfomem je nepříznivá a léčba je problematická. I v těchto případech jsou používány chemoterapeutické režimy obsahující ANT, které jsou obecně účinné, ale někteří pacienti na léčbu nereagují (Coiffier & Sarkozy, 2016). ACA v kombinaci s chemoterapeutickým režimem R-CHOP (rituximab

+ cyklofosfamid + ANT + vinkristin + prednison) vykazoval zlepšení účinnosti léčby pro pacienty DLBCL (Davies et al., 2020). Podobně ZAN prokázal povzbudivý klinický přínos a tolerovatelnou bezpečnost v kombinaci s režimem R-CHOP u nově diagnostikovaných pacientů s DLBCL s extranodálním postižením (Geng et al., 2023). Získané výsledky podporují předchozí důkazy naznačující, že současné podávání BTKi s ANT může zlepšit terapeutickou účinnost ANT a potlačit rezistenci.

Kromě primární indikace BTKi byla (v případě IBR) prokázána jejich účinnost v různých preklinických modelech u AML a solidních nádorů, jako je karcinom slinivky břišní, prsu, plic či žaludku (Molina-Cerrillo et al., 2017), přičemž ve většině případů mohou být k léčbě použity chemoterapeutické režimy obsahující ANT (Mattioli et al., 2023). Bylo uvedeno, že léčba IBR významně snížila  $IC_{50}$  standardní chemoterapie AML cytarabinu nebo DAUN u primární vzorků AML (Rushworth et al., 2014). Později Rotin et al. (2016) pozorovali, že IBR synergizuje s DAUN v buňkách AML s vyřazenou BTK, aniž by zvyšoval jeho akumulaci, čímž vyloučili inhibici BTK jako základ této synergie (Rotin et al., 2016). Z výsledků lze usoudit, že enzym AKR1C3 by mohl být jedním z možných cílů BTKi, který by mohl stát za zlepšením účinnosti ANT chemoterapie.

Je nutno poukázat na to, že AKR1C3 není pouze ANT-reduktázou, ale podílí se také na produkci pohlavních hormonů a proliferačních prostaglandinů (Birtwistle et al., 2009; Byrns et al., 2010; Desmond et al., 2003). Souvislost mezi expresí AKR1C3 a špatnou prognózou pacientů byla mnohokrát prokázána u různých solidních nádorů (Oduwole et al., 2004; Zhao et al., 2019; Zhu et al., 2021). Několik studií dále poukázalo na možnou souvislost mezi AKR1C3 a leukemogenezí (Birtwistle et al., 2009; Desmond et al., 2003). Navíc bylo zjištěno, že polymorfismy AKR1C3 u matek a potomků jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku dětské leukémie (Liu et al., 2008), díky čemuž FDA zařadila AKR1C3 na seznam relevantních cílů v dětské onkologii (FDA, 2024e).

Cílení na AKR1C3 může mít vliv na leukemii, hormonálně závislé i nezávislé nádorové onemocnění. Tato zjištění podporují kombinování ANT chemoterapie s BTKi u nádorových onemocnění s vysokou expresí AKR1C3.

## 7 ZÁVĚR

ANT představují třídu chemoterapeutických činidel široce používaných při léčbě různých nádorových onemocnění. Jejich klinické použití je limitováno vznikem lékové rezistence. Mechanismy rezistence zahrnují metabolismus ANT biotransformačními enzymy, které snižují jejich účinnost. CRE jsou skupinou enzymů, které katalyzují redukci karbonylových sloučenin na alkoholy. Redukce karbonylu činí látky hydrofilnější a usnadňuje jejich vylučování z organismu. Tato disertační práce si klade za cíl prozkoumat interakce vybraných CRE s vybranými BTKi a jejich potenciálního účinku v kombinaci s DAUN na senzitivitu nádorových buněk. V předkládané disertační práci byly postupně splněny všechny stanovené cíle.

1. V experimentální části byl nejprve proveden screening inhibičního potenciálu vybraných BTKi na biotransformaci DAUN na jeho metabolit DAUN-OL. Všechny BTKi vykazovaly největší aktivitu proti AKR1C3.
2. Následovalo stanovení hodnot  $IC_{50}$  a  $K_i$  s cílem charakterizovat jejich vliv na redukci DAUN zprostředkovanou AKR1C3. Kinetická měření ukázala, že všechny BTKi inhibovaly redukci DAUN s nízkými hodnotami  $IC_{50}$ ,  $K_i^{app}$ , či  $K_i$ .
3. Pomocí Michaelise a Mentenové a Lineweaver-Burkových grafů byl určen typ inhibice. U všech BTKi byl zjištěn nekompetitivní/smíšený typ inhibice.
4. Inhibiční účinek byl ověřen v *in vitro* experimentech na buněčné úrovni s využitím buněčné linie HCT116, která byla přechodně transfekována AKR1C3. V inhibičních studiích všechny BTKi významně snížily aktivitu AKR1C3 a inhibovaly tak metabolismus DAUN na DAUN-OL v intaktních buňkách.
5. Následovalo studium a analýza účinku kombinace DAUN s vybranými BTKi v experimentech na úrovni nádorových buněčných linií s tranzientní či endogenní expresí AKR1C3. Kvantitativní analýza vztahů mezi dávkou a účinkem ukázala, že všechny kombinace DAUN s vybranými BTKi vykazovaly střední až silný synergismus v buněčné linii HCT116 s tranzientní expresí AKR1C3. Synergický efekt byl ověřen v buněčné linii A549 s endogenní expresí AKR1C3. Kombinace léčiv DAUN s BTKi (ACA, IBR, ZAN) vedla ke snížení účinné dávky DAUN a ke zlepšení synergických parametrů v závislosti na dávce BTKi.
6. Za účelem zjištění, zda není ohrožen synergický účinek kombinace DAUN s vybranými BTKi (TIR, ZAN) byly studovány potenciální změny v expresi

AKR1C3 po expozici BTKi. Nebyla pozorována žádná upregulace mRNA AKR1C3.

7. Poslední část byla věnována studiu vybraných BTKi (TIR, ZAN) na aktivitu lékových efluxních transportérů pomocí akumulčních metod s využitím nádorových buněčných linií A549 a KG1 $\alpha$ . Oba BTKi inhibovaly aktivitu ABC lékových transportérů v obou buněčných liniích, čímž bylo vysvětleno pozorované zlepšení synergických parametrů kombinace léčiv u buněčné linie A549.

Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky podporují předchozí důkazy o synergickém účinku současného podávání BTKi s ANT ke zlepšení terapeutické účinnosti ANT a potlačení rezistence u nádorových onemocnění. Pokud se tyto nálezy potvrdí *in vivo*, mohou se promítnout do účinné léčebné strategie pro značný počet pacientů.



## 8 ZKRATKY

95% CI	95% interval spolehlivosti
ABC	ATP-binding cassette
ACA	akalabrutinib
AKR	aldo-keto reduktázy
AML	akutní myeloidní leukémie
ANOVA	analýza rozptylu
ANT	antracyklinová antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
BCR	B-buněčný receptor
BCRP	breast cancer resistance protein
BLK	B-lymfoidní tyrosinkináza
BMX	kináza kostní dřeně na chromozomu X
BTK	Brutonova tyrosinkináza
BTKi	inhibitory Brutonovy tyrosinkinázy
CDK	cyklin-dependentní kinázy
cGVHD	chronická reakce štěpu proti hostiteli
CI	kombinační indexy
CLL	chronická lymfocytární leukemie
$C_{max}$	maximální plazmatické koncentrace
CRE	karbonyl redukující enzymy
CYP	cytochrom P450
DAUN	daunorubicin
DAUN-OL	daunorubicinol
DLBCL	difuzního velkobuněčný B lymfom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxidu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
DOX-OL	doxorubicinol
DTT	dithiothreitol
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
ER	estrogenový receptor

ErbB3	receptor Erb-B2 tyrosinkinázy 3
ErbB4	receptor Erb-B2 tyrosinkinázy 4
FA	podíl ovlivněných buněk
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FL	folikulární lymfom
FLT3	tyrosinkináza 3 podobná FMS receptoru
FMO	flavinové monooxygenázy
GABA	aminomáselná kyselina
GHB	$\gamma$ -hydroxybutyrát
GST	glutathion-S-transferázy
HCT116-AKR1C3	buněčná linie HCT116 transfekovaná vektorem kódujícím AKR1C3
HCT116-EV	buněčná linie HCT116 transfekovaná prázdným vektorem
HER2	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2
IBR	ibrutinib
IC <sub>50</sub>	poloviční maximální inhibiční koncentrace
IDA	idarubicin
IDMEM	Iscove's Dulbecco's modified Eagle's medium
ITAM	imunoreceptorové aktivační motivy na bázi tyrosinu
ITK	interleukin-2-indukovatelná T-buněčná kináza
K <sub>i</sub>	inhibiční konstanta
K <sub>i</sub> <sup>app</sup>	zdánlivé hodnoty K <sub>i</sub>
MCL	lymfom z pláštěvých buněk
MDR	dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem
MM	mnohočetný myelom
MRP1	protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí 1
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
MZL	lymfom marginální zóny
NBD	nukleotidové vazebné domény
NNK	4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky

PBS	fosfátový puř
PCNSL	primární lymfom centrálního nervového systému
PG	prostaglandin
P-gp	permeabilní glykoprotein
PI3K	fosfoinositid-3-kináza
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PMS	fenazin methosulfát
R/R	relabujících/refrakterních
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SD	směrodatná odchylka
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem
SH	homologní doména SRC
SLL	malý lymfocytárního lymfom
TEC	nereceptorová tyrosinkináza
TIR	tirabrutinib
TLR	Toll-like receptor
TMD	transmembránové domény
UGT	UDP-glukuronosyltransferázy
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
WM	Waldenströmova makroglobulinémie
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid
ZAN	zanubrutinib

## 9 PODÍL AUTORKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. Morell, A., Čermáková, L., Novotná, E., Laštovičková, L., Haddad, M., Haddad, A., Portillo, R., Wsól, V. (2020). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers (Basel)*, 12(12). (IF<sub>2020</sub>: 6,639 Q1; AIS<sub>2020</sub>: 1,323 Q2)
  - screening inhibičního potenciálu ACA a IBR, stanovení kinetických parametrů a typu inhibice
  - inhibiční a kombinační studie
  - revize textu manuskriptu týkající se prováděných metodik a výsledků
  
- II. Čermáková, L., Hofman, J., Laštovičková, L., Havlíčková, L., Špringrová, I., Novotná, E., Wsól, V. (2022). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Zanubrutinib Effectively Modulates Cancer Resistance by Inhibiting Anthracycline Metabolism and Efflux. *Pharmaceutics*, 14(10). (IF<sub>2022</sub>: 5,400 Q1; AIS<sub>2022</sub>: 0,756 Q2)
  - inhibiční a kombinační studie
  - indukční studie
  - akumulární studie
  - analýza dat
  - sepsání publikace
  
- III. Čermáková, L., Novotná, E., Laštovičková, L., Kašparová M., Lebeková N., Špringrová, I., Macone A., Bonamore A., Wsól, V. (2024). Tirabrutinib, a second-generation inhibitor of Bruton's tyrosine kinase, overcomes anthracycline resistance mediated by aldo-keto reductase 1C3 and efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC1. Publikace byla odeslána do časopisu *Frontiers in Pharmacology*.
  - inhibiční a kombinační studie
  - indukční studie
  - akumulární studie
  - analýza dat
  - sepsání publikace

## 10 PODÍL AUTORKY NA PUBLIKACÍCH NE-VZTAHUJÍCÍCH SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE

- I. Bukum, N., Novotná, E., Morell, A., Želazková, J., Laštovičková, L., Čermáková, L., Portillo, R., Solich, P., Wsól, V. (2021). Inhibition of AKR1B10-mediated metabolism of daunorubicin as a novel off-target effect for the Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Biochem Pharmacol*, 192, 114710. (IF<sub>2021</sub>: 6,100 Q1; AIS<sub>2021</sub>: 1,082 Q1)
- provedení části experimentů na buněčných liniích
  - revize textu manuskriptu týkající se prováděných metodik a výsledků

# 11 KONFERENCE

## 11.1 Ústní prezentace

- 12<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference, 1.–2. února 2022, Hradec Králové, CZ  
„ZANUBRUTINIB AS A NOVEL INHIBITOR OF ALDO-KETOREDUCTASE 1C3 FIGHTS AGAINST RESISTANCE IN DAUNORUBICIN CANCER THERAPY“
- 13<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference, 1. –2. února 2023, Hradec Králové, CZ  
„BRUTON’S TYROSINE KINASE INHIBITOR TIRABRUTINIB COUNTERACTS ANTHRACYCLINE RESISTANCE BY TARGETING ALDO-KETO REDUCTASE 1C3“
- 14<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference, 30.–31. ledna 2024, Hradec Králové, CZ  
„BRUTON'S TYROSINE KINASE INHIBITOR, EVOBRUTINIB, AS A NOVEL INHIBITOR OF ALDO-KETO REDUCTASE 1C3 IN THE FIGHT AGAINST RESISTANCE IN DAUNORUBICIN-BASED CANCER THERAPY“

## 11.2 Posterové prezentace

- Mezinárodní konference TOXCON 2022 - 27<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, 29. srpna – 1. září 2022, Hradec Králové, CZ  
„ZANUBRUTINIB ACTS AS AN EFFECTIVE RESISTANCE MODULATOR BY INHIBITING ANTHRACYCLINE METABOLISM AND EFFLUX“
- EACR 2023 Conference 12.–15. června 2023, Turín, IT  
„A PROMISING THERAPEUTIC TARGET FOR CANCER TREATMENT: AKR1B10-MEDIATED ANTHRACYCLINE METABOLISM COULD BE INHIBITED BY BRUTON’S TYROSINE KINASE INHIBITORS“

## 12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Afar, D. E., Park, H., Howell, B. W., Rawlings, D. J., Cooper, J., & Witte, O. N. (1996). Regulation of Btk by Src family tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 16(7), 3465-3471. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.3465>

Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., & Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int*, 15, 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>

Alu, A., Lei, H., Han, X., Wei, Y., & Wei, X. (2022). BTK inhibitors in the treatment of hematological malignancies and inflammatory diseases: mechanisms and clinical studies. *J Hematol Oncol*, 15(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01353-w>

Ax, W., Soldan, M., Koch, L., & Maser, E. (2000). Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem Pharmacol*, 59(3), 293-300. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00322-6](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00322-6)

Bachur, N. R. (1979). Anthracycline antibiotic pharmacology and metabolism. *Cancer Treat Rep*, 63(5), 817-820. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/455323>

Bailey-Dell, K. J., Hassel, B., Doyle, L. A., & Ross, D. D. (2001). Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim Biophys Acta*, 1520(3), 234-241. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00270-6)

Bains, O. S., Grigliatti, T. A., Reid, R. E., & Riggs, K. W. (2010). Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *J Pharmacol Exp Ther*, 335(3), 533-545. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173179>

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

Bains, O. S., Takahashi, R. H., Pfeifer, T. A., Grigliatti, T. A., Reid, R. E., & Riggs, K. W. (2008). Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. *Drug Metab Dispos*, 36(5), 904-910. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.018895>

Bajenoff, M., Egen, J. G., Koo, L. Y., Laugier, J. P., Brau, F., Glaichenhaus, N., & Germain, R. N. (2006). Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*, 25(6), 989-1001. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.011>

Barf, T., Covey, T., Izumi, R., van de Kar, B., Gulrajani, M., van Lith, B., van Hoek, M., de Zwart, E., Mittag, D., Demont, D., Verkaik, S., Krantz, F., Pearson, P. G., Ulrich, R., & Kaptein, A. (2017). Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. *J Pharmacol Exp Ther*, 363(2), 240-252. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.242909>

Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev*, 40(4), 553-624. <https://doi.org/10.1080/03602530802431439>

Basu, S. (2010). Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2alpha) and F(2)-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells*, 30(5), 383-391. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0157-1>

- Baudino, T. A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol*, 12(1), 3-20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
- Bhullar, K. S., Lagaron, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*, 17(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>
- Birtwistle, J., Hayden, R. E., Khanim, F. L., Green, R. M., Pearce, C., Davies, N. J., Wake, N., Schrewe, H., Ride, J. P., Chipman, J. K., & Bunce, C. M. (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. *Mutat Res*, 662(1-2), 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.010>
- Bortolozzi, R., Bresolin, S., Rampazzo, E., Paganin, M., Maule, F., Mariotto, E., Boso, D., Minuzzo, S., Agnusdei, V., Viola, G., Te Kronnie, G., Cazzaniga, G., Basso, G., & Persano, L. (2018). AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *Br J Cancer*, 118(7), 985-994. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>
- Bradshaw, J. M. (2010). The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. *Cell Signal*, 22(8), 1175-1184. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.001>
- Brown, J. R. (2013). Ibrutinib (PCI-32765), the first BTK (Bruton's tyrosine kinase) inhibitor in clinical trials. *Curr Hematol Malig Rep*, 8(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s11899-012-0147-9>
- Brown, J. R., Harb, W. A., Hill, B. T., Gabrilove, J., Sharman, J. P., Schreeder, M. T., Barr, P. M., Foran, J. M., Miller, T. P., Burger, J. A., Kelly, K. R., Mahadevan, D., Ma, S., Li, Y., Pierce, D. W., Barnett, E., Marine, J., Miranda, M., Azaryan, A., . . . Kipps, T. J. (2016). Phase I study of single-agent CC-292, a highly selective Bruton's tyrosine kinase inhibitor, in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 101(7), e295-298. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.140806>
- Brullo, C., Villa, C., Tasso, B., Russo, E., & Spallarossa, A. (2021). Btk Inhibitors: A Medicinal Chemistry and Drug Delivery Perspective. *Int J Mol Sci*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147641>
- Bukum, N., Novotna, E., Morell, A., Hofman, J., & Wsol, V. (2019). Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3. *Chem Biol Interact*, 302, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.026>
- Byrd, J. C., Hillmen, P., Ghia, P., Kater, A. P., Chanan-Khan, A., Furman, R. R., O'Brien, S., Yenerel, M. N., Illes, A., Kay, N., Garcia-Marco, J. A., Mato, A., Pinilla-Ibarz, J., Seymour, J. F., Lepretre, S., Stilgenbauer, S., Robak, T., Rothbaum, W., Izumi, R., . . . Jurczak, W. (2021). Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol*, 39(31), 3441-3452. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01210>
- Byrns, M. C., Duan, L., Lee, S. H., Blair, I. A., & Penning, T. M. (2010). Aldo-keto reductase 1C3 expression in MCF-7 cells reveals roles in steroid hormone and prostaglandin metabolism that may explain its over-expression in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 118(3), 177-187. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.009>
- Cihalova, D., Ceckova, M., Kucera, R., Klimes, J., & Staud, F. (2015). Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro. *Biochem Pharmacol*, 98(3), 465-472. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.099>
- Coiffier, B., & Sarkozy, C. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016(1), 366-378. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.366>



Copeland, R. A. (2013). Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. *Wiley-Interscience*.

Corsini, A., & Bortolini, M. (2013). Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport. *J Clin Pharmacol*, 53(5), 463-474. <https://doi.org/10.1002/jcph.23>

Coutre, S. E., Byrd, J. C., Hillmen, P., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Devereux, S., Robak, T., Kipps, T. J., Schuh, A., Moreno, C., Furman, R. R., Burger, J. A., O'Dwyer, M., Ghia, P., Valentino, R., Chang, S., Dean, J. P., James, D. F., & O'Brien, S. M. (2019). Long-term safety of single-agent ibrutinib in patients with chronic lymphocytic leukemia in 3 pivotal studies. *Blood Adv*, 3(12), 1799-1807. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018028761>

Dai, T., Ye, L., Yu, H., Li, K., Li, J., Liu, R., Lu, X., Deng, M., Li, R., Liu, W., Yang, Y., & Wang, G. (2021). Regulation Network and Prognostic Significance of Aldo-Keto Reductase (AKR) Superfamily Genes in Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*, 8, 997-1021. <https://doi.org/10.2147/JHC.S323743>

Davies, A., Caddy, J., Mercer, K., Saunders, G. N., Stanton, L., Collins, G. P., Cummin, T. E. C., Schuh, A., Ardeshtna, K. M., McMillan, A., Radford, J. A., Lewis, D. J., Coleman, A., Griffiths, G., Burton, C., Barrans, S., & Johnson, P. (2020). Acalabrutinib in Combination with Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine and Prednisolone (R-CHOP) As First Line Therapy for Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): The Accept Phase Ib/II Single Arm Study. *Blood*, 136(Supplement 1), 38-39. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-134546>

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>

Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Romesser, P. B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Shaffer, A. L., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Jiang, J. K., Thomas, C. J., Rosenwald, A., Ott, G., . . . Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463(7277), 88-92. <https://doi.org/10.1038/nature08638>

de Claro, R. A., McGinn, K. M., Verdun, N., Lee, S. L., Chiu, H. J., Saber, H., Brower, M. E., Chang, C. J., Pfuma, E., Habtemariam, B., Bullock, J., Wang, Y., Nie, L., Chen, X. H., Lu, D. R., Al-Hakim, A., Kane, R. C., Kaminskis, E., Justice, R., . . . Pazdur, R. (2015). FDA Approval: Ibrutinib for Patients with Previously Treated Mantle Cell Lymphoma and Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*, 21(16), 3586-3590. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2225>

de Gorter, D. J., Beuling, E. A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J. M., Hendriks, R. W., Pals, S. T., & Spaargaren, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*, 26(1), 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.012>

Desmond, J. C., Mountford, J. C., Drayson, M. T., Walker, E. A., Hewison, M., Ride, J. P., Luong, Q. T., Hayden, R. E., Vanin, E. F., & Bunce, C. M. (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 Res*, 63(2), 505-512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543809>

DeVita, V. T., Jr., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21), 8643-8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>

Dhillon, S. (2020). Tirabrutinib: First Approval. *Drugs*, 80(8), 835-840. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01318-8>

- Dhillon, S. (2021). Orelabrutinib: First Approval. *Drugs*, 81(4), 503-507. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01482-5>
- DiStefano, J. K., & Davis, B. (2019). Diagnostic and Prognostic Potential of AKR1B10 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/cancers11040486>
- Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P., & Parissenti, A. M. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab*, 16(6), 412-426. <https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>
- Evans, K., Duan, J., Pritchard, T., Jones, C. D., McDermott, L., Gu, Z., Toscan, C. E., El-Zein, N., Mayoh, C., Erickson, S. W., Guo, Y., Meng, F., Jung, D., Rath, K. S., Roberts, K. G., Mullighan, C. G., Shia, C. S., Pearce, T., Teicher, B. A., . . . Lock, R. B. (2019). OBI-3424, a Novel AKR1C3-Activated Prodrug, Exhibits Potent Efficacy against Preclinical Models of T-ALL. *Clin Cancer Res*, 25(14), 4493-4503. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0551>
- FDA. (2024a). *U.S. Food & Drug Administration: BRUKINSA prescribing information*. Retrieved 11. 06. 2024 from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2023/213217s007lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/213217s007lbl.pdf)
- FDA. (2024b). *U.S. Food & Drug Administration: CALQUENCE prescribing information*. Retrieved 11. 06. 2024 from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2022/216387Orig2s000Correctedlbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/216387Orig2s000Correctedlbl.pdf)
- FDA. (2024c). *U.S. Food & Drug Administration: IMBRUVICA prescribing information*. Retrieved 11. 06. 2024 from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2022/217003s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/217003s000lbl.pdf)
- FDA. (2024d). *U.S. Food & Drug Administration: JAYPIRCA prescribing information*. Retrieved 11. 06. 2024 from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2023/216059s001lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/216059s001lbl.pdf)
- FDA. (2024e). *U.S. Food & Drug Administration: List of the Relevant Molecular Targets in Paediatric Oncology*. Retrieved 22. 07. 2024 from <https://www.fda.gov/media/120332/download>
- Flaherty, K. T., Puzanov, I., Kim, K. B., Ribas, A., McArthur, G. A., Sosman, J. A., O'Dwyer, P. J., Lee, R. J., Grippo, J. F., Nolop, K., & Chapman, P. B. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(9), 809-819. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1002011>
- Furman, R. R., Byrd, J. C., Owen, R. G., O'Brien, S. M., Brown, J. R., Hillmen, P., Stephens, D. M., Chernyukhin, N., Lezhava, T., Hamdy, A. M., Izumi, R., Patel, P., Baek, M., Christian, B., Dyer, M. J. S., Streetly, M. J., Sun, C., Rule, S., Wang, M., . . . Sharman, J. P. (2021). Pooled analysis of safety data from clinical trials evaluating acalabrutinib monotherapy in mature B-cell malignancies. *Leukemia*, 35(11), 3201-3211. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01252-y>
- Gabbay, K. H. (1975). Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med*, 26, 521-536. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.26.020175.002513>
- Gabbay, K. H. (2004). Aldose reductase inhibition in the treatment of diabetic neuropathy: where are we in 2004? *Curr Diab Rep*, 4(6), 405-408. <https://doi.org/10.1007/s11892-004-0047-z>
- Gabrielli, F., Antinucci, M., & Tofanelli, S. (2022). Gene Structure Evolution of the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Family. *Genes (Basel)*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/genes14010110>

- Gallego, O., Ruiz, F. X., Ardevol, A., Dominguez, M., Alvarez, R., de Lera, A. R., Rovira, C., Farres, J., Fita, I., & Pares, X. (2007). Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(52), 20764-20769. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705659105>
- Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell*, *28*(6), 690-714. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.10.012>
- Garcia-Aranda, M., & Redondo, M. (2017). Protein Kinase Targets in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122543>
- Gascoyne, R. D. (2015). XIV. The pathology of transformation of indolent B cell lymphomas. *Hematol Oncol*, *33 Suppl 1*, 75-79. <https://doi.org/10.1002/hon.2222>
- Gauld, S. B., Dal Porto, J. M., & Cambier, J. C. (2002). B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science*, *296*(5573), 1641-1642. <https://doi.org/10.1126/science.1071546>
- Gavelova, M., Hladikova, J., Vildova, L., Novotna, R., Vondracek, J., Krcmar, P., Machala, M., & Skalova, L. (2008). Reduction of doxorubicin and oracin and induction of carbonyl reductase in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Chem Biol Interact*, *176*(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.07.011>
- Geng, H., Jia, S., Zhang, Y., Li, J., Yang, Q., Zeng, L., Zong, X., Lu, Y., Lu, S., Zhou, J., Li, C., & Wu, D. (2023). Efficacy and safety of zanubrutinib plus R-CHOP in treatment of non-GCB DLBCL with extranodal involvement. *Front Immunol*, *14*, 1219167. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1219167>
- Goodman, L. S., & Gilman, A. (2018). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13th ed. McGraw-Hill Education.
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*, *53*, 615-627. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>
- Grassilli, E., Pisano, F., Cialdella, A., Bonomo, S., Missaglia, C., Cerrito, M. G., Masiero, L., Ianzano, L., Giordano, F., Cicirelli, V., Narloch, R., D'Amato, F., Noli, B., Ferri, G. L., Leone, B. E., Stanta, G., Bonin, S., Helin, K., Giovannoni, R., & Lavitrano, M. (2016). A novel oncogenic BTK isoform is overexpressed in colon cancers and required for RAS-mediated transformation. *Oncogene*, *35*(33), 4368-4378. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.504>
- Grein, A. (1987). Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. *Adv Appl Microbiol*, *32*, 203-214. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70081-9](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70081-9)
- Grundy, M., Seedhouse, C., Russell, N. H., & Pallis, M. (2011). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein in acute myeloid leukaemia cells treated with the aurora-B kinase inhibitor barasertib-hQPA. *BMC Cancer*, *11*, 254. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-254>
- Guengerich, F. P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *39*, 1-17. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.1>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heibin, A. D., Guo, B., Sprowl, J. A., Maclean, D. A., & Parissenti, A. M. (2012). Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. *BMC Cancer*, *12*, 381. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-381>
- Hendriks, R. W., Yuvaraj, S., & Kil, L. P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer*, *14*(4), 219-232. <https://doi.org/10.1038/nrc3702>

Hennequin, C., Guillermin, S., & Quero, L. (2019). Combination of chemotherapy and radiotherapy: A thirty years evolution. *Cancer Radiother*, 23(6-7), 662-665. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2019.07.157>

Herman, S. E., Gordon, A. L., Hertlein, E., Ramanunni, A., Zhang, X., Jaglowski, S., Flynn, J., Jones, J., Blum, K. A., Buggy, J. J., Hamdy, A., Johnson, A. J., & Byrd, J. C. (2011). Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood*, 117(23), 6287-6296. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-328484>

Hevir, N., Sinkovec, J., & Lanisnik Rizner, T. (2013). Decreased levels of AKR1B1 and AKR1B10 in cancerous endometrium compared to adjacent non-cancerous tissue. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.11.001>

Hofman, J., Malcekova, B., Skarka, A., Novotna, E., & Wsol, V. (2014). Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicol Appl Pharmacol*, 278(3), 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.027>

Hofman, J., Skarka, A., Havrankova, J., & Wsol, V. (2015). Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochem Pharmacol*, 96(3), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.005>

Honigberg, L. A., Smith, A. M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D. H., Miller, R. A., & Buggy, J. J. (2010). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(29), 13075-13080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004594107>

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 6(3), 1769-1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>

Hsiao, S. H., Lusvardi, S., Huang, Y. H., Ambudkar, S. V., Hsu, S. C., & Wu, C. P. (2019). The FLT3 inhibitor midostaurin selectively resensitizes ABCB1-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Lett*, 445, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.001>

Huttunen, K. M., Raunio, H., & Rautio, J. (2011). Prodrugs--from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev*, 63(3), 750-771. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>

Hyvonen, M., & Saraste, M. (1997). Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: molecular explanations for X-linked agammaglobulinemia. *EMBO J*, 16(12), 3396-3404. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3396>

Chang, B. Y., Francesco, M., De Rooij, M. F., Magadala, P., Steggerda, S. M., Huang, M. M., Kuil, A., Herman, S. E., Chang, S., Pals, S. T., Wilson, W., Wiestner, A., Spaargaren, M., Buggy, J. J., & Elias, L. (2013). Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*, 122(14), 2412-2424. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482125>

Chang, B. Y., Huang, M. M., Francesco, M., Chen, J., Sokolove, J., Magadala, P., Robinson, W. H., & Buggy, J. J. (2011). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis Res Ther*, 13(4), R115. <https://doi.org/10.1186/ar3400>

Chang, K. C., Ponder, J., Labarbera, D. V., & Petrash, J. M. (2014). Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced inflammatory responses in retinal microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(5), 2853-2861. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13487>

- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., . . . Group, B.-S. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, *364*(26), 2507-2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Chen, J., Kinoshita, T., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., & Elias, L. (2016). Ibrutinib Inhibits ERBB Receptor Tyrosine Kinases and HER2-Amplified Breast Cancer Cell Growth. *Mol Cancer Ther*, *15*(12), 2835-2844. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0923>
- Chen, Z., Wang, Y., Warden, C., & Chen, S. (2015). Cross-talk between ER and HER2 regulates c-MYC-mediated glutamine metabolism in aromatase inhibitor resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *149*, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.02.004>
- Cheng, G., Ye, Z. S., & Baltimore, D. (1994). Binding of Bruton's tyrosine kinase to Fyn, Lyn, or Hck through a Src homology 3 domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(17), 8152-8155. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8152>
- Chik, F., Szyf, M., & Rabbani, S. A. (2011). Role of epigenetics in cancer initiation and progression. *Adv Exp Med Biol*, *720*, 91-104. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0254-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0254-1_8)
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, *58*(3), 621-681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, *70*(2), 440-446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Chung, Y. T., Matkowskyj, K. A., Li, H., Bai, H., Zhang, W., Tsao, M. S., Liao, J., & Yang, G. Y. (2012). Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. *Mod Pathol*, *25*(5), 758-766. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.191>
- Iarussi, D., Indolfi, P., Casale, F., Martino, V., Di Tullio, M. T., & Calabro, R. (2005). Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with cancer: strategies for prevention and management. *Paediatr Drugs*, *7*(2), 67-76. <https://doi.org/10.2165/00148581-200507020-00001>
- Ireland, L. S., Harrison, D. J., Neal, G. E., & Hayes, J. D. (1998). Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *Biochem J*, *332* ( Pt 1)(Pt 1), 21-34. <https://doi.org/10.1042/bj3320021>
- Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Breeden, M., Garcia-Manero, G., O'Brien, S., Ravandi, F., Borthakur, G., & Cortes, J. (2008). Characteristics and outcomes of patients with chronic myeloid leukemia and T315I mutation following failure of imatinib mesylate therapy. *Blood*, *112*(1), 53-55. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-123950>
- Jongstra-Bilen, J., Puig Cano, A., Hasija, M., Xiao, H., Smith, C. I., & Cybulsky, M. I. (2008). Dual functions of Bruton's tyrosine kinase and Tec kinase during Fcγ receptor-induced signaling and phagocytosis. *J Immunol*, *181*(1), 288-298. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.288>
- Jurczak, W., Rule, S., Townsend, W., Tucker, D., Sarholz, B., Scheele, J., Dyroff, M., Gribben, J. G., Dlugosz-Danecka, M., & Zinzani, P. L. (2021). Phase I, first-in-human trial of Bruton's tyrosine kinase inhibitor M7583 in patients with B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*, *62*(10), 2392-2399. <https://doi.org/10.1080/10428194.2021.1913139>

- Kang, M. W., Lee, E. S., Yoon, S. Y., Jo, J., Lee, J., Kim, H. K., Choi, Y. S., Kim, K., Shim, Y. M., Kim, J., & Kim, H. (2011). AKR1B10 is associated with smoking and smoking-related non-small-cell lung cancer. *J Int Med Res*, *39*(1), 78-85. <https://doi.org/10.1177/147323001103900110>
- Kaptein, A., de Bruin, G., Emmelot-van Hoek, M., van de Kar, B., de Jong, A., Gulrajani, M., Demont, D., Covey, T., Mittag, D., & Barf, T. (2018). Potency and Selectivity of BTK Inhibitors in Clinical Development for B-Cell Malignancies. *Blood*, *132*. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-109973>
- Kassner, N., Huse, K., Martin, H. J., Godtel-Armbrust, U., Metzger, A., Meineke, I., Brockmoller, J., Klein, K., Zanger, U. M., Maser, E., & Wojnowski, L. (2008). Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos*, *36*(10), 2113-2120. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.022251>
- Kiss, K., Kucsma, N., Brozik, A., Tusnady, G. E., Bergam, P., van Niel, G., & Szakacs, G. (2015). Role of the N-terminal transmembrane domain in the endo-lysosomal targeting and function of the human ABCB6 protein. *Biochem J*, *467*(1), 127-139. <https://doi.org/10.1042/BJ20141085>
- Knoll, M., & Pleiss, J. (2008). The Medium-Chain Dehydrogenase/reductase Engineering Database: a systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship. *Protein Sci*, *17*(10), 1689-1697. <https://doi.org/10.1110/ps.035428.108>
- Kokabee, L., Wang, X., Sevinsky, C. J., Wang, W. L., Cheu, L., Chittur, S. V., Karimipoor, M., Tenniswood, M., & Conklin, D. S. (2015). Bruton's tyrosine kinase is a potential therapeutic target in prostate cancer. *Cancer Biol Ther*, *16*(11), 1604-1615. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1078023>
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., & Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*, *117*(6), 787-800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.014>
- Lacouture, M., & Sibaud, V. (2018). Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *Am J Clin Dermatol*, *19*(Suppl 1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s40257-018-0384-3>
- Laffin, B., & Petrash, J. M. (2012). Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Front Pharmacol*, *3*, 104. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00104>
- Lan, Q., Mumford, J. L., Shen, M., Demarini, D. M., Bonner, M. R., He, X., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Tian, L., Chapman, R. S., Zheng, T., Keohavong, P., Caporaso, N., & Rothman, N. (2004). Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis*, *25*(11), 2177-2181. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh240>
- Li, D., Ferrari, M., & Ellis, E. M. (2012). Human aldo-keto reductase AKR7A2 protects against the cytotoxicity and mutagenicity of reactive aldehydes and lowers intracellular reactive oxygen species in hamster V79-4 cells. *Chem Biol Interact*, *195*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.09.007>
- Li, M., Zhang, L., Yu, J., Wang, X., Cheng, L., Ma, Z., Chen, X., Wang, L., & Goh, B. C. (2024). AKR1C3 in carcinomas: from multifaceted roles to therapeutic strategies. *Front Pharmacol*, *15*, 1378292. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1378292>
- Li, T., Deng, Y., Shi, Y., Tian, R., Chen, Y., Zou, L., Kazi, J. U., Ronnstrand, L., Feng, B., Chan, S. O., Chan, W. Y., Sun, J., & Zhao, H. (2018). Bruton's tyrosine kinase potentiates ALK signaling and serves as a potential therapeutic target of neuroblastoma. *Oncogene*, *37*(47), 6180-6194. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0397-7>

Li, X., Zou, S., Li, Z., Cai, G., Chen, B., Wang, P., & Dong, W. (2016). The identification of human aldo-keto reductase AKR7A2 as a novel cytoglobin-binding partner. *Cell Mol Biol Lett*, 21, 25. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0026-9>

Liang, C., Tian, D., Ren, X., Ding, S., Jia, M., Xin, M., & Thareja, S. (2018). The development of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors from 2012 to 2017: A mini-review. *Eur J Med Chem*, 151, 315-326. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.062>

Liauw, S. L., Connell, P. P., & Weichselbaum, R. R. (2013). New Paradigms and Future Challenges in Radiation Oncology: An Update of Biological Targets and Technology. *Science Translational Medicine*, 5(173). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005148>

Lin, C. H., Elkholy, K. H., Wani, N. A., Li, D., Hu, P., Barajas, J. M., Yu, L., Zhang, X., Jacob, S. T., Khan, W. N., Bai, X. F., Noonan, A. M., & Ghoshal, K. (2020). Ibrutinib Potentiates Antihepatocarcinogenic Efficacy of Sorafenib by Targeting EGFR in Tumor Cells and BTK in Immune Cells in the Stroma. *Mol Cancer Ther*, 19(2), 384-396. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0135>

Liu, C., Armstrong, C. M., Lou, W., Lombard, A., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2017). Inhibition of AKR1C3 Activation Overcomes Resistance to Abiraterone in Advanced Prostate Cancer. *Mol Cancer Ther*, 16(1), 35-44. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0186>

Liu, C., Lou, W., Zhu, Y., Yang, J. C., Nadiminty, N., Gaikwad, N. W., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2015). Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 75(7), 1413-1422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3080>

Liu, C. Y., Hsu, Y. H., Pan, P. C., Wu, M. T., Ho, C. K., Su, L., Xu, X., Li, Y., Christiani, D. C., & Kaohsiung Leukemia Research, G. (2008). Maternal and offspring genetic variants of AKR1C3 and the risk of childhood leukemia. *Carcinogenesis*, 29(5), 984-990. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn071>

Liu, H., Luo, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Wu, Q., Yuan, L., Chung, S. S., Oates, P. J., & Yang, J. Y. (2011). Genetic deficiency of aldose reductase counteracts the development of diabetic nephropathy in C57BL/6 mice. *Diabetologia*, 54(5), 1242-1251. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2045-4>

Liu, Q., Sabnis, Y., Zhao, Z., Zhang, T., Buhrlage, S. J., Jones, L. H., & Gray, N. S. (2013). Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chem Biol*, 20(2), 146-159. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.12.006>

Liu, X. J., Xu, L., Pang, X. J., Ying Yuan, X., Yu, G. X., Li, Y. R., Guan, Y. F., Zhang, Y. B., Song, J., Zhang, Q. R., & Zhang, S. Y. (2021). Progress in the development of small molecular inhibitors of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising cancer therapy. *Bioorg Med Chem*, 47, 116358. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116358>

Locher, K. P. (2009). Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1514), 239-245. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0125>

Lyon, R. C., Johnston, S. M., Watson, D. G., McGarvie, G., & Ellis, E. M. (2007). Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J Biol Chem*, 282(36), 25986-25992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702465200>

Malatkova, P., Maser, E., & Wsol, V. (2010). Human carbonyl reductases. *Curr Drug Metab*, 11(8), 639-658. <https://doi.org/10.2174/138920010794233530>

Mao, C., Zhou, M., & Uckun, F. M. (2001). Crystal structure of Bruton's tyrosine kinase domain suggests a novel pathway for activation and provides insights into the

molecular basis of X-linked agammaglobulinemia. *J Biol Chem*, 276(44), 41435-41443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104828200>

Marcotte, D. J., Liu, Y. T., Arduini, R. M., Hession, C. A., Miatkowski, K., Wildes, C. P., Cullen, P. F., Hong, V., Hopkins, B. T., Mertsching, E., Jenkins, T. J., Romanowski, M. J., Baker, D. P., & Silvian, L. F. (2010). Structures of human Bruton's tyrosine kinase in active and inactive conformations suggest a mechanism of activation for TEC family kinases. *Protein Sci*, 19(3), 429-439. <https://doi.org/10.1002/pro.321>

Martin, H. J., Breyer-Pfaff, U., Wsol, V., Venz, S., Block, S., & Maser, E. (2006). Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos*, 34(3), 464-470. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.007971>

Matsunaga, T., Hojo, A., Yamane, Y., Endo, S., El-Kabbani, O., & Hara, A. (2013). Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. *Chem Biol Interact*, 202(1-3), 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.024>

Matsunaga, T., Okumura, N., Saito, H., Morikawa, Y., Suenami, K., Hisamatsu, A., Endo, S., & Ikari, A. (2020). Significance of aldo-keto reductase 1C3 and ATP-binding cassette transporter B1 in gain of irinotecan resistance in colon cancer cells. *Chem Biol Interact*, 332, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109295>

Matsunaga, T., Shintani, S., & Hara, A. (2006). Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(1), 1-18. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.1>

Mattioli, R., Ilari, A., Colotti, B., Mosca, L., Fazi, F., & Colotti, G. (2023). Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med*, 93, 101205. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205>

McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*, 31(1), 63-75. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>

Michael, M., & Doherty, M. M. (2005). Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 23(1), 205-229. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.120>

Min, H. Y., & Lee, H. Y. (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Exp Mol Med*, 54(10), 1670-1694. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00864-3>

Mindnich, R. D., & Penning, T. M. (2009). Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum Genomics*, 3(4), 362-370. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-4-362>

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56(2), 185-229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>

Molina-Cerrillo, J., Alonso-Gordoa, T., Gajate, P., & Grande, E. (2017). Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising target in solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 58, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.06.001>

Morell, A., Novotna, E., Milan, J., Danielisova, P., Bukum, N., & Wsol, V. (2021). Selective inhibition of aldo-keto reductase 1C3: a novel mechanism involved in midostaurin and daunorubicin synergism. *Arch Toxicol*, 95(1), 67-78. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02884-2>



Motofei, I. G. (2018). Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Invest*, 36(5), 309-317. <https://doi.org/10.1080/07357907.2018.1477955>

Munakata, W., Ando, K., Hatake, K., Fukuhara, N., Kinoshita, T., Fukuhara, S., Shirasugi, Y., Yokoyama, M., Ichikawa, S., Ohmachi, K., Gion, N., Aoi, A., & Tobinai, K. (2019). Phase I study of tirabrutinib (ONO-4059/GS-4059) in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies in Japan. *Cancer Sci*, 110(5), 1686-1694. <https://doi.org/10.1111/cas.13983>

Murakami, A., Fukushima, C., Yoshidomi, K., Sueoka, K., Nawata, S., Yokoyama, Y., Tsuchida, S., Ismail, E., Al-Mulla, F., & Sugino, N. (2011). Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behaviour in uterine cervical squamous cell carcinoma: carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. *Cancer Lett*, 311(1), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.036>

Muzio, M., Apollonio, B., Scielzo, C., Frenquelli, M., Vandoni, I., Boussiotis, V., Caligaris-Cappio, F., & Ghia, P. (2008). Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*, 112(1), 188-195. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-111344>

Niir, H., & Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, 2(12), 945-956. <https://doi.org/10.1038/nri955>

Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 34-47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>

Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrc2607>

Novotna, E., Bukum, N., Hofman, J., Flaxova, M., Kouklikova, E., Louvarova, D., & Wsol, V. (2018a). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Arch Toxicol*, 92(9), 2845-2857. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2258-0>

Novotna, E., Bukum, N., Hofman, J., Flaxova, M., Kouklikova, E., Louvarova, D., & Wsol, V. (2018b). Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic target for cancer treatment. *Biochem Pharmacol*, 156, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.001>

Novotna, R., Wsol, V., Xiong, G., & Maser, E. (2008). Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett*, 181(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.858>

O'Connor, T., Ireland, L. S., Harrison, D. J., & Hayes, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J*, 343 Pt 2(Pt 2), 487-504. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510318>

Oduwole, O. O., Li, Y., Isomaa, V. V., Mantyniemi, A., Pulkka, A. E., Soini, Y., & Vihko, P. T. (2004). 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res*, 64(20), 7604-7609. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0446>

Ohara, H., Miyabe, Y., Deyashiki, Y., Matsuura, K., & Hara, A. (1995). Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. *Biochem Pharmacol*, 50(2), 221-227. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00124-i](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00124-i)

Oppermann, U. (2007). Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu*

- Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 293-322.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105316>
- Oppermann, U. C., Filling, C., & Jornvall, H. (2001). Forms and functions of human SDR enzymes. *Chem Biol Interact*, 130-132(1-3), 699-705.  
[https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(00\)00301-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(00)00301-x)
- Oppermann, U. C., & Maser, E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144(1-3), 71-81. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00192-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00192-4)
- Ortolano, S., Hwang, I. Y., Han, S. B., & Kehrl, J. H. (2006). Roles for phosphoinositide 3-kinases, Bruton's tyrosine kinase, and Jun kinases in B lymphocyte chemotaxis and homing. *Eur J Immunol*, 36(5), 1285-1295.  
<https://doi.org/10.1002/eji.200535799>
- Ostberg, L. J., Hoog, J. O., & Persson, B. (2024). Computational analysis of human medium-chain dehydrogenases/reductases revealing substrate- and coenzyme-binding characteristics. *Chem Biol Interact*, 390, 110876.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2024.110876>
- Pal Singh, S., Dammeijer, F., & Hendriks, R. W. (2018). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol Cancer*, 17(1), 57.  
<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0779-z>
- Park, H., Wahl, M. I., Afar, D. E., Turck, C. W., Rawlings, D. J., Tam, C., Scharenberg, A. M., Kinet, J. P., & Witte, O. N. (1996). Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity*, 4(5), 515-525.  
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80417-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80417-3)
- Patel, V. K., Lamothe, B., Ayres, M. L., Gay, J., Cheung, J. P., Balakrishnan, K., Ivan, C., Morse, J., Nelson, M., Keating, M. J., Wierda, W. G., Marszalek, J. R., & Gandhi, V. (2018). Pharmacodynamics and proteomic analysis of acalabrutinib therapy: similarity of on-target effects to ibrutinib and rationale for combination therapy. *Leukemia*, 32(4), 920-930. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.321>
- Pathania, S., Bhatia, R., Baldi, A., Singh, R., & Rawal, R. K. (2018). Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed Pharmacother*, 105, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.117>
- Penning, T. M. (2005). AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res*, 11(5), 1687-1690. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0071>
- Penning, T. M., & Drury, J. E. (2007). Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys*, 464(2), 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.024>
- Penning, T. M., Jin, Y., Rizner, T. L., & Bauman, D. R. (2008). Pre-receptor regulation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 281(1-2), 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.10.008>
- Penning, T. M., Jonnalagadda, S., Trippier, P. C., & Rizner, T. L. (2021). Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacol Rev*, 73(3), 1150-1171.  
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000122>
- Perez-Herrero, E., & Fernandez-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 93, 52-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>
- Persson, B., Hedlund, J., & Jornvall, H. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci*, 65(24), 3879-3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8587-z>

Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jornvall, H., Kavanagh, K. L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T. M., Thornton, J. M., Adamski, J., & Oppermann, U. (2009). The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact*, 178(1-3), 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.040>

Peters, G. J. (2019). From 'Targeted Therapy' to Targeted Therapy. *Anticancer Res*, 39(7), 3341-3345. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13476>

Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (2008). Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol Sci*, 29(6), 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.03.004>

Picklo, M. J., Sr., Olson, S. J., Hayes, J. D., Markesbery, W. R., & Montine, T. J. (2001). Elevation of AKR7A2 (succinic semialdehyde reductase) in neurodegenerative disease. *Brain Res*, 916(1-2), 229-238. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02897-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02897-9)

Pilka, E. S., Niesen, F. H., Lee, W. H., El-Hawari, Y., Dunford, J. E., Kochan, G., Wsol, V., Martin, H. J., Maser, E., & Oppermann, U. (2009). Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PLoS One*, 4(10), e7113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007113>

Pina-Sanchez, P., Chavez-Gonzalez, A., Ruiz-Tachiquin, M., Vadillo, E., Monroy-Garcia, A., Montesinos, J. J., Grajales, R., Gutierrez de la Barrera, M., & Mayani, H. (2021). Cancer Biology, Epidemiology, and Treatment in the 21st Century: Current Status and Future Challenges From a Biomedical Perspective. *Cancer Control*, 28, 10732748211038735. <https://doi.org/10.1177/10732748211038735>

Plebuch, M., Soldan, M., Hungerer, C., Koch, L., & Maser, E. (2007). Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Lett*, 255(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.03.018>

Ponader, S., Chen, S. S., Buggy, J. J., Balakrishnan, K., Gandhi, V., Wierda, W. G., Keating, M. J., O'Brien, S., Chiorazzi, N., & Burger, J. A. (2012). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119(5), 1182-1189. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386417>

Quinones-Lombrana, A., Intini, A., & Blanco, J. G. (2019). Insights into the transcriptional regulation of the anthracycline reductase AKR7A2 in human cardiomyocytes. *Toxicol Lett*, 307, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.015>

Ramos, A., Sadeghi, S., & Tabatabaeian, H. (2021). Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them. *Int J Mol Sci*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179451>

Rawlings, D. J., Scharenberg, A. M., Park, H., Wahl, M. I., Lin, S., Kato, R. M., Fluckiger, A. C., Witte, O. N., & Kinet, J. P. (1996). Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science*, 271(5250), 822-825. <https://doi.org/10.1126/science.271.5250.822>

Reddy, K. A., Kumar, P. U., Srinivasulu, M., Triveni, B., Sharada, K., Ismail, A., & Reddy, G. B. (2017). Overexpression and enhanced specific activity of aldoketo reductases (AKR1B1 & AKR1B10) in human breast cancers. *Breast*, 31, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.11.003>

Rochat, B. (2009). Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 9(5), 652-674. <https://doi.org/10.2174/156800909789056999>

- Rotin, L. E., Gronda, M., Hurren, R., Wang, X., Minden, M. D., Slassi, M., & Schimmer, A. D. (2016). Investigating the synergistic mechanism between ibrutinib and daunorubicin in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, 57(10), 2432-2436. <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1138292>
- Ruparelia, K. C., Zeka, K., Ijaz, T., Ankrett, D. N., Wilsher, N. E., Butler, P. C., Tan, H. L., Lodhi, S., Bhambra, A. S., Potter, G. A., Arroyo, R. R. J., & Beresford, K. J. M. (2018). The Synthesis of Chalcones as Anticancer Prodrugs and their Bioactivation in CYP1 Expressing Breast Cancer Cells. *Med Chem*, 14(4), 322-332. <https://doi.org/10.2174/1573406414666180112120134>
- Rushworth, S. A., Murray, M. Y., Zaitseva, L., Bowles, K. M., & MacEwan, D. J. (2014). Identification of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*, 123(8), 1229-1238. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-511154>
- Saleh, L. M., Wang, W., Herman, S. E., Saba, N. S., Anastas, V., Barber, E., Corrigan-Cummins, M., Farooqui, M., Sun, C., Sarasua, S. M., Zhao, Z., Abousamra, N. K., Elbaz, O., Abdelghaffar, H. A., Wiestner, A., & Calvo, K. R. (2017). Ibrutinib downregulates a subset of miRNA leading to upregulation of tumor suppressors and inhibition of cell proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 31(2), 340-349. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.181>
- Satterthwaite, A. B., Cheroutre, H., Khan, W. N., Sideras, P., & Witte, O. N. (1997). Btk dosage determines sensitivity to B cell antigen receptor cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24), 13152-13157. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13152>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*, 18(1-2), 43-73. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.40>
- Shandilya, M., Sharma, S., Prasad Das, P., & Charak, S. (2020). Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines. In H. Arnouk & B. Abdul Rasool Hassan (Eds.), *Advances in Precision Medicine Oncology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91507>
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(3), 169-181. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>
- Shelton, J., Lu, X., Hollenbaugh, J. A., Cho, J. H., Amblard, F., & Schinazi, R. F. (2016). Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chem Rev*, 116(23), 14379-14455. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209>
- Shi, B., Xu, F. F., Xiang, C. P., Jia, R., Yan, C. H., Ma, S. Q., Wang, N., Wang, A. J., & Fan, P. (2020). Effect of sodium butyrate on ABC transporters in lung cancer A549 and colorectal cancer HCT116 cells. *Oncol Lett*, 20(5), 148. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12011>
- Shi, S. M., & Di, L. (2017). The role of carbonyl reductase 1 in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 13(8), 859-870. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1356820>
- Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2022). The effects of doxorubicin on cardiac calcium homeostasis and contractile function. *J Cardiol*, 80(2), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2022.01.001>
- Scheers, E., Leclercq, L., de Jong, J., Bode, N., Bockx, M., Laenen, A., Cuyckens, F., Skee, D., Murphy, J., Sukbuntherng, J., & Mannens, G. (2015). Absorption, metabolism, and excretion of oral (1)(4)C radiolabeled ibrutinib: an open-label, phase I, single-dose study in healthy men. *Drug Metab Dispos*, 43(2), 289-297. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060061>

Schneider, E., & Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev*, 22(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00358.x>

Siegel, D., Yan, C., & Ross, D. (2012). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem Pharmacol*, 83(8), 1033-1040. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.017>

Singh, M., Kapoor, A., & Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chem Biol Interact*, 234, 261-273. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.028>

Singh, S. P., Pillai, S. Y., de Bruijn, M. J. W., Stadhouders, R., Corneth, O. B. J., van den Ham, H. J., Muggen, A., van, I. W., Slinger, E., Kuil, A., Spaargaren, M., Kater, A. P., Langerak, A. W., & Hendriks, R. W. (2017). Cell lines generated from a chronic lymphocytic leukemia mouse model exhibit constitutive Btk and Akt signaling. *Oncotarget*, 8(42), 71981-71995. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18234>

Skarydova, L., Tomanova, R., Havlikova, L., Stambergova, H., Solich, P., & Wsol, V. (2014). Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metab Pharmacokinet*, 29(2), 177-184. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-13-rg-051>

Soldan, M., Netter, K. J., & Maser, E. (1996). Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 51(2), 117-123. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02121-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02121-3)

Sorf, A., Novotna, E., Hofman, J., Morell, A., Staud, F., Wsol, V., & Ceckova, M. (2019). Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters. *Biochem Pharmacol*, 163, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.035>

Stambergova, H., Skarydova, L., Dunford, J. E., & Wsol, V. (2014). Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact*, 207, 52-57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.003>

Stanbrough, M., Bublely, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G., & Balk, S. P. (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, 66(5), 2815-2825. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4000>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Szakacs, G., Hall, M. D., Gottesman, M. M., Boumendjel, A., Kachadourian, R., Day, B. J., Baubichon-Cortay, H., & Di Pietro, A. (2014). Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev*, 114(11), 5753-5774. <https://doi.org/10.1021/cr4006236>

Tai, Y. T., Chang, B. Y., Kong, S. Y., Fulciniti, M., Yang, G., Calle, Y., Hu, Y., Lin, J., Zhao, J. J., Cagnetta, A., Cea, M., Sellitto, M. A., Zhong, M. Y., Wang, Q., Acharya, C., Carrasco, D. R., Buggy, J. J., Elias, L., Treon, S. P., . . . Anderson, K. C. (2012). Bruton tyrosine kinase inhibition is a novel therapeutic strategy targeting tumor in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Blood*, 120(9), 1877-1887. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396853>

Tam, C. S., Dimopoulos, M., Garcia-Sanz, R., Trotman, J., Opat, S., Roberts, A. W., Owen, R., Song, Y., Xu, W., Zhu, J., Li, J., Qiu, L., D'Sa, S., Jurczak, W., Cull, G., Marlton, P., Gottlieb, D., Munoz, J., Phillips, T., . . . Tedeschi, A. (2022). Pooled safety

analysis of zanubrutinib monotherapy in patients with B-cell malignancies. *Blood Adv*, 6(4), 1296-1308. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005621>

Tam, C. S., Trotman, J., Opat, S., Burger, J. A., Cull, G., Gottlieb, D., Harrup, R., Johnston, P. B., Marlton, P., Munoz, J., Seymour, J. F., Simpson, D., Tedeschi, A., Elstrom, R., Yu, Y., Tang, Z., Han, L., Huang, J., Novotny, W., . . . Roberts, A. W. (2019). Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL. *Blood*, 134(11), 851-859. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001160>

Treon, S. P., Tripsas, C. K., Meid, K., Warren, D., Varma, G., Green, R., Argyropoulos, K. V., Yang, G., Cao, Y., Xu, L., Patterson, C. J., Rodig, S., Zehnder, J. L., Aster, J. C., Harris, N. L., Kanan, S., Ghobrial, I., Castillo, J. J., Laubach, J. P., . . . Advani, R. H. (2015). Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med*, 372(15), 1430-1440. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501548>

Vadlapatla, R. K., Vadlapudi, A. D., Pal, D., & Mitra, A. K. (2013). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy: coordinated role and regulation of efflux transporters and metabolizing enzymes. *Curr Pharm Des*, 19(40), 7126-7140. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990493>

van Dalen, E. C., van der Pal, H. J., & Kremer, L. C. (2016). Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in people with cancer receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD005008. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005008.pub4>

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3), 281-290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>

Verma, K., Zang, T., Gupta, N., Penning, T. M., & Trippier, P. C. (2016). Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines. *ACS Med Chem Lett*, 7(8), 774-779. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00163>

Verma, K., Zang, T., Penning, T. M., & Trippier, P. C. (2019). Potent and Highly Selective Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) Inhibitors Act as Chemotherapeutic Potentiators in Acute Myeloid Leukemia and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Med Chem*, 62(7), 3590-3616. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00090>

Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., & et al. (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361(6409), 226-233. <https://doi.org/10.1038/361226a0>

Wang, X., Wong, J., Sevinsky, C. J., Kokabee, L., Khan, F., Sun, Y., & Conklin, D. S. (2016). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Prevent Therapeutic Escape in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther*, 15(9), 2198-2208. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0813>

Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*, 2(2), 141-160. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>

Watterson, S. H., Liu, Q., Beaudoin Bertrand, M., Batt, D. G., Li, L., Pattoli, M. A., Skala, S., Cheng, L., Obermeier, M. T., Moore, R., Yang, Z., Vickery, R., Elzinga, P. A., Discenza, L., D'Arienzo, C., Gillooly, K. M., Taylor, T. L., Pulicchio, C., Zhang, Y., . . . Tino, J. A. (2019). Discovery of Branebrutinib (BMS-986195): A Strategy for Identifying a Highly Potent and Selective Covalent Inhibitor Providing Rapid in Vivo Inactivation of Bruton's Tyrosine Kinase (BTK). *J Med Chem*, 62(7), 3228-3250. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00167>

- Wen, T., Wang, J., Shi, Y., Qian, H., & Liu, P. (2021). Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances. *Leukemia*, 35(2), 312-332. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01072-6>
- Wheeler, D. L., Dunn, E. F., & Harari, P. M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(9), 493-507. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.97>
- Wirth, H., & Wermuth, B. (1992). Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *J Histochem Cytochem*, 40(12), 1857-1863. <https://doi.org/10.1177/40.12.1453004>
- Woyach, J. A., Furman, R. R., Liu, T. M., Ozer, H. G., Zapatka, M., Ruppert, A. S., Xue, L., Li, D. H., Steggerda, S. M., Versele, M., Dave, S. S., Zhang, J., Yilmaz, A. S., Jaglowski, S. M., Blum, K. A., Lozanski, A., Lozanski, G., James, D. F., Barrientos, J. C., . . . Byrd, J. C. (2014). Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*, 370(24), 2286-2294. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400029>
- Wu, J., Zhang, M., & Liu, D. (2016). Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *J Hematol Oncol*, 9, 21. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0250-9>
- Xing, M., Yan, F., Yu, S., & Shen, P. (2015). Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One*, 10(7), e0133569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133569>
- Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Xu, L., Cao, Y., Manning, R. J., Patterson, C. J., Buhrlage, S. J., Gray, N., Tai, Y. T., Anderson, K. C., Hunter, Z. R., & Treon, S. P. (2013). A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 122(7), 1222-1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475111>
- Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
- Zámečník, J. (2019). *Patologie*. LD Prager Publishing.
- Zhang, H., Patel, A., Ma, S. L., Li, X. J., Zhang, Y. K., Yang, P. Q., Kathawala, R. J., Wang, Y. J., Anreddy, N., Fu, L. W., & Chen, Z. S. (2014). In vitro, in vivo and ex vivo characterization of ibrutinib: a potent inhibitor of the efflux function of the transporter MRP1. *Br J Pharmacol*, 171(24), 5845-5857. <https://doi.org/10.1111/bph.12889>
- Zhao, J., Xiang, Y., Xiao, C., Guo, P., Wang, D., Liu, Y., & Shen, Y. (2014). AKR1C3 overexpression mediates methotrexate resistance in choriocarcinoma cells. *Int J Med Sci*, 11(11), 1089-1097. <https://doi.org/10.7150/ijms.9239>
- Zhao, S. F., Wang, S. G., Zhao, Z. Y., & Li, W. L. (2019). AKR1C1-3, notably AKR1C3, are distinct biomarkers for liver cancer diagnosis and prognosis: Database mining in malignancies. *Oncol Lett*, 18(5), 4515-4522. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10802>
- Zhong, L., Shen, H., Huang, C., Jing, H., & Cao, D. (2011). AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicol Appl Pharmacol*, 255(1), 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.014>
- Zhou, S. F., Xue, C. C., Yu, X. Q., Li, C., & Wang, G. (2007). Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*, 29(6), 687-710. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31815c16f5>

Zhu, P., Feng, R., Lu, X., Liao, Y., Du, Z., Zhai, W., & Chen, K. (2021). Diagnostic and prognostic values of AKR1C3 and AKR1D1 in hepatocellular carcinoma. *Aging (Albany NY)*, 13(3), 4138-4156. <https://doi.org/10.18632/aging.202380>

Zhu, Z., Mu, Y., Qi, C., Wang, J., Xi, G., Guo, J., Mi, R., & Zhao, F. (2015). CYP1B1 enhances the resistance of epithelial ovarian cancer cells to paclitaxel in vivo and in vitro. *Int J Mol Med*, 35(2), 340-348. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2041>