

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**STUDIUM REZISTENCE V NÁDOROVÉ TERAPII - VLIV
INHIBITORŮ PROTEIN KINAS NA AKTIVITU
VYBRANÝCH LIDSKÝCH REDUKTAS II.**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Michaela Flaxová

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

Poděkování:

„ Děkuji svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D a rovněž RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za odborné vedení, shovívavost a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat mé rodině a mým nejbližším za trpělivost a podporu.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Michaela Flaxová

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

Název diplomové práce: Studium rezistence v nádorové terapii - vliv inhibitorů protein kinas na aktivitu vybraných lidských reduktas II.

Nádorová onemocnění jsou v dnešní době velkým problémem, incidence se meziročně stále zvyšuje. Antracyklinová antibiotika mají důležité postavení v terapii nádorových onemocnění, bohužel jejich závažné nežádoucí účinky a léková rezistence často negativně ovlivňují účinnou léčbu. Jedním z negativních účinků je i vznik kardiotoxicity. Starší teorie byly založeny na vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS), nicméně novější teorie potvrzují i ovlivnění složitých buněčných drah antracykliny, případně jejich metabolity. Předmětem této práce bylo studium enzymů, které metabolizují antracykliny, konkrétně daunorubicin.

Karbonyl redukující enzymy jsou NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy, které jsou schopné katalyzovat redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární metabolity, tímto způsobem je přeměňován právě daunorubicin na daunorubicinol. Proto jsme se nejvíce zajímali o enzymy z nadrodiny aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), konkrétně enzymem AKR1C3 a CBR1. Řada enzymů z těchto rodin je zapojena do patogeneze některých metabolických, zánětlivých a degenerativních procesů. Tyto přeměny jsou podstatné z hlediska vzniku rezistence nebo nežádoucích účinků antracyklinů. Proto bylo důležité zjistit, kterými reduktasami je konkrétně daunorubicin metabolizován.

V práci jsme se zabývali možností inhibice těchto enzymů pomocí inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDK). CDK hrají důležitou roli v buněčném cyklu a ovlivňují řadu buněčných procesů a zvýšení jejich aktivity může vést k nastartování nádorového bujení. Pokud by inhibitory CDK dostatečně inhibovaly AKR a CBR, snížily by deaktivaci daunorubicinu na daunorubicinol, a pomohly tak zamezit nebo alespoň oddálit rezistenci na antracykliny a zvýšily tak účinnost léčby v nádorové terapii.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Michaela Flaxová

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

Title of diploma thesis: Study of resistance in cancer therapy - protein kinase inhibitors influence on activity of selected human reductases II.

Nowadays cancerous diseases are significant problem, and the incidence is still increasing. Anthracycline antibiotics are important in therapy of cancerous diseases, unfortunately, they have serious side effects and drug resistance is often obstacle for the effective treatment. The origin of cardiotoxicity is still not clear, older theories were based on formation of reactive oxygen species (ROS). Nevertheless, newer theories confirm that anthracyclines or their metabolites influence complicated cell pathways. The enzymes, which metabolize anthracyclines, specifically daunorubicin, were the subject of this work.

The carbonyl reducing enzymes are NADP(H)-dependent oxidoreductases, which are able to catalyse reduction of aldehydes and ketones to primary and secondary metabolites, daunorubicin is transformed to daunorubicinol directly by this way. Therefore we are most interested in enzymes from aldo-keto reductase family and short-chain dehydrogenases (SDR), namely AKR1C3 and CBR1. Many enzymes of this family are involved in the pathogenesis of some metabolic, inflammatory and degenerative processes. These transformations are important for origin of resistance or side effects of anthracyclines. This is a reason for finding specific subtypes of enzymes which metabolize daunorubicin.

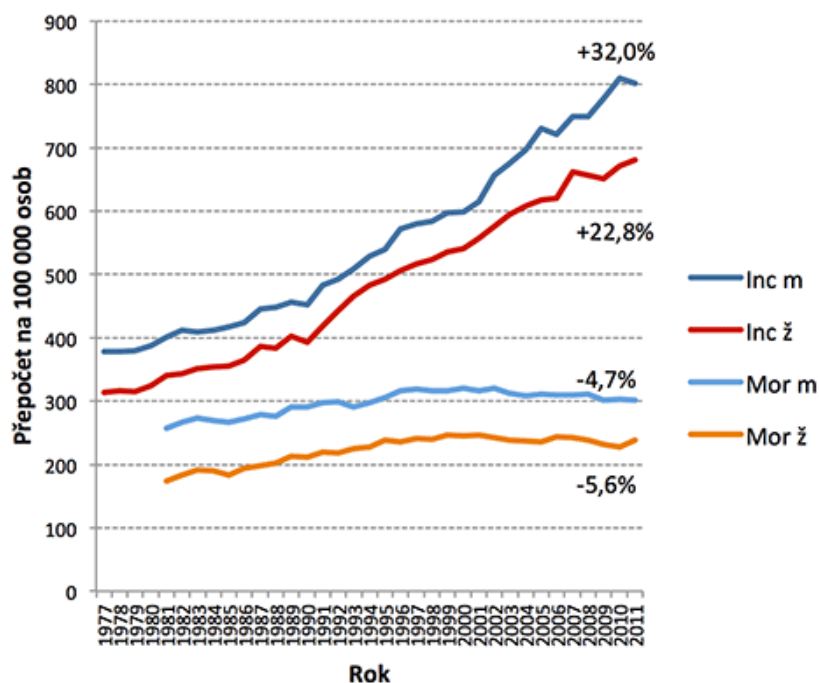
We deal with inhibition of these enzymes by inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDK). CDK play an important role in the cell cycle and influence many cell processes and increase in their activity can lead to the start of tumor growth. If they inhibit AKR and CBR, they would apply another mechanism to lower the anthracycline resistance and enhances the efficiency of cancer treatment.

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 12 |
| 1.1. Nádorové onemocnění | 12 |
| 2. Teoretická část | 14 |
| 2.1. Cytostatika | 14 |
| 2.1.1. Antracykliny | 15 |
| 2.2. Enzymy metabolizující antracykliny | 20 |
| 2.2.1 Aldo-ketoreduktasy (AKR)..... | 20 |
| 2.2.2. Dehydrogenasy/Reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)..... | 22 |
| 2.2.3 Inhibitory cyklin-dependentních kinas | 24 |
| 3. Cíl práce..... | 29 |
| 4. Experimentální část..... | 30 |
| 4.1. Materiál a chemikálie..... | 30 |
| 4.2. Pomůcky a přístroje | 31 |
| 4.3. Metodika práce | 32 |
| 4.3.1. Inkubace enzymů s daunorubicinem..... | 32 |
| 4.3.2. Stanovení IC ₅₀ u enzymu AKR1C3 s inhibitory AZD5438 a dinaciclidem | 35 |
| 4.3.3. Stanovení inhibiční konstanty..... | 35 |
| 5. Výsledky a diskuze | 38 |
| 5.1. Měření aktivit enzymů | 38 |
| 5.2. Stanovení vlivu dimethylsulfoxidu (DMSO) na enzymy AKR1C3 a CBR1 | 42 |
| 5.3. Vliv inhibitorů CDK na aktivitu enzymů AKR1C3 a CBR1..... | 42 |
| 5.4. Stanovení IC ₅₀ pro vybrané inhibitory | 64 |
| 5.5. Stanovení inhibiční konstanty (K _i)..... | 70 |
| 6. Závěr | 73 |
| 7. Seznam zkratk | 74 |
| 8. Literatura..... | 75 |

1. Úvod

1.1. Nádorové onemocnění

Nádorová onemocnění jsou pro dnešní společnost významným problémem. Během několika minulých let se incidence zvýšila o desítky procent, nicméně mortalita se lehce snížila. Každým rokem incidence narůstá o 2 - 4 %. V průběhu 30 let se incidence u mužů zvýšila o 32 % a u žen o 22,8 %. Avšak mortalita u mužů klesla o 4,7 % a u žen o 5,6 % (Obr. 1). Důvodem nárůstu incidence může být několik faktorů. Nejčastějšími z nich jsou zvyšující se průměrný věk obyvatelstva, životní styl (kouření, složení potravy, nadměrný stres), ale i časný záchyt související s primární či sekundární prevencí. Díky vývoji stále nových léčebných technologií a vyšetřovacích metod se snižuje mortalita u pacientů s diagnostikovanou rakovinou. K nejčastějším nádorovým onemocněním v ČR u žen patří rakovina prsu, dělohy, tlustého střeva. U mužů je na prvním místě kolorektální karcinom, následovaný zhoubnými nádory průdušnice, průdušek a plic a karcinomem prostaty (Internet 1, 2).



Obr. 1. Porovnání incidence a mortality nádorových onemocnění u mužů a žen od roku 1977 do 2011 (Inc m = incidence mužů, Inc ž = incidence žen, Mor m = mortalita mužů, Mor ž = mortalita žen) (Internet 1).

Vznik nádorového onemocnění spočívá v nekontrolovatelné proliferaci buněk, omezení citlivosti vůči apoptóze a neschopnosti buněk odpovídat na signály pro ukončení růstu. Ovlivnit rakovinové buňky mohou i vnější faktory jako je prostředí nebo životní styl pacienta. Mezi metody léčby nádorových onemocnění patří chemoterapie, chirurgická léčba, radioterapie a imunoterapie (Lincová a sp. 2007, Lüllmann sp. 2004).

V průběhu léčby může docházet ke snížení citlivosti nádorových buněk na cytostatickou léčbu. Rozlišujeme rezistenci primární a sekundární. Primární rezistence je geneticky podmíněná necitlivost nastupující již při prvním podání farmakoterapeutik. Sekundární (tj. získaná) rezistence se rozvíjí v průběhu léčby antibiotikem. Rezistenci nejčastěji způsobují strukturální a funkční změny buňky. Může docházet ke snížení aktivity enzymů nutných pro přeměnu cytostatika na účinnou látku nebo naopak ke zvýšení exprese enzymů, které se podílejí na biodegradaci cytostatického léčiva. Porucha mechanismů apoptózy způsobená zvýšenou expresí antiapoptických molekul nebo inaktivace proapoptických efektorů, jsou jedny z důležitých faktorů vzniku rezistence (Lincová a sp. 2007, Klener 2002).

Omezení rezistence je jeden z podstatných kroků pro fungování nádorové léčby. Některé typy rezistence lze ovlivnit farmakologicky přidáním látky omezující rezistenci (př.: verapamil, tamoxifen). Využívají se zejména k překonání mnohočetné lékové rezistence zprostředkované P-glykoproteinem. Tyto látky se pak podávají v kombinaci např. s doxorubicinem jako podpora pro zvýšení účinnosti protinádorové léčby. Ale použití těchto látek v praxi zůstává omezeno z důvodů nežádoucích vedlejších účinků a kvůli jejich vlastnímu farmakologickému účinkům (Klener 2002, Rodrigues 2002).

2. Teoretická část

2.1. Cytostatika

Léčba cytostatiky je jedna z nejběžnějších farmakoterapií nádorového onemocnění. Cytostatika ovlivňují proces buněčného dělení a transkripci. Jejich účinek bývá často neselektivní. Jeden z problémů této terapie je napadení tělu vlastních buněk s vysokou proliferační rychlostí (např. buněk kostní dřeně, buněk vlasových folikulů, epitelu GIT). To následně vede ke vzniku řady nežádoucích účinků, jako jsou myelotoxicita, gastrointestinální toxicita, alopecie a další (Lincová a sp. 2007, Lüllmann a sp. 2012).

Cytostatika lze rozdělit z pohledu buněčného cyklu na cytostatika s fázově specifickým účinkem, která postihují určité specifické fáze buněčného cyklu a cytostatika s fázově nespecifickým účinkem, která postihují buněčný cyklus ve všech fázích (Lincová a sp. 2007). Cytostatika se také dělí podle mechanismu účinku (Tab. 1).

Tab. 1. Přehled mechanismů účinků cytostatik (Lüllmann a sp. 2012)

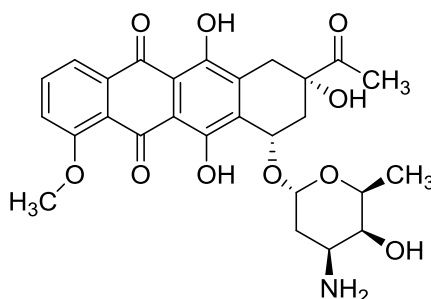
| | |
|---|--|
| 1. Poškození struktury a funkce již přítomných NK | - alkylací |
| | - interkalací |
| | - rozštěpením molekuly DNA |
| 2. Inhibice biosyntézy nukleových kyselin | - blokáda biosyntetických reakcí |
| | - inkorporace cytostatika do nukleosidu |
| 3. Poškození mikrotubulů a inhibice mitózy | - mitotické jedy |
| 4. Ovlivnění regulačních pochodů organismu | - hormony, monoklonální protilátky, cílená protinádorová léčba |

Cílem terapie je zajištění optimálního farmakoterapeutického účinku za přijatelné toxicity ke zdravé tkáni. Většina cytostatik v optimální dávce vykazuje toxický účinek i k normální zdravé tkáni. Účinnost terapie lze zvýšit podáním kombinací více cytostatik s odlišným mechanismem účinku, kombinací chemoterapeutik s chirurgickým zákrokem nebo radioterapií. K novějším přístupům můžeme zařadit selektivní transport cytostatika přímo do nádorové buňky, aktivaci prolečiva na účinné cytostatikum až uvnitř nádorové buňky, biochemickou modulaci účinku cytostatika tj. kombinací s látkou bez cytotoxických účinků, která zasahuje do biochemických dějů důležitých pro účinek cytostatika (Martínková a sp. 2007).

2.1.1. Antracykliny

Antracykliny (ANT) se řadí mezi látky s tetracyklickou strukturou se sousedními chinonovými a hydrochinonovými skupinami, v poloze C-13 je navázaný krátký postranní karbonylový řetězec a v poloze C-7 je glykosidicky vázaný aminocukr daunosamin (Obr. 2). ANT byly objeveny při systematickém zkoumání inhibičních účinků látek tvořených bakteriemi *Streptomyces peuceitius* (Hartl a sp. 2006).

Antracykliny jsou využívány při léčbě hematologických nádorů, solidních nádorů prsu, vaječníků, plic nebo jater. Riziko spojené s léčbou ANT je život ohrožující kardiomyopatie a městnavé srdeční selhání (Goodman a sp. 1997).



Obr. 2. Struktura daunorubicinu.

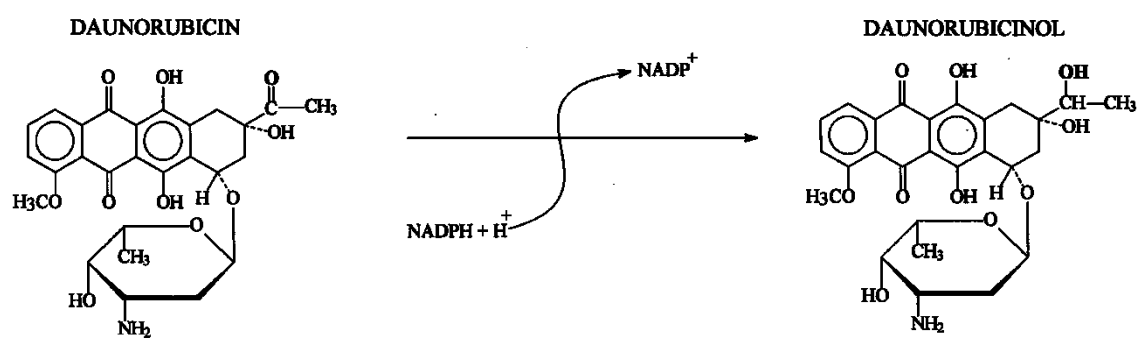
MECHANISMUS ÚČINKU

Mechanismus účinku ANT není tak úplně vyjasněn. Dnes jsou řazeny do skupiny interkalačních látek tj. k látkám se schopností vmezeřit se do řetězce DNA. Antracyklin se vtláčí do dvojspirály DNA, kde s jeho bazemi vytváří nekovalentní vazby pomocí vodíkových můstků. V důsledku těchto vazeb dochází k inhibici syntézy RNA a inhibici replikace DNA (Lincová a sp. 2007, Lüllmann sp. 2004).

Patří také k látkám se schopností blokovat funkci topoizomerázy II a řadí se tak mezi “topoizomerasové jedy”. Rozštěpený řetězec DNA je kovalentně vázán na tyrosinové zbytky topoizomeras, čímž se vytváří pevný komplex a vznikají dvojité zlomy v řetězci DNA. Důležitou roli hraje prostorové uspořádání molekuly, v tomto případě je důležité planární uspořádání. Odstraněním aminosubstituentu na C-3 v cukerné části molekuly nebo methoxyskupiny na C-4 v kruhu D se zvyšuje inhibice topoizomerasy II a dochází k zastavení replikace a transkripce DNA (Binaschi a sp. 2001).

METABOLISMUS

K přeměně antracyklinů dochází v první fázi metabolismu xenobiotik, kdy vzniká metabolit s vhodnou funkční skupinou a je pak snáze vyloučen z organismu. Nejčastějšími reakcemi první fáze jsou oxidace, redukce, hydrolýza nebo hydratace. Na metabolismu antracyklinů se podílejí hlavně enzymy ze skupiny aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), které způsobují přeměnu antracyklinů na alkoholový metabolit (Obr. 3). Jedná se o karbonylovou redukci ketoskupiny na sekundární alkohol, který je lehce konjugován a eliminován z organismu (Ax a sp. 2000). Studie Bainse a sp. (2010) ukazují, že účinnější je daunorubicin a ne jeho metabolit daunorubicinol. Testování probíhalo na devíti buněčných liniích, kde se ukázalo, že alkoholový metabolit daunorubicinol je k nádorovým buňkám méně toxický než primární látka daunorubicin.



Obr. 3. Redukce karbonylu daunorubicinu na sekundární alkohol daunorubicinol.

KARDIOTOXICITA

Jedním z nejvýznamnějších nežádoucích účinků antracyklinů je kardiotoxicita. Mechanismus kardiotoxicity je velmi rozporuplným tématem. Proto bylo studováno několik potenciálních cest tohoto nežádoucího účinku, kterými jsou: 1) Metabolismus ANT na více hydrofilní a kardiotoxické látky, které se následně akumulují v kardiomyocytech (Menna a sp. 2007); 2) Porucha buněčné a mitochondriální homeostázy Ca^{2+} (Solem a sp. 1994); 3) Zhoršená exprese různých důležitých srdečních proteinů (Boucek a sp. 1999); 4) Schopnost ANT indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) (Goodman a Hochstein 1977) (viz Obr. 4).

protektivní roli při oxidačním stresu. Pokud by došlo k depleci genu pro NQO mohl by tento jev přispívat ke kardiotoxicitě (Skálová a sp. 2013).

Kardiotoxicitu způsobenou antracykliny rozdělujeme na 4 typy. Akutní kardiotoxicita nastává během nebo bezprostředně po podání látky. Tento typ se projevuje hypotenzí, vazodilatací a přechodnými poruchami srdečního rytmu (Ferrans a sp. 1997). Druhým typem je subakutní kardiotoxicita, která se projevuje syndromem perikarditidy a myokarditidy během několika dní po léčbě vysokými dávkami antracyklinů (Hale a sp. 1994). K předčasné chronické kardiotoxicitě dochází později v průběhu léčby nebo několik týdnů po jejím ukončení. Mezi její charakteristické znaky patří dilatovaná kardiomyopatie, ventrikulární kontraktilní dysfunkce a městnavé srdeční selhání (Ferrans a sp. 1997). Kardiotoxicita se také může projevit i několik desítek let po dokončení léčby. V tomto případě se jedná o chronické onemocnění s pozdním nástupem (Scully a sp. 2007). Oeffinger a sp. (2006) analyzovali výskyt kardiovaskulárních problémů u pacientů, kteří se v dětství vyléčili z rakovinového onemocnění. U těchto pacientů se objevoval několika násobně vyšší výskyt mrtvice nebo srdečního selhání, než bylo předpokládáno. Je tedy důležité zavést preventivní opatření při léčbě ANT. Využití farmakologických kardioprotektiv je další možností snížení kardiotoxicity. U dextrazoxanu bylo prokázáno, že účinně chrání myokard proti všem antracyklinům. Stal se tak zatím jediný schváleným léčivem v klinické praxi (Swain a sp. 1997). Dalším preventivním opatřením je lipozomální podání ANT, čímž se zvýší celková kumulativní dávka bez zvýšení rizika kardiotoxicity (Leonard a sp. 2009).

REZISTENCE

Antracykliny jsou velmi přínosnými v léčbě nádorových onemocnění, ale jejich použití je omezeno vlastní nebo získanou rezistencí vůči těmto lékům (Toffoli a sp. 1994). Rezistence k antracyklinovým léčivům může být vyvolána několika faktory 1) zvýšení efluxních ABC transportérů (ABC – ATP binding cassette), 2) zvýšenou enzymatickou detoxikací nebo 3) defekty v drahách, které aktivují apoptózu (Den Boer a sp. 1998).

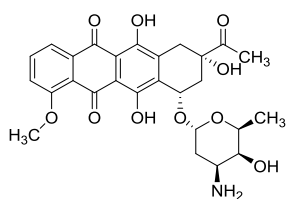
ABC efluxní transportéry hrají důležitou roli při transportu léčiv ven z buňky, tím snižují jejich nitrobuněčnou koncentraci a protinádorový účinek. Jejich přítomnost byla zaznamenána i v nádorových buňkách. Právě zvýšenou expresí těchto transportérů dochází ke vzniku mnohočetné lékové rezistence, což může představovat překážku

v úspěšné protinádorové terapii (Gottesman a sp. 2002). Pro zlepšení protinádorové léčby jsou studovány inhibitory cyklin-dependentních kinas, u kterých byl zjištěn i inhibiční vliv na ABC transportéry (Dhillon 2015). U některých byla významná interakce s transportéry již prokázána (Číhalová a sp. 2015).

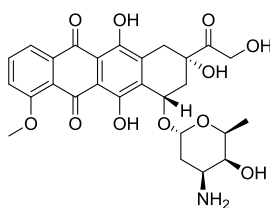
Reduktasy vedou k vyšší inaktivaci antracyklinů a následně ke zvýšení chemorezistence. Předpokládá se, že současné podání inhibitoru daunorubicin-reduktasy by snížil tvorbu metabolitu daunorubicinolu a tím by se snížila potřebná dávka a tím i kardiotoxicita (Bains a sp. 2010, Hoffman a sp. 2014). Ze studie Skribka a sp. (2010) byl zjištěn synergický účinek při podání daunorubicinu nebo doxorubicinu v kombinaci s prednisonem. Větší účinek byl však prokázán v kombinaci s daunorubicinem. Výhodou této kombinace léčiv je snížení potřebné dávky daunorubicinu. Předpokládá se, že stačí 25krát nižší dávka, aby byla léčba stále účinná. Tato studie byla provedena izolováním buněk chronické lymfoidní leukemie z krve pacientů.

Zvýšení nádorové rezistence může být také způsobeno změnami apoptické signální dráhy. Např.: přeměnami exprese signálních molekul apoptózy mutací v genu p53 vyskytujícího se v aktivační dráze apoptózy. (Nosková a sp. 2000). U karcinomu prsu v mutaci tohoto supresorového genu byla prokázána *de novo* rezistence na jeden z antracyklinů (doxorubicin) u karcinomu prsu (Rivera 2010).

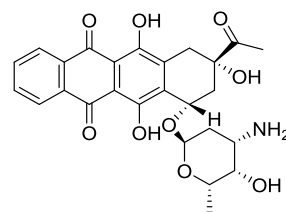
Nejvýznamnějšími antracykliny v léčbě nádorových onemocnění jsou daunorubicin, doxorubicin a idarubicin (Obr. 5, 6, 7). Daunorubicin je nejvíce využívá při léčbě akutní lymfoblastické a myeloblastické leukemie. Doxorubicin se rozsáhle využívá u hematologických nádorů nebo u solidních nádorů (např. nádor prsu, vaječníku, jater nebo plic). Idarubicin je podáván u pacientů s akutní nelymfocytární leukémií a s akutní lymfocytární leukémií (Minotti a sp. 2004).



Obr. 5. Daunorubicin.



Obr. 6. Doxorubicin.



Obr. 7. Idarubicin.

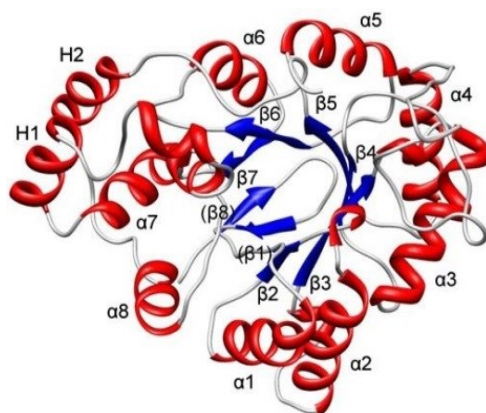
2.2. Enzymy metabolizující antracykliny

Karbonyl redukující enzymy byly nalazeny v mnoha lidských tkáních a jsou řazeny do 3 nadrodin (aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR) (Skálová a sp. 2013).

2.2.1 Aldo-ketoreduktasy (AKR)

AKR jsou proteiny o 320 aminokyselinách patřící do nadrodiny NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas. Soudkovitá struktura tvořená osmi β -listy obklopenými osmi α -helixy s aktivním místem lokalizovaným na C-konci (Obr. 7) je důležitá pro jejich širokou substrátovou specifitu (Mindnich a Penning, 2009). Pro přesnost a zvýšenou přehlednost v této skupině enzymů byl založen nový nomenklaturní systém. Předlohou pro tuto nomenklaturu se stal klasifikační systém cytochromu P450 (CYP) a enzymy jsou systematicky členěny dle Jeze a Penninga (2001). V současné době se AKR dělí do 15 rodin a několika podrodin o více jak 170 členech. Jednotlivé členy rodiny mají podobnost v aminokyselinové sekvenci 40 %. U podrodin je jejich vzájemná podobnost v sekvenci alespoň 60 %.

Mezi lidské AKR se řadí rodina AKR1 s podrodinou AKR1A1, AKR1B1, 1B10 a 1B15, AKR1C1 - 1C4. Dále rodina AKR6 s podrodinou AKR6A3, 6A5 a 6A9. Třetí rodinou je AKR7 s podrodinou AKR7A2 a 7A3. Aldo-ketoreduktasy patří k biotransformačním enzymům fáze I. Kofaktorem při redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy je NADPH (Jin a Penning 2007, Skálová a sp. 2013).



Obr. 7. Schéma struktury enzymu z nadrodiny aldo-ketoreduktas (Ellenberger a sp. 2013).

Substráty podrodiny AKR1C můžeme rozdělit na endogenní látky: prostaglandiny, steroidní hormony, žlučové kyseliny, lipidové aldehydy a řadu dalších. Druhou skupinou substrátů jsou látky exogenní: xenobiotika, léky např. i daunorubicin nebo doxorubicin (Barski a sp. 2008).

AKR1A1

AKR1A1 je jeden z prvních objevených AKR, tato isoforma je exprimována hlavně v ledvinných proximálních tubulech. Enzym AKR1A1 je efektivním metabolizátorem DAU. Jsou známy dvě přirozeně se vyskytující alelické variace AKR1A1 E55D a N52S, které vedou ke snížení aktivity reduktasy vůči DAU. Jedinci nesoucí tyto alely mají sníženou schopnost eliminace DAU, tím může docházet k tvorbě škodlivých metabolitů nebo reaktivních meziproduktů (Bains a sp. 2008).

AKR1B1

AKR1B1 je jedním z nejvíce studovaných aldo-keto reduktas. AKR1B1 hraje důležitou roli v hyperglykemickém poškození tkání a druhotných projevech při diabetu. Isoforma 1B1 katalyzuje redukci mnoha fyziologických substrátů, ale i xenobiotik (Skálová a sp. 2013). Během několika posledních let byl zaznamenán výskyt AKR1B1 v zánětlivých procesech. V těchto cestách může působit jako aktivátor zánětlivých cytokinů a mediátorů (Barski a sp. 2008).

AKR1B10

Isoforma 1B10 je exprimována v tenkém a tlustém střevě, jaterní tkáni, nadledvinkách či brzlíku. Aminokyselinová sekvence má 71% podobnost s AKR1B1 (Skálová a sp. 2013). AKR1B10 je výrazně exprimována i u nádoru prsu. Studie Li a sp. 2017 prokázala, že AKR1B10 působí jako kritický faktor, podporuje totiž invazi a migraci metastáz rakoviny prsu na buněčné úrovni *in vivo* a *ex vivo*. Genové regulace toho enzymu jsou stále studovány.

AKR1C3

Tento enzym byl sice původně nalezen v játrech, ale nejvíce je exprimován v prsní tkáni a prostatě. AKR1C3 se uplatňuje v syntéze a metabolismu steroidů. Podílí se na vzniku a progresi androgen- a estrogen-dependentních onemocnění (jako

karcinom prostaty nebo karcinom prsu). Fyziologická funkce AKR1C3 se uplatňuje u syntézy prostaglandinů. Katalyzuje redukci prostaglandinu D₂ na PGF_{2α}, který může vést k poruchám vasokonstrikce, teplotní regulace nebo konstrikce hladkého svalstva (Barski a sp. 2008).

AKR1C3 je též důležitým v metabolismu xenobiotik. V předešlých studiích bylo prokázáno, že nejen daunorubicin, ale i další z antracyklinů (doxorubicin a idarubicin) jsou účinně metabolizovány pomocí AKR1C3 na sekundární metabolity, což může vést ke snížení účinnosti cytostatika samotného. Předpokladem snížení rezistence buněk k antracyklinům je použití inhibitoru AKR1C3. Současné podání inhibitoru AKR1C3 s daunorubicinem by mohlo vést k úspěšné léčbě nádorů a ke snížení toxicity. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese AKR1C3 vede ke snížení buněčné diferenciaci. Předpokládá se, že inhibitory AKR1C3 by mohly hrát důležitou roli při léčbě těchto onemocnění (Desmond a sp. 2003, Hofman a sp. 2014).

2.2.2. Dehydrogenasy/Reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

SDR patří mezi nejrozsáhlejší skupinu enzymů, do které patří více jak 680 000 členů vyskytujících se ve všech formách života (Persson a Kallberg 2013, Jörnvall a sp. 2015). Tato heterogenní skupina sdílí některé charakteristické podobnosti. Jednotlivé členy jsou tvořeny trojrozměrnou strukturou, většina z nich obsahuje tzv. Rossmannův záhyb, na který se váže kofaktor. Dále mají společnou katalytickou tetradu Asn-Ser-Tyr-Lys. Ale jejich celková podobnost je však menší než 20 - 30 % (Matsunaga a sp. 2006).

Nomenklatura SDR byla zavedena podle enzymů AKR. Nicméně množství enzymů nedovolilo převzít nomenklaturu zcela a SDR enzymy jsou dále rozděleny do 7 typů: C - „classical“, E - „extended“, A - „atypical“, I - „intermediate“, D - „divergent“, X - „complex“, U - „unassigned“. Jednotlivé podrodiny se často liší velikostí, sekvencí vazebného místa pro kofaktor nebo aktivní místo (Persson a Kallberg 2013).

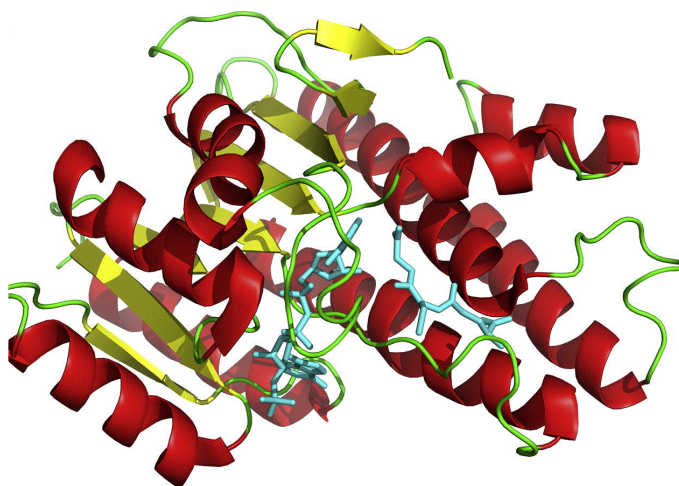
V lidském genomu je nejvíce zastoupena rodina C a E s různým počtem členů. Lidské SDR proteiny jsou dále rozděleny do tzv. klastrů a dělí se do třech hlavních skupin C1, C2, C3. U těchto tří skupin můžeme najít různou délku polypeptidového řetězce, odlišnou vazbu na membránu a odlišnou substrátovou specifitu (Bray a sp. 2009).

Do této skupiny reduktas patří kromě jiných i významná rodina karbonylreduktas (CBR). Tyto reduktasy se účastní NADP(H)-dependentních oxidačně-redukčních reakcí a katalyzují redukci karbonylové skupiny u antracyklinů, ale i dalších biogenních látek (prostaglandinů nebo steroidů). Zvýšená exprese CBR vede k poškození srdeční svaloviny, proto CBR hrají důležitou roli ve vývoji kardiotoxicity po podání antracyklinů. (Forrest a Gonzáles 2000). Dále bylo zjištěno, že rezistence nádorových buněk k daunorubicinu může být způsobena také zvýšenou expresí CBR (Ax a sp. 2000).

Pro metabolismus antracyklinů jsou nejvýznamnější: karbonylreduktasa 1 a karbonylreduktasa 3 (Bains a sp. 2010).

KARBONYLREDUKTASA 1 (CBR1)

CBR1 (SDR21C1) (Obr. 8) se skládá z 277 aminokyselin a je přítomna ve velkém množství organismů včetně lidských tkání. CBR1 je exprimován především v játrech, placentě nebo CNS (Forrest a Gonzales 2000). Endogenní substráty pro CBR1 jsou prostaglandiny, koenzym Q10 nebo vitamin K. CBR1 slouží jako prostaglandin-9-ketoreduktasa a 15-hydroxyprostaglandindehydrogenasa v metabolismu prostaglandinů, což je důležité pro kontrolu množství prostaglandinů v jednotlivých tkáních. Některé studie naznačují důležitost tohoto enzymu při oxidačním stresu a redoxní rovnováze (Boušová a sp. 2015).



Obr. 8. Struktura lidské karbonylreduktasy 1 s ligandem (Liang Q. a sp. 2015).

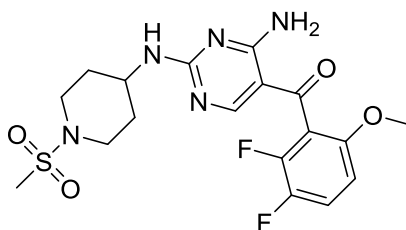
2.2.3 Inhibitory cyklin-dependentních kinas

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) patří mezi serin/threonin proteinové kinasy, které regulují cílové struktury pomocí fosforylace (Tadesse a sp. 2015). Mají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a jsou zodpovědné za řízení progresu a regulace transkripce (Geleta a sp. 2016). Jelikož jsou tvořeny širokou podrodinou, každá CDK je zodpovědná za svou úlohu v buněčném cyklu. Jsou závislé na činnosti regulačních proteinů (cyklinů), díky nimž jsou aktivovány (Malumbres a sp. 2005). Negativní ovlivnění nebo vysoká exprese CDK může vést až k nekontrolovatelnému dělení buněk, což může způsobit vznik nádorového onemocnění. To byl nejspíše jeden z impulsů pro studium CDK inhibitorů, kdy zásahem do aktivity CDK navodíme výhodnou smrt nádorové buňky (Rouchal a sp. 2011).

INHIBITORY CDK (CDKi)

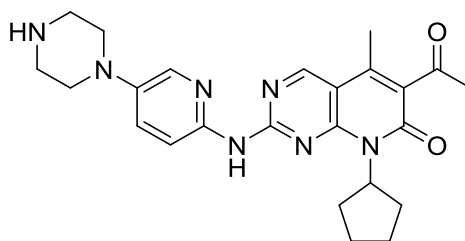
Synteticky vyráběné inhibitory různých CDK působí specificky (např.: palbociclib inhibuje CDK4 a CDK6), což umožňuje vybrat nejvhodnější inhibitor pro danou CDK. Jelikož CDKi působí na různé CDK, objevují se značné rozdíly v toxicitě nebo v jejich účinnosti na různá nádorová onemocnění (DePinto a sp. 2006, Tong a sp. 2010). CDKi vykazují antiproliferační účinky, navozují zástavu buněčného cyklu v různých fázích v závislosti na jejich specifitě k jednotlivým CDK. Některé studie naznačují vhodné využití inhibitorů do kombinované léčby s dalšími chemoterapeutiky (Cicenas a sp. 2014, Cicenas a Valius 2011).

R547 (R) (Obr. 9) spadá do skupiny 2,4-amino-5-ketopyrimidinů a je selektivním ATP-kompetitivním inhibítorem. R vykazuje největší aktivitu proti CDK, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu (CDK1, CDK2 a CDK4) a proti CDK5. R prokazoval silnou antiproliferační aktivitu ve všech 19 buněčných liniích testovaných bez ohledu na původ tkáně, mnohočetnou lékovou rezistenci nebo protein p53. G1 a G2 fáze buněčného cyklu jsou inhibítorem blokovány a následně může být vyvolána apoptóza. V preklinických studiích se u R osvědčilo jak orální, tak i intravenózní podání látky (DePinto a sp. 2006).



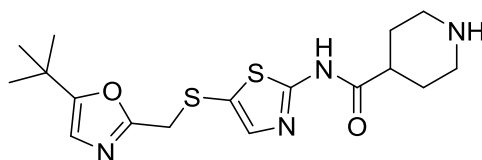
Obr. 9. Struktura R547.

Palbociclib (PC) (Obr. 10) specificky inhibuje CDK4 a CDK6. Pro silný antiproliferační účinek byl testován u různých typů nádorového onemocnění. U nádoru prsu byla prokázána jeho největší aktivita (Cadoo a sp. 2014). Tamura a sp. (2016) v první fázi studií prokázali předběžnou účinnost PC u pacientů s pokročilým karcinomem prsu. 125 mg PC je doporučenou a tolerovanou dávkou u japonských pacientů, a to buď v monoterapii nebo v kombinaci s letrozolem.



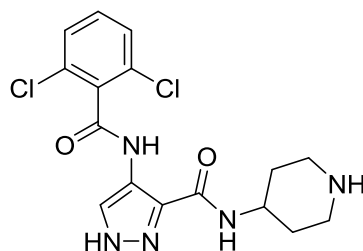
Obr. 10. Struktura palbociclibu.

SNS032 (SNS) (Obr. 11) podle studií vykazuje zvýšenou selektivitu k CDK 2, 7 a 9. Ve srovnání s flavopiridolem byl tento inhibitor účinnější při inhibici syntézy RNA a vyvolání apoptózy. Aktivita SNS byla potvrzena *in vivo* pomocí myších modelů nádorových buněk xenotransplantovaných lidských leukemií (HL-60 a MV 4-11) a mnohočetného myelomu (RPMI-8226) (Reddy a sp. 2007). SNS působí mechanismem účinku nezávislým na p53, což z něj činí potenciálně významný léčivý přípravek při léčbě pacientů s chronickou lymfoidní leukémií a delecí chromozomu 17p, pro který existují omezené možnosti léčby. Také blokuje vaskulární endoteliální růstový faktor, čímž inhibuje angiogenezi a potenciálně přispívá k cytotoxicitě (Ali a sp. 2007). Tento inhibitor byl testován i v léčbě metastatických solidních nádorů (Heat a sp. 2008). U chronické lymfocytární leukémie se výsledky zdály zvláště pozitivní, avšak z důvodu značné toxicity bylo studium inhibitoru přerušeno (Tong a sp. 2010).



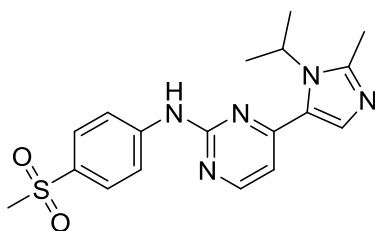
Obr. 11. Struktura SNS032.

AT7519 (AT) (Obr. 12) se řadí mezi pyrazolové sloučeniny. Nejvíce inhibuje CDK2, ale i další (CDK1, 4, 5, 6, 9). Je využíván hlavně u chronické lymfatické leukémie a má silnou antiproliferační aktivitu proti solidním nádorům. V posledních letech probíhají studie druhé fáze u pacientů s refrakterním mnohočetným myelomem (Wyatt a sp. 2008). AT inhibuje CDK6 a také inhibuje fosforylaci RNA polymerasy II, čímž vyvolá apoptózu. Díky tomu je pravděpodobné, že působí duálním mechanismem (Santo a sp. 2010).



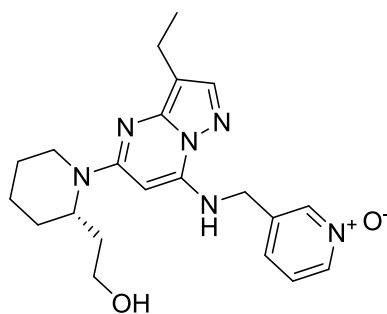
Obr. 12. Struktura AT7519.

AZD5438 (AZD) (Obr. 13). Mezi negativa tohoto inhibitoru se řadí zejména nežádoucí účinky gastrointestinálního původu. Kontinuální dávkování přípravku AZD bylo u některých pacientů spojeno s hlubokou anorexií a únavou v souvislosti s nevolnostmi a zvracením. Tento komplex symptomů se objevil v prvních dnech od zahájení léčby AZD a byl spojen s tachykardií, hypotenzí, hyponatrémií a zvýšením počtu bílých krvinek, C-reaktivního peptidu a sérového kreatininu. U AZD nebyl prokázán vhodný profil rizika a prospěšnosti. Klinický vývoj byl z těchto důvodů přerušen (Boss a sp. 2010).



Obr. 13. Struktura AZD5438.

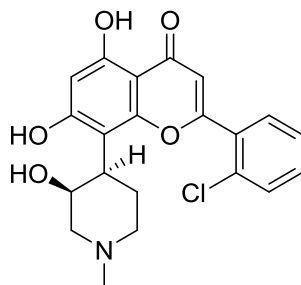
Dinaciclíb (DC) (Obr. 14) inhibuje aktivitu pro CDK1, 2, 5 a 9 (Parry a sp. 2010). Analýzy *in vitro* a *in vivo* uvedené ve studii Parryho a sp. 2010 podporují závěr, že dinaciclíb má potenciál inhibovat růst širokého spektra lidských nádorů. Bylo prokázáno, že dinaciclíb indukoval apoptózu ve velké většině testovaných buněčných linií lidských nádorů různého původu. DC byl podáván u pacientů s chronickou lymfoidní leukémií, kde byl velmi pozitivně akceptován. Dinaciclíb je klinicky aktivní i u relapsovaných chronických lymfoidních leukémií včetně pacientů s vysoce rizikovým onemocněním (Flynn a sp. 2015). V preklinických studiích u buněčných linií prsního nádoru a myších modelů xenograftů prsního nádoru dinaciclíb indukoval apoptózu a regresi tumoru. Klinická studie I. fáze u pacientů s pokročilými solidními tumory, včetně pacientů s nádorem prsu, potvrdily jeho bezpečnost, snášenlivost a protinádorovou aktivitu (Parry a sp. 2010).



Obr. 14. Struktura dinaciclíbu.

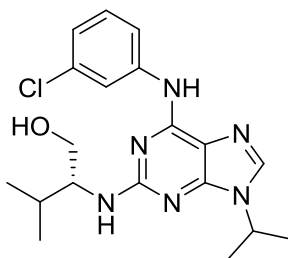
Flavopiridol (FLA) (Obr. 15) patří mezi polosyntetické flavony. Jeho mechanismy účinku zahrnují cílení na cyklin-dependentní kinasy, snížení regulace proteinu Mcl-1 a dalších apoptických proteinů (Wittmann a sp. 2003). V preklinických studiích bylo prokázáno, že navozuje buněčnou smrt ve slezině nebo lymfatických uzlinách (Arguello a sp. 1998). Některé klinické studie naznačují, že by flavopiridol mohl synergicky zvyšovat účinnost jiných chemoterapeutik podaných v kombinaci (Dispenzieri a sp. 2006).

U chronické lymfocytární leukemie bylo dosaženo pozitivních výsledků. Průběžná analýza ve fázi I. kohortové studie prokázala účinnost flavopiridolu u pacientů s refrakterní, vysoce rizikovou chronickou lymfocytární leukémií (Phelps a sp. 2009).



Obr. 15. Struktura flavopiridolu.

Purvalanol A (PURVA) (Obr. 16) se řadí mezi purinové CDKi. Značí se vysokou selektivitou pro CDK2, CDK5, ale nižší selektivitu k CDK4. Zatím nebyl testován v klinických studiích (Villerbu a sp. 2002, Cicenias a Valius 2011).



Obr. 16. Struktura purvalanolu A.

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo nalézt inhibitory cyklin-dependentních kinas, které by měly současně vliv na enzymy vybraných lidských reduktas. Jednotlivé dílčí cíle zahrnují:

1. zjištění aktivit enzymů AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, CBR1 z nadrodiny aldo-ketoreduktas a SDR k daunorubicinu;
2. zjištění inhibičního účinku vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kinas (R-547, palbociclibu, AT-7519, SNS-032, AZD-5438, dinaciclibu, flavopiridolu, LEE-011, purvalanolu A) ke klíčovým lidským reduktasám AKR1C3 a CBR1;
3. stanovení IC_{50} pro nejsilnější inhibitory;
4. určení inhibiční konstanty a typu inhibice pro nejvíce účinné inhibitory

4. Experimentální část

4.1. Materiál a chemikálie

Amoniak (25%)

Daunorubicin hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Destilovaná voda

Glukosa-6-fosfát (Applichen)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (Roche)

Ethylacetát (Sigma-Aldrich)

MgCl₂ (0,3 mM)

NADP⁺ (Roche)

Na-fosfátový pufr pH=7,4 (0,1 M)

Rekombinantně připravené lidské enzymy v expresním systému *E.coli* a rozpuštěné v 0,2 M draselno-fosfátovém pufru + 20% glycerolu, pH 7,4.

(Katedra biochemických věd):

| | |
|---------|------------|
| AKR1C3 | 1,92 mg/ml |
| AKR1A1 | 1,7 mg/ml |
| AKR1B1 | 1,63 mg/ml |
| AKR1B10 | 1,61 mg/ml |
| CBR1 | 2,11 mg/ml |

| | | |
|-------------|--------------|---|
| Inhibitory: | AT7519 | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | AZD5438 | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | Dinaciclib | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | Flavopridol | - SelleckChem (Houston, TX, USA) |
| | LEE011 | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | Palbociclib | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | Purvalanol A | - Sigma |
| | R547 | - Axon Medchem (Groningen, Netherlands) |
| | SNS032 | - SelleckChem (Houston, TX, USA) |

4.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky:

Automatické pipety, pipetovací špičky, nádoba na led, stojan na zkumavky, navažovací lžičky, rukavice, navažovací kopistka, buničina, stopky, mrazicí box, přístroj pro výrobu ledové tříště.

Přístroje:

| | |
|--------------------|--|
| Analytické váhy | (Scaltec SBC 22) |
| Centrifuga | (Mini Spin Plus, Eppendorf) |
| Inkubátor | (Thermomixer compact, Eppendorf) |
| Koncentrátor | (Koncentrátor Plus, Eppendorf) |
| Třepačka | (Vortex Genius 3, IKA) |
| UHPLC | (Agilent 1290 Series) |
| kolona | (Zorbax C18 Eclipse Plus) (2.1 x 50 mm, 1.8 μ m) |
| Ultrazvuková lázeň | (Ultrasonic cleaner 120T) |

4.3. Metodika práce

4.3.1. Inkubace enzymů s daunorubicinem

Daunorubicin (DAU) je redukčními enzymy přeměňován na metabolit 13-hydroxydaunorubicinol. Jedná se o hlavní metabolit DAU, s významně nižší antineoplastickou účinností ve srovnání s původním léčivem. Pro zabránění této přeměny byly testovány vybrané inhibitory.

Inkubace vzorků:

Každá mikrozkušavka obsahovala vzorek s reakční směsí o celkovém objemu 100 μ l. Složení směsi je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2. Složení reakční směsi pro inkubaci

| Substance | Objem (μl) |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH=7,4 | 58 |
| Regenerační systém | 20 |
| Enzym | 10 |
| Inhibitor | 2 |
| Daunorubicin 5 mM | 10 |

Příprava jednotlivých složek pro inkubaci:

Příprava regeneračního systému (RS):

Regenerační systém byl připraven dle Tab. 3. Dle počtu vzorků bylo přepočteno množství jednotlivých složek pro regenerační systém. Nejprve bylo naváženo NADP^+ , glukosa-6-fosfát a rozpuštěno v Na-fosfátovém pufru, poté byl přidán MgCl_2 . Vše bylo důkladně promícháno a uchováváno na ledu. Glucosa-6-fosfát dehydrogenasa byla přidána až těsně před pipetováním RS do jednotlivých vzorků.

Tab. 3. Složení regeneračního systému pro jednu reakci (100 μ L)

| Substance | 1 reakce |
|------------------------------------|-----------------|
| 0,8 mM NADP ⁺ | 0,2 mg |
| 6 mM glukosa-6-fosfát | 0,6 mg |
| 35j.glukosa-6-fosfát dehydrogenasa | 0,5 mg |
| 3 mM MgCl ₂ | 10 μ L |
| 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH=7,4 | 10 μ L |

Příprava substrátu:

Pro přípravu substrátu byl použit daunorubicin hydrochlorid (M = 563,98 g/mol), z kterého byl připraven zásobní vodný roztok o 5 mM koncentraci. Do reakce bylo použito 10 μ l z tohoto zásobního roztoku. Finální koncentrace DAU v reakci tak byla 500 μ M.

Příprava enzymů AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, CBR1:

Lidské enzymy byly připraveny v rekombinantní formě na katedře biochemických věd v různé koncentraci (mg/ml). Každý enzym byl naředěn sodno-fosfátovým pufrům na koncentraci 0,5 mg/ml (Tab. 4). Do reakce bylo následně pipetováno 10 μ l takto naředěného roztoku enzymu. Výsledné množství enzymu v jedné reakční směsi tedy bylo 5 μ g.

Tab. 4. Příprava zásobních roztoků vybraných enzymů

| Enzymy | Koncentrace (mg/ml) | Enzym (μl) | Na-P pufr (μl) |
|----------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| AKR1A1 | 1,7 | 23,52 | 56,46 |
| AKR1B1 | 1,63 | 24,54 | 55,46 |
| AKR1B10 | 1,61 | 24,84 | 55,16 |
| AKR1C3 | 1,92 | 20,84 | 59,16 |
| CBR1 | 2,11 | 18,96 | 61,04 |

Příprava inhibitoru:

Pracovalo se s inhibitory: R547, palbociclibem, AT7519, SNS032, AZD5438, dinaciclibem, flavopiridolem, LEE011, purvalanolem A.

Každý zásobní roztok inhibitoru měl 10 mM koncentraci v DMSO kromě PC, který měl 20 mM koncentraci v H₂O. Ze zásobního roztoku byly pomocí DMSO naředěny pracovní roztoky o 500 μM a 2500 μM koncentraci. Celkový objem pracovního roztoku inhibitoru, který se přidával do reakční směsi, byl 2 μl. Do inkubační směsi u kontrolních vzorků bylo místo inhibitoru přidáno DMSO. U neinhibované reakce byl přidán pufr místo inhibitoru.

Postup práce pro inkubaci:

Pro daný postup práce byl připraven požadovaný počet mikrozkušavek (eppendorfek) s řádným označením. Do každé mikrozkušavky byl napipetován Na-fosfátový pufr. Dále byl přidán regenerační systém, enzym, inhibitory (u kontrolních vzorků byl použit pufr nebo DMSO). Vzorky byly krátce promíchány a nechány 10 minut zchladnout na ledu. Dále byla provedena pěti minutová preinkubace vzorků na thermomixeru vyhřátém na 37 °C. Poté bylo zahájeno startování reakce. Do každého vzorku byl postupně přidán substrát v intervalu 30ti sekund. Celková inkubace trvala půl hodiny. Po 30 minutách byla reakce postupně ukončována přidáním 40 μl 25%-ního amoniaku (opět po 30 sekundách) a tím došlo k zastavení reakce. Každý vzorek byl ihned promíchán a dán na led.

Pro zvýšení výtěžku extrakce byla použita dvojnásobná extrakce pomocí ethylacetátu. Ke všem vzorkům bylo přidáno 1000 μl ethylacetátu. Vzorky byly extrahovány 15 minut. Vzorky byly zcentrifugovány po dobu 2 minut při 13 400 ot/min, čímž došlo k odělení vrstev. Horní vrstva byla odebrána a přepipetována do nových eppendorfek. Ty byly vloženy do vakuového koncentrátoru a při 30 °C byly odpařeny. K původním vzorkům bylo opět přidáno 1000 μl ethylacetátu, proběhla extrakce, centrifugace, přepipetování horní vrstvy k odpařeným vzorkům a odpaření na koncentrátoru. Odpařené vzorky byly uchovány při -20 °C.

Vyhodnocování vzorků probíhalo pomocí UHPLC analýzy. Odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 400 μl mobilní fáze (74 % kyseliny mravenčí (0,1%) a 26 % acetonitrilu) a napipetovány do připravených vialek s inzerty.

4.3.2. Stanovení IC₅₀ u enzymu AKR1C3 s inhibitory AZD5438 a dinacilibem

IC₅₀ definujeme jako koncentraci látky, která sníží aktivitu daného enzymu na polovinu (Ledvina a sp. 2006).

Inkubace probíhala za stejných podmínek a postupu uvedeného již v kapitole 4.3.1. V této fázi měření byly určeny jednotlivé koncentrace inhibitorů, tak aby byl zahrnut celkový rozsah jejich inhibičního rozpětí. Pro AZD5438 byly vybrány následující výsledné koncentrace 200 μM, 75 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 1 μM a 0,1 μM. Výsledné koncentrace pro dinacilib byly 200 μM, 50 μM, 1 μM, 0,1 μM a 0,01 μM.

Při tomto ředění byl u obou inhibitorů použit jejich zásobní roztok o 10 mM koncentraci. Jednotlivé objemy inhibitorů byly zředěny pomocí DMSO na jejich finální koncentrace.

4.3.3. Stanovení inhibiční konstanty

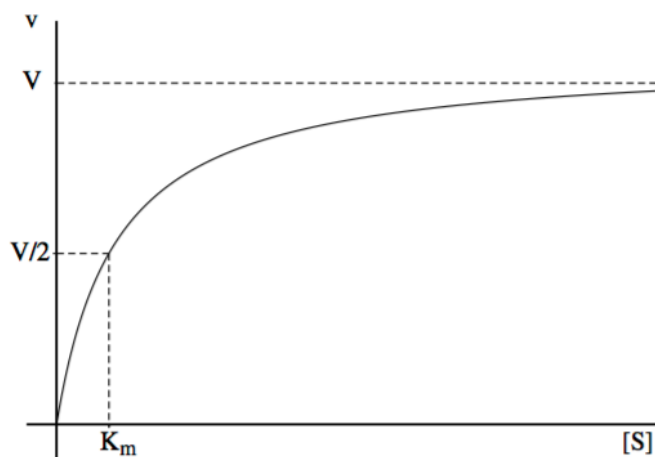
Inhibiční konstanta (K_i) vyjadřuje vzájemnou afinitu enzymu a inhibitoru. Hodnoty K_i slouží k porovnávání různých inhibitorů daného enzymu. Čím je hodnota K_i nižší, tím je inhibitor účinnější (Murray a sp. 2012).

Rychlost enzymatických reakcí je charakterizována rovnicí Michaelise a Mentenové (Obr. 17):

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Obr. 17. Rovnice dle Michaelise a Mentenové.

V_{\max} je maximální rychlost reakce, K_m je Michaelisovy konstanta, která udává míru afinity enzymu k substrátu. Čím je tato hodnota nižší, tím je afinita enzymu k danému substrátu větší. K_m se udává jako koncentrace substrátu, při které proběhne enzymová reakce poloviční rychlostí (Obr. 18).

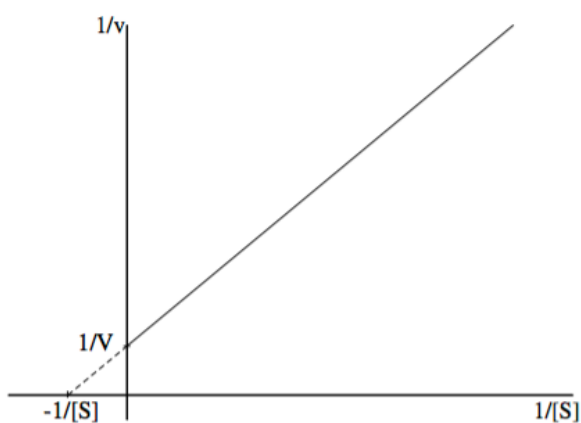


Obr. 18. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. (Grafické znázornění rovnice Michaelise a Mentenové)

Pro přesnější a snadnější stanovení K_m a V_{max} se často využívá rovnice dle Lineweavera a Burka (Obr. 19). K_m se určí pomocí převrácených hodnot, jak je znázorněno na obrázku (Obr. 20).

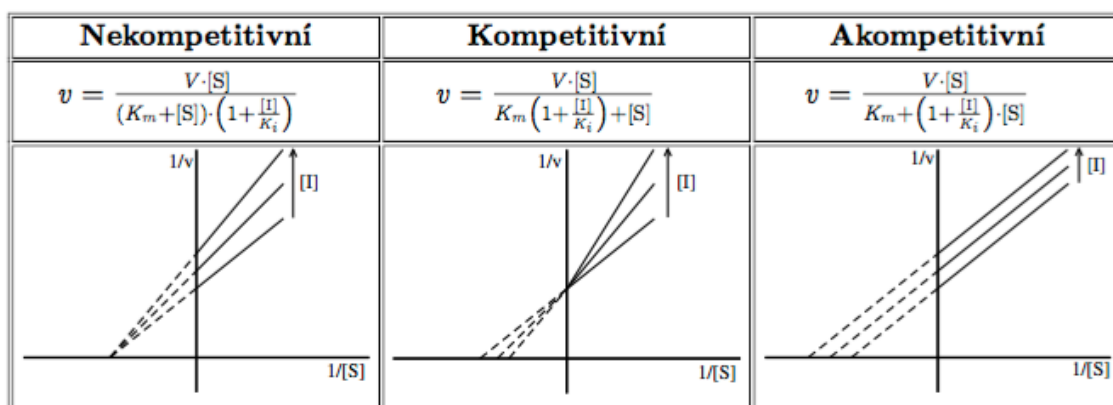
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Obr. 19. Rovnice dle Lineweavera a Burka.



Obr. 20. Převrácený logaritmus závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. (Grafické znázornění rovnice Linweavera a Burka)

Při snížení rychlosti enzymatické reakce mluvíme o její inhibici. Rozeznáváme tři typy inhibice (Obr. 21): 1) Kompetitivní nastává, když se substrát s inhibítorom váže na stejné „aktivní“ místo. Navázaný inhibitor pak není schopen přeměny na produkt. V tomto případě závisí na poměru koncentrace substrátu a inhibitoru. 2) Nekompetitivní inhibice nastává v případě, kdy se inhibitor váže na jiné místo, než je aktivní místo. Tím se změní konformace aktivního místa a enzym se už nemůže navázat. Tato inhibice není ovlivňována koncentrací substrátu. 3) Akompetitivní inhibice vzniká tehdy, když se inhibitor váže až na komplex enzym-substrát (Ledvina s sp. 2006).



Obr. 21. Inhibice - přehled grafů různých typů inhibice.

Postup pro stanovení inhibiční konstanty:

Postup inkubace byl stejný jako v předcházejících měřeních (kapitola 4.3.1.). Jediným rozdílem bylo použití různých koncentrací daunorubicinu a to 1000 μM , 800 μM , 600 μM , 400 μM , 200 μM . Tyto koncentrace daunorubicinu byly měřeny s DMSO (neinhibovaná reakce) a s inhibítorom v různých koncentracích. V případě DC se jednalo o 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM a v případě AZD se jednalo o 1 μM , 10 μM , 30 μM .

5. Výsledky a diskuze

5.1. Měření aktivit enzymů

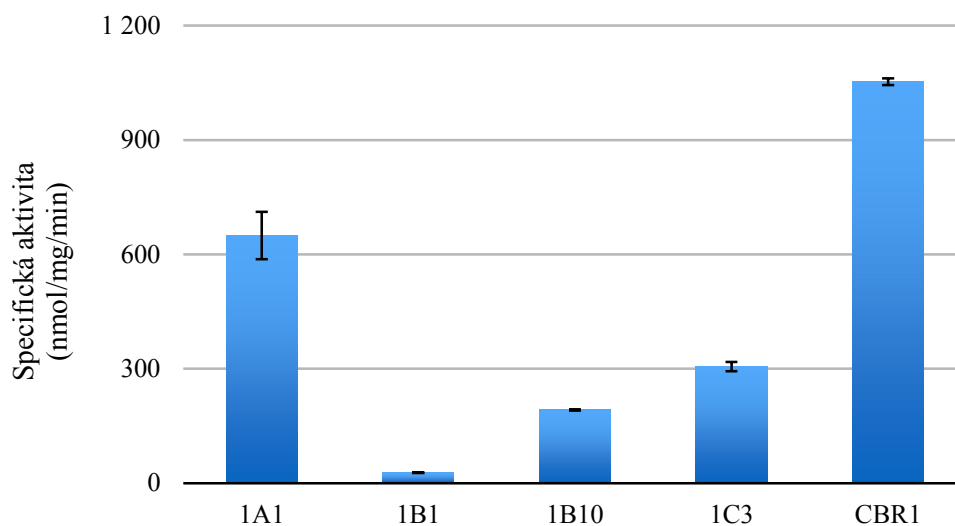
V první řadě byly vybrány enzymy z nadrodin aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), konkrátně AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, CBR1. Po první inkubaci byly zjištěny enzymy s nejvyšší aktivitou pro daunorubicin. Nejsilnější aktivitu prokázaly enzymy AKR1A1, AKR1C3, CBR1 (Obr. 22.), jejich přesné aktivity jsou popsány v tabulce 7. Ty byly vybrány pro další pokračování v měření.

Výpočet specifické aktivity:

Pomocí UHPLC bylo zjištěno množství přeměněného daunorubicinu na daunorubicinol. Na kolonu bylo nastříknuto 5 μ l vzorku. Jelikož byl předtím odparek rozpuštěn ve 400 μ l mobilní fáze a inkubace trvala 30 minut, bylo potřeba hodnotu po nástřiku převést na specifickou aktivitu v nanomolech na miligram bílkoviny na minutu inkubace (nmol/mg/min).

Tab. 5. Aktivita enzymů z nadrodin aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas (SDR)

| VZOREK | Specifická aktivita | Průměrná hodnota specifické aktivity |
|-------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Enzym | nmol/mg/min | nmol/mg/min |
| 1/ AKR1A1 | 600 | 651±61 |
| 2/ AKR1A1 | 737 | |
| 3/ AKR1A1 | 613 | |
| 1/ AKR1B1 | 27 | 28±0,9 |
| 2/ AKR1B1 | 28 | |
| 3/ AKR1B1 | 29 | |
| 1/ AKR1B10 | 191 | 193±1,6 |
| 2/ AKR1B10 | 195 | |
| 3/ AKR1B10 | 192 | |
| 1/ AKR1C3 | 290 | 307±12,3 |
| 2/ AKR1C3 | 319 | |
| 3/ AKR1C3 | 310 | |
| 1/ CBR1 | 1058 | 1054±9,1 |
| 2/ CBR1 | 1041 | |
| 3/ CBR1 | 1061 | |



Obr. 22. Porovnání aktivity vybraných aldo-ketoreduktas a karbonylreduktasy 1.

V první části mé práce byl sledován metabolismus antracyklinů, konkrétně daunorubicinu. Metabolismus antracyklinů enzymy nadrodiny aldo-ketoreduktas a nadrodiny karbonylreduktas s krátkým řetězcem (SDR) byl potvrzen různými studii i např.: studií Bainse a sp. (2010). Tyto přeměny nemusí probíhat vždy hladce, protože u některých lidských enzymů AKR1C3, AKR1C4 a AKR7A2 byly objeveny polymorfismy, které významně snižují metabolismus DOX a DAU *in vitro* o 23 - 61 % (Bains a sp. 2010). Mutace R170C a P180S v enzymu AKR1C3 se nacházejí ve vazebném místě kofaktoru a podílejí se na tvorbě vodíkových vazeb mezi enzymem a nikotinamidovým kruhem NADPH (Komoto et al., 2004). Předpokládá se, že tyto mutace ovlivňují vazbu kofaktoru, což nakonec významně snižuje enzymatickou konverzi DAUN a DOX na DAUNol a DOXol. Dále bylo vyzkoušeno, že DAU je obecně lepším substrátem pro enzymy nadrodiny AKR (jak pro jejich "wild-type", tak i mutantní formy) oproti DOX (Bains a sp. 2010). Na druhou stranu lidská CBR1 metabolizuje DAU mnohem lépe než většina AKR a CBR (Bains a sp. 2010), což bylo potvrzeno i v této práci po úvodním screeningu vybraných enzymů.

Měření aktivity vybraných enzymů nadrodiny aldo-ketoreduktas a CBR1 v této práci probíhalo *in vitro*. Pro DAU byla zjištěna nejvyšší specifická aktivita u enzymu CBR1 (1054 nmol/mg/min). Specifická aktivita se u ostatních enzymů pak postupně snižovala, AKR1A1 (651 nmol/mg/min), AKR1C3 (307 nmol/mg/min), AKR1B10 (193 nmol/mg/min) a AKR1B1 (28 nmol/mg/min). Z těchto výsledků vyplývá, že CBR1 je nejlepším redukcujícím enzymem pro DAU za podmínek *in vitro*.

Ve se studii Bainse a sp. (2010) byl neaktivnějším enzymem k DAU AKR7A2, po něm AKR1B10, dále AKR1C3, AKR1C4 a AKR1B1. Bohužel nemůžeme přesně porovnat aktivitu všech uvedených enzymů. Bains a sp. (2010) nepracovali s enzymem CBR1, který v této práci vystupuje jako neaktivnější. Naopak v naší práci jsme se nezabývali enzymovou aktivitou AKR7A a AKR1C4. Alespoň z částečného porovnání výsledků můžeme říci, že v naší práci byl aktivnější AKR1C3 než AKR1B10, jako je tomu ve studii Bainse.

Aktivita enzymu AKR1C3 k DAU byla také zjištěna ve studii Hofman a sp. (2014) který, ale pracoval ještě s dalšími antracykliny (konkrétně doxorubicinem a idarubicinem) a z jejich výsledků vyplynulo, že daunorubicin a idarubicin jsou lepšími substráty pro AKR1C3 než doxorubicin.

Jak již bylo zmíněno, různé karbonyl redukcující enzymy vykazují aktivitu

i k ostatním antracyklinům. Výsledky enzymů metabolizující antracykliny v této práci jsme porovnali se studií Hofmana a sp. (2015), kde se měřilo se stejnými enzymy, ale jako substrát byl použit DOX. V této studii byla zjištěna nejvyšší aktivita k DOX na enzymu AKR1C3 u dalších enzymů se pak postupně snižovala (AKR1C3 > CBR1 > AKR1A1 > AKR1B10 > CBR3 > AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4). Vzhledem k tomu, že pouze AKR1C3, CBR1 a AKR1A1 mají značnou aktivitu vůči DOX je pravděpodobné, že se nejvíce účastní metabolismu DOX *in vivo*. V naší práci také tyto tři zmíněné enzymy dosáhly nejvyšších hodnot specifické aktivity. Pouze v měření s DAU byly aktivity zjištěny v jiném pořadí a to od nejaktivnějšího CBR1 > AKR1A1 > AKR1C3.

Můžeme říci, že právě tyto tři enzymy se nejlépe osvědčily svou redukující aktivitou k DAU i DOX. Z výsledků vyplývá, že lepším substrátem pro AKR1C3 je DOX a pro enzym CBR1 je to DAU.

5.2. Stanovení vlivu dimethylsulfoxidu (DMSO) na enzymy AKR1C3 a CBR1

Stanovení vlivu DMSO je jedním z důležitých faktorů, který může ovlivnit chování enzymů. Jelikož jsou inhibitory rozpuštěny v DMSO, (kromě palbociclibu, který je rozpuštěn ve vodě) předpokládá se, že samotné DMSO by mohlo ovlivnit výsledky aktivity enzymů u jednotlivých měření. Proto byla do těchto měření zařazena kontrola s DMSO.

Tab. 6. Vliv DMSO na enzymy AKR1C3 a CBR1

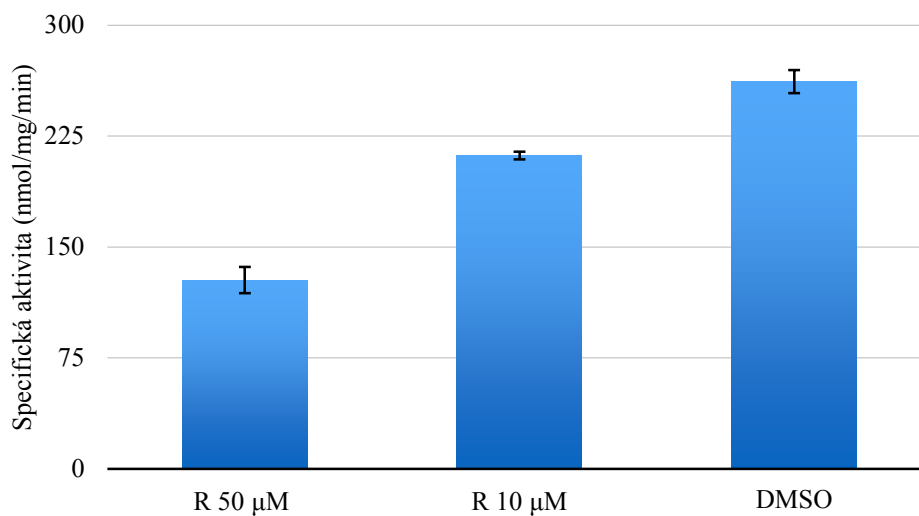
| | Neinhibovaná reakce (bez DMSO) | DMSO | |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | Specifická aktivita (nmol/min/mg) | Specifická aktivita (nmol/min/mg) | Průměrná hodnota inhibice (%) |
| AKR1C3 | 176 ± 7,1 | 147 ± 4,4 | 15 ± 10,7 |
| CBR1 | 849 ± 2,8 | 838 ± 4,5 | 6 ± 6,7 |

5.3. Vliv inhibitorů CDK na aktivitu enzymů AKR1C3 a CBR1

Ovlivnění aktivity enzymů AKR1C3 a CBR1 bylo zjišťováno s inhibitory CDK: R547, palbociclib, AT5719, SNS032, AZD5438, dinaciclub, flavopiridol, LEE011 a purvalanol A. V měření byly použity dvě koncentrace inhibitorů 50 μ M a 10 μ M. Vzorky byly změřeny v triplicátech pro každou z těchto koncentrací. Z nich byla stanovena průměrná hodnota pro aktivitu a inhibici (Tab. 7 - 24). V grafech jsou znázorněny specifické aktivity jednotlivých inhibitorů v procentech (Obr. 23 - 40).

Tab. 7. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem R547

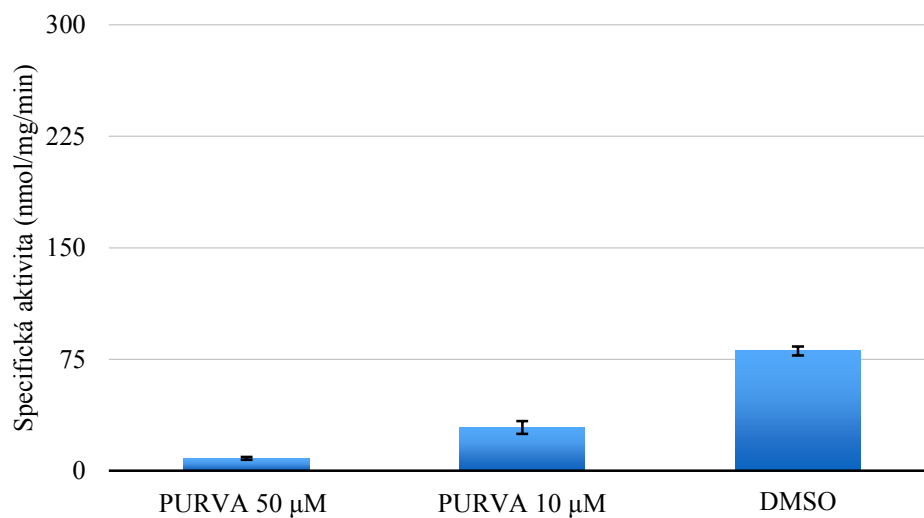
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor R547 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 120 | 121 \pm 9 | 49 | 51 |
| 2/ 50 μM | 123 | | | |
| 3/ 50 μM | 140 | | | |
| 1/ 10 μM | 213 | 213 \pm 3 | 81 | 19 |
| 2/ 10 μM | 215 | | | |
| 3/ 10 μM | 209 | | | |
| 1/ DMSO | 251 | 259 \pm 8 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 268 | | | |
| 3/ DMSO | 265 | | | |



Obr. 23. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem R547. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 8. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibítozem purvalanolem A

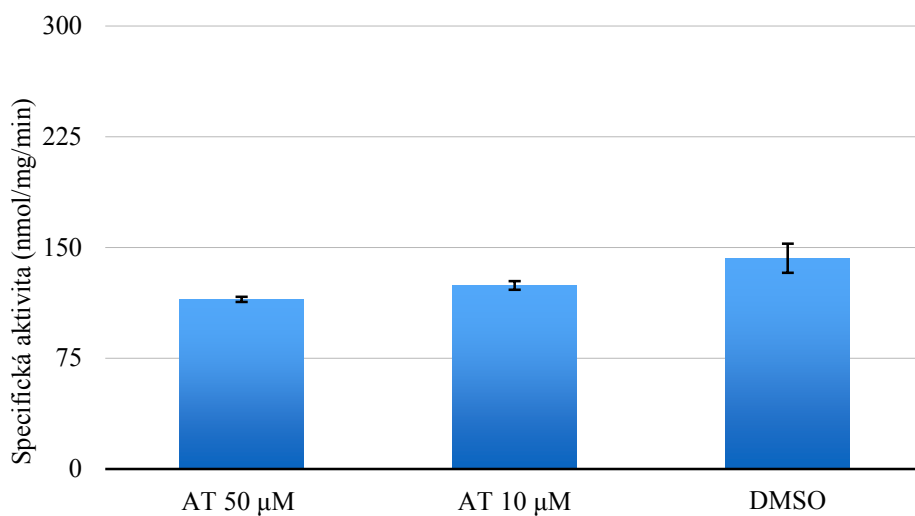
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Purvalanol | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 7 | 8 ± 1 | 10 | 90 |
| 2/ 50 μM | 9 | | | |
| 3/ 50 μM | 9 | | | |
| 1/ 10 μM | 26 | 29 ± 4 | 36 | 64 |
| 2/ 10 μM | 35 | | | |
| 3/ 10 μM | 26 | | | |
| 1/ DMSO | 78 | 81 ± 3 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 80 | | | |
| 3/ DMSO | 85 | | | |



Obr. 24. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibítozem purvalanolem A. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků ± směrodatná odchylka.

Tab. 9. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem AT5719

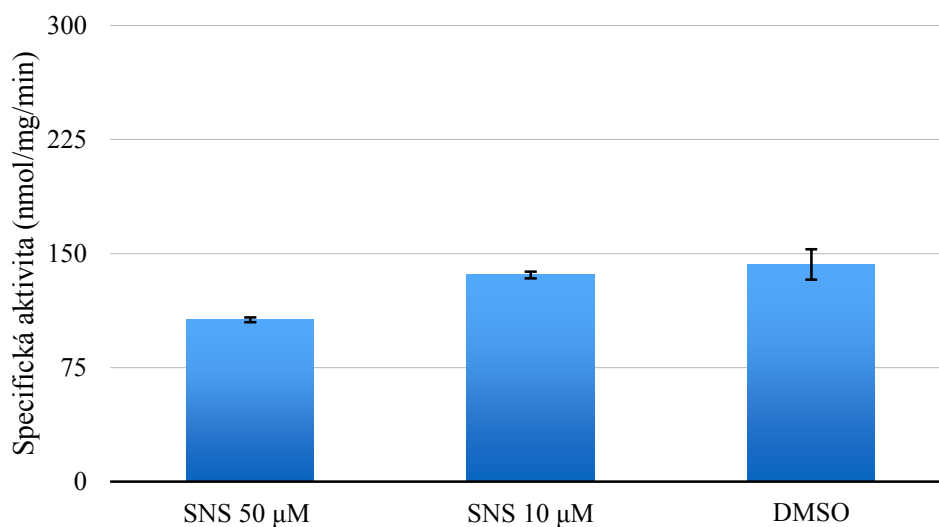
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické activity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor AT5719 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 117 | 115 \pm 2 | 80 | 20 |
| 2/ 50 μM | 113 | | | |
| 3/ 50 μM | 114 | | | |
| 1/ 10 μM | 123 | 124 \pm 3 | 87 | 13 |
| 2/ 10 μM | 121 | | | |
| 3/ 10 μM | 128 | | | |
| 1/ DMSO | 143 | 143 \pm 10 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 155 | | | |
| 3/ DMSO | 130 | | | |



Obr. 25. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem AT7519. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 10. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem SNS032

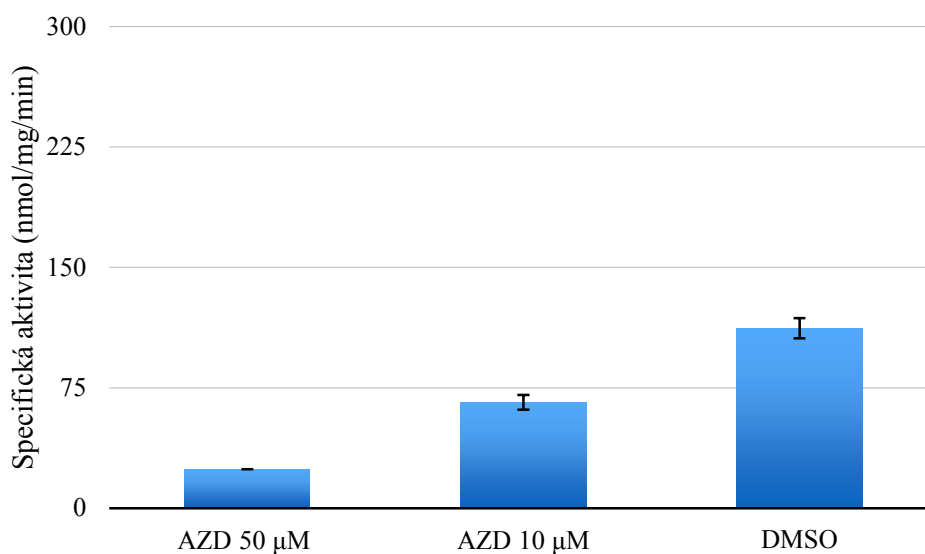
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor SNS032 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 108 | 106 \pm 2 | 75 | 25 |
| 2/ 50 μM | 107 | | | |
| 3/ 50 μM | 104 | | | |
| 1/ 10 μM | 133 | 136 \pm 2 | 95 | 5 |
| 2/ 10 μM | 137 | | | |
| 3/ 10 μM | 137 | | | |
| 1/ DMSO | 143 | 143 \pm 10 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 155 | | | |
| 3/ DMSO | 130 | | | |



Obr. 26. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem SNS032. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 11. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem AZD5438

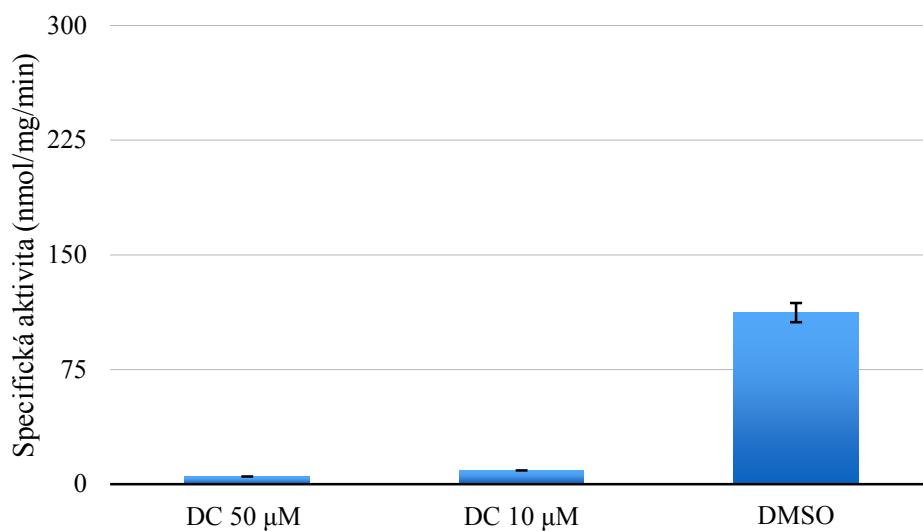
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibice AZD5438 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 24 | 24 \pm 0 | 21 | 79 |
| 2/ 50 μM | 24 | | | |
| 3/ 50 μM | 24 | | | |
| 1/ 10 μM | 61 | 66 \pm 5 | 59 | 41 |
| 2/ 10 μM | 70 | | | |
| 1/ DMSO | 119 | 112 \pm 6 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 104 | | | |
| 3/ DMSO | 114 | | | |



Obr. 27. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem AZD5438. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). První a třetí sloupec představují průměr ze tří vzorků, druhý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 12. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem dinaciclíbem

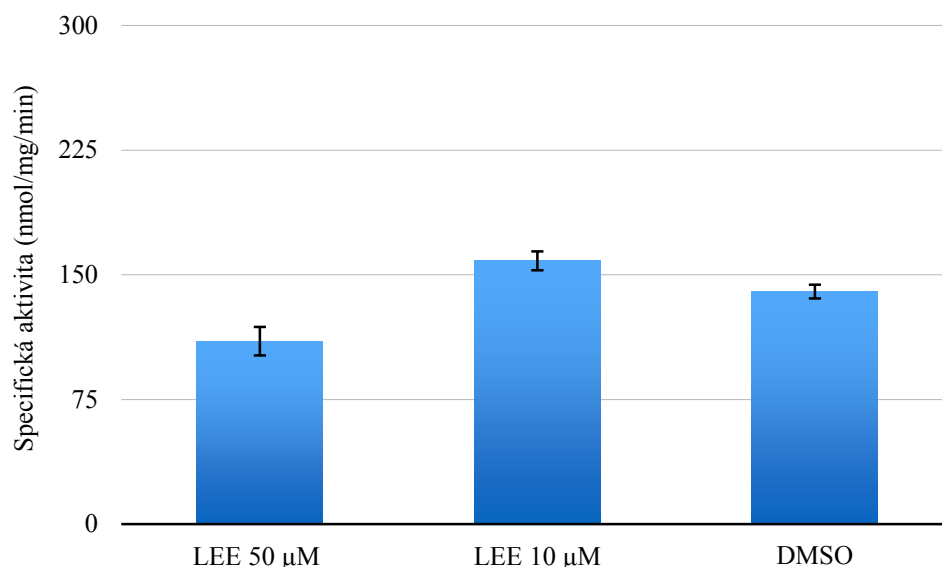
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Dinaciclíb | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 5 | 5±0 | 4 | 96 |
| 2/ 50 μM | 5 | | | |
| 3/ 50 μM | 5 | | | |
| 1/ 10 μM | 9 | 9±0 | 8 | 92 |
| 2/ 10 μM | 9 | | | |
| 3/ 10 μM | 9 | | | |
| 1/ DMSO | 119 | 112±6 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 104 | | | |
| 3/ DMSO | 114 | | | |



Obr. 28. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem dinaciclíbem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků ± směrodatná odchylka.

Tab. 13. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem LEE011

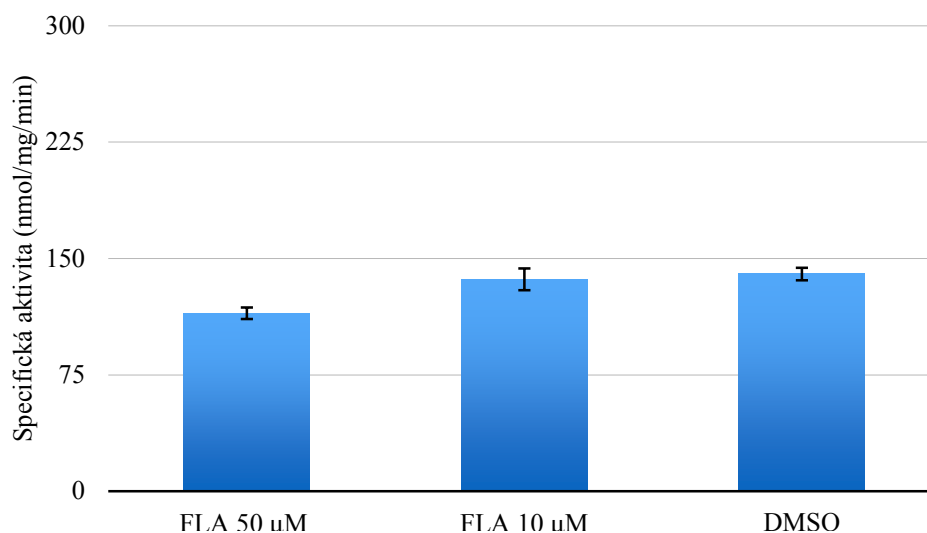
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor LEE011 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 99 | 111 \pm 9 | 79 | 21 |
| 2/ 50 μM | 117 | | | |
| 3/ 50 μM | 117 | | | |
| 1/ 10 μM | 167 | 159 \pm 6 | 113 | -13 |
| 2/ 10 μM | 155 | | | |
| 3/ 10 μM | 155 | | | |
| 1/ DMSO | 144 | 141 \pm 4 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 143 | | | |
| 3/ DMSO | 135 | | | |



Obr. 29. Aktivita enzymu AKR1C3 s inhibitorem LEE011. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 14. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibitorem flavopiridolem

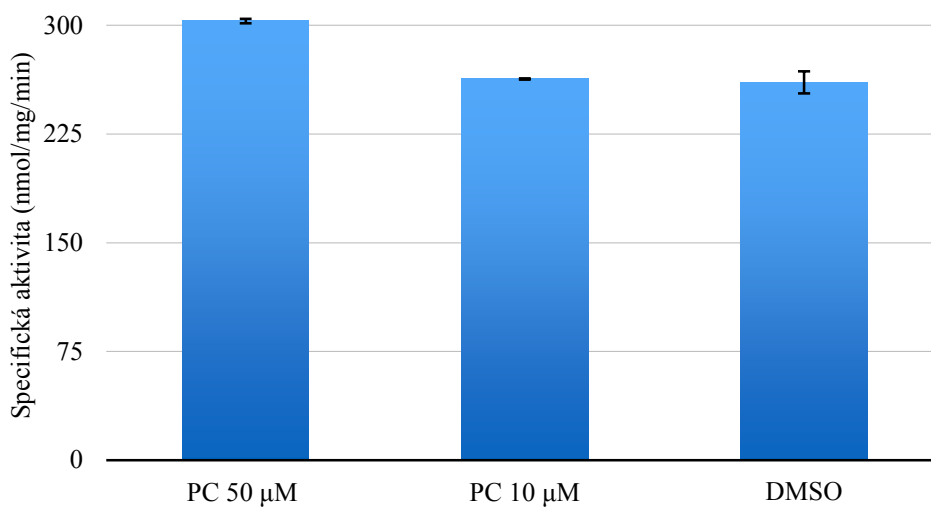
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Flavopiridol | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 120 | 116 \pm 4 | 82 | 18 |
| 2/ 50 μM | 116 | | | |
| 3/ 50 μM | 111 | | | |
| 1/ 10 μM | 129 | 137 \pm 7 | 98 | 3 |
| 2/ 10 μM | 145 | | | |
| 3/ 10 μM | 137 | | | |
| 1/ DMSO | 144 | 140 \pm 4 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 143 | | | |
| 3/ DMSO | 135 | | | |



Obr. 30. Aktivity enzymu AKR1C3 s flavopiridolem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 15. Stanovení aktivity enzymu AKR1C3 s inhibítoem palbociclibem

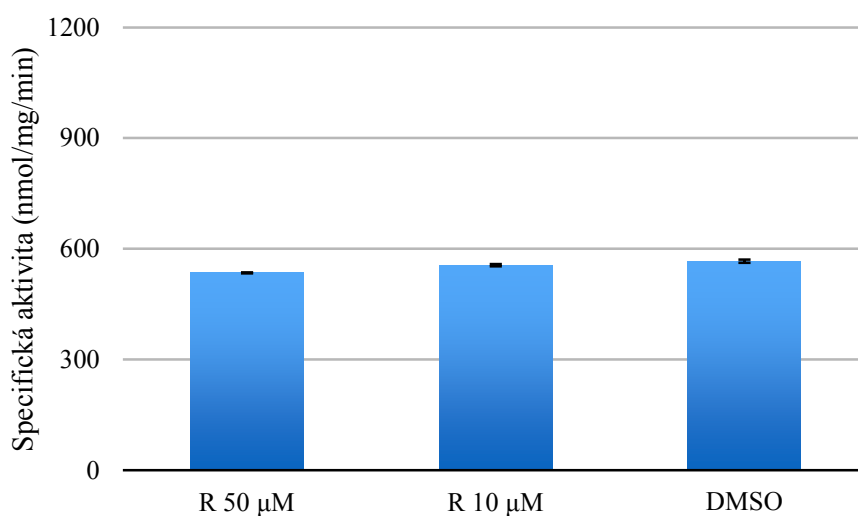
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Palbociclib | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 304 | 303 \pm 2 | 116 | -16 |
| 2/ 50 μM | 301 | | | |
| 1/ 10 μM | 263 | 263 \pm 0 | 101 | -1 |
| 2/ 10 μM | 262 | | | |
| 1/ DMSO | 251 | 261 \pm 8 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 268 | | | |
| 3/ DMSO | 265 | | | |



Obr. 31. Aktivita enzymu AKR1C3 s palbociclibem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků (u DMSO ze tří vzorků) \pm směrodatná odchylka.

Tab. 16. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem R547

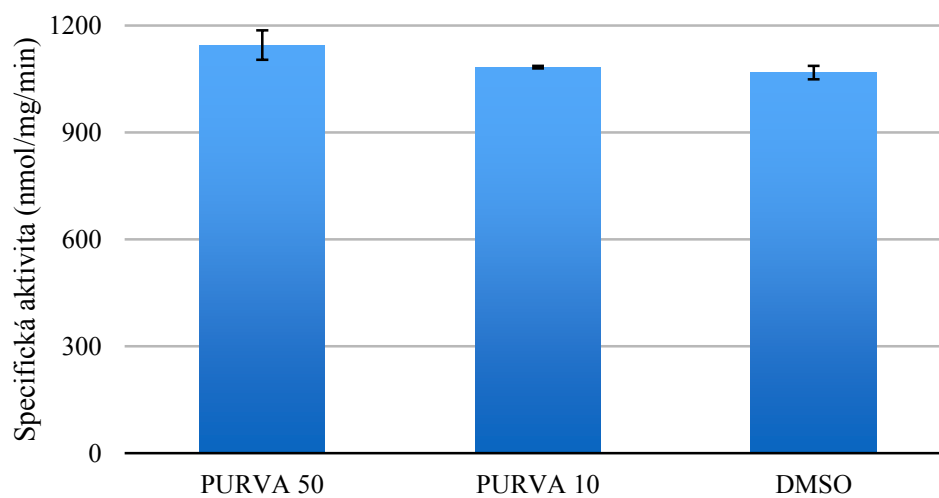
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|-----------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor R547 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 536 | 535 \pm 1 | 94 | 6 |
| 2/ 50 μM | 534 | | | |
| 1/ 10 μM | 560 | 557 \pm 3 | 98 | 2 |
| 2/ 10 μM | 555 | | | |
| 1/ DMSO | 571 | 566 \pm 4 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 562 | | | |



Obr. 32. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem R547. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 17. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem purvalanolem A

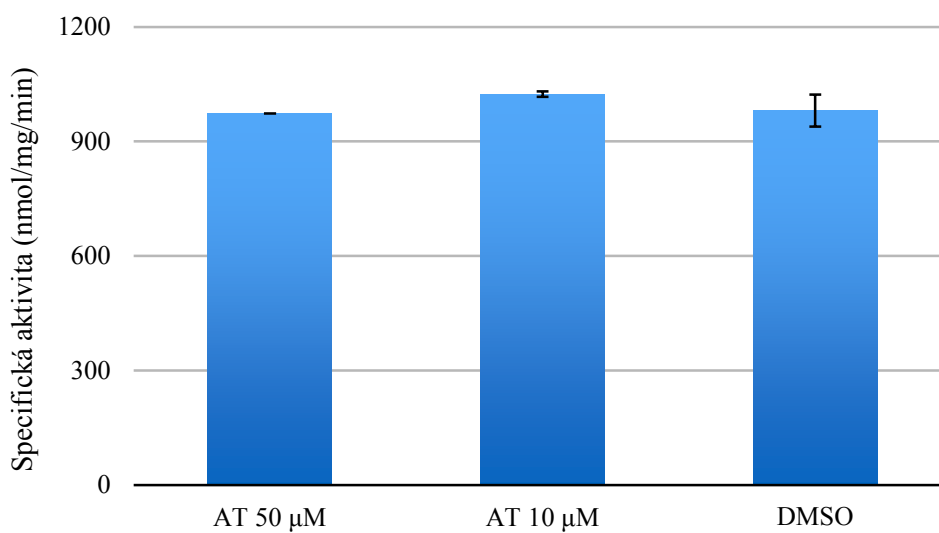
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Purvalanol | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 1104 | 1145 \pm 41 | 107 | -7 |
| 2/ 50 μM | 1186 | | | |
| 1/ 10 μM | 1079 | 1083 \pm 4 | 101 | -1 |
| 2/ 10 μM | 1087 | | | |
| 1/ DMSO | 1049 | 1067 \pm 19 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 1086 | | | |



Obr. 33. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem purvalanolem A. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 18. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem AT7519

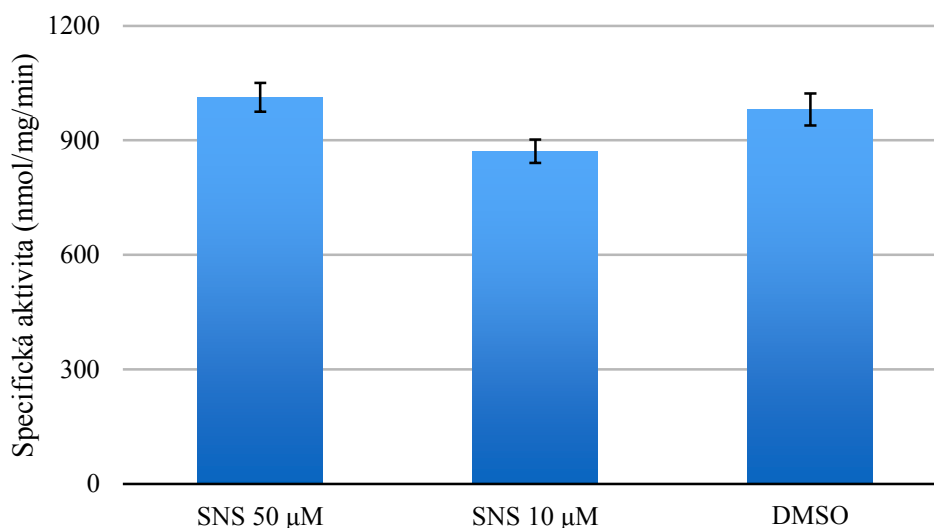
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměrná specifická aktivita | Aktivita | Inhibice |
|----------------------|---------------------|------------------------------|----------|----------|
| Inhibitor AT 7519 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 974 | 974 \pm 0 | 99 | 1 |
| 2/ 50 μM | 973 | | | |
| 1/ 10 μM | 1031 | 1024 \pm 7 | 104 | -4 |
| 2/ 10 μM | 1017 | | | |
| 1/ DMSO | 939 | 981 \pm 42 | 100 | 0 |
| 2 /DMSO | 1023 | | | |



Obr. 34. Aktivity enzymu CBR1 s inhibitorem AT7519. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 19. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem SNS032

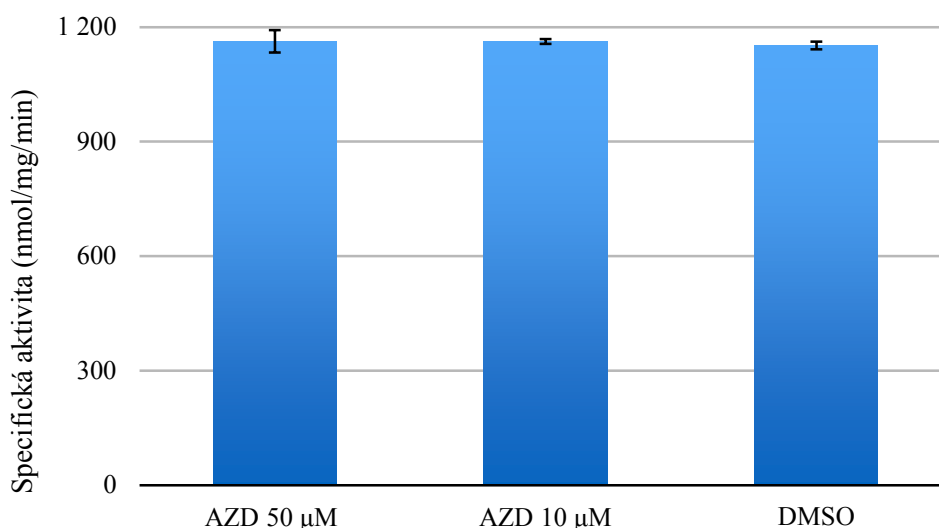
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor SNS032 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 975 | 1013 \pm 38 | 103 | -3 |
| 2/ 50 μM | 1050 | | | |
| 1/ 10 μM | 902 | 871 \pm 31 | 89 | 11 |
| 2/ 10 μM | 841 | | | |
| 1/ DMSO | 939 | 981 \pm 42 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 1023 | | | |



Obr. 35. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem SNS032. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 20. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem AZD5438

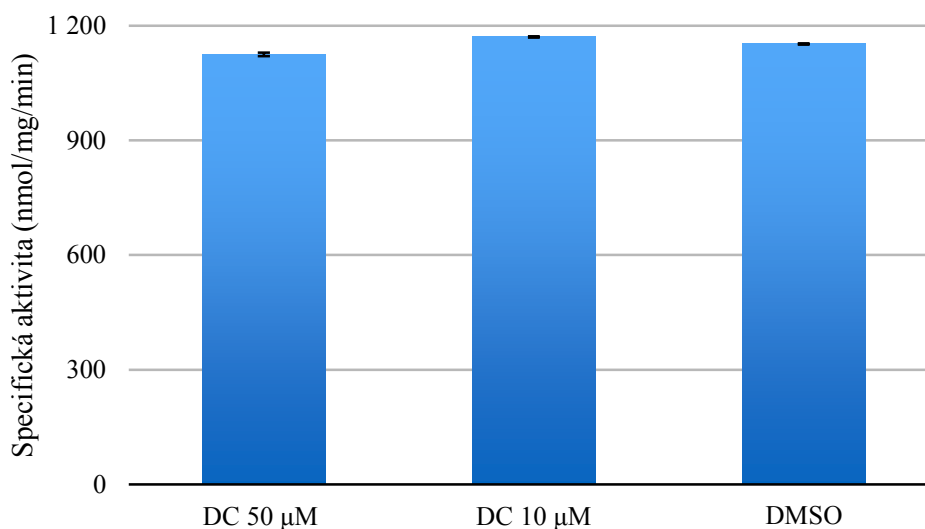
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor AZD5438 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 1190 | 1163 \pm 24 | 100 | 0 |
| 2/ 50 μM | 1133 | | | |
| 3/ 50 μM | 1165 | | | |
| 1/ 10 μM | 1167 | 1162 \pm 5 | 100 | 0 |
| 2/ 10 μM | 1155 | | | |
| 3/ 10 μM | 1163 | | | |
| 1/ DMSO | 1161 | 1159 \pm 10 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 1158 | | | |
| 3/ DMSO | 1138 | | | |



Obr. 36. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem AZD5438. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab.21. Výsledky měření inhibice CBR1 s dinacilibem

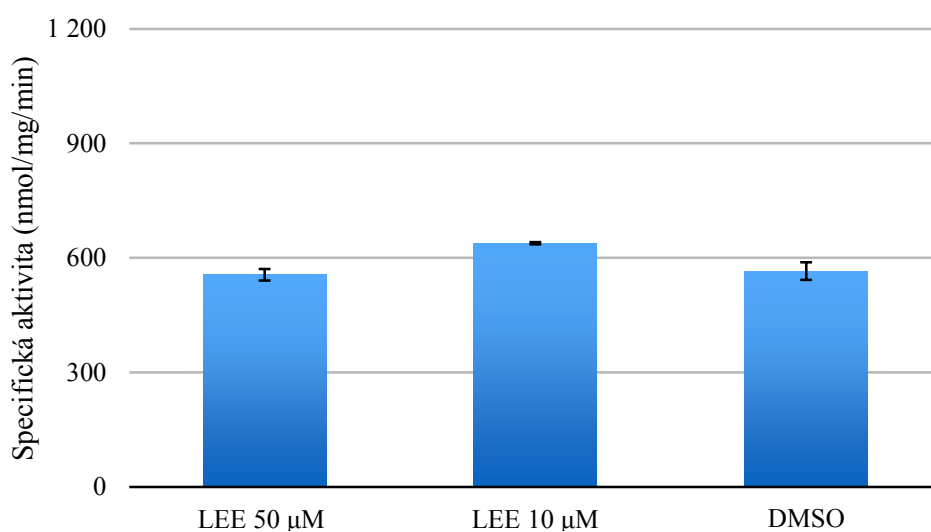
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Dinacilib | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 1129 | 1125 \pm 5 | 97 | 3 |
| 2/ 50 μM | 1120 | | | |
| 1/ 10 μM | 1169 | 1171 \pm 1 | 101 | -1 |
| 2/ 10 μM | 1172 | | | |
| 1/ DMSO | 1160 | 1159 \pm 2 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 1157 | | | |



Obr. 37. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem dinacilibem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 22. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem LEE011

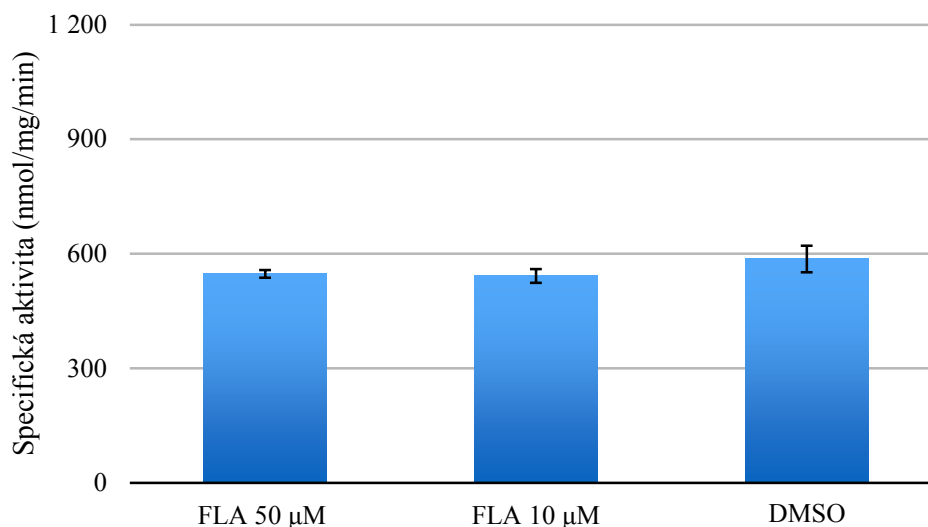
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor LEE011 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 540 | 556 \pm 15 | 98 | 2 |
| 2/ 50 μM | 571 | | | |
| 1/ 10 μM | 635 | 638 \pm 3 | 112 | -12 |
| 2/ 10 μM | 641 | | | |
| 1/ DMSO | 591 | 569 \pm 23 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 546 | | | |



Obr. 38. Aktivita enzymu CBR1 s inhibitorem dinacilibem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 23. Výsledky měření inhibice CBR1 flavopirodolem

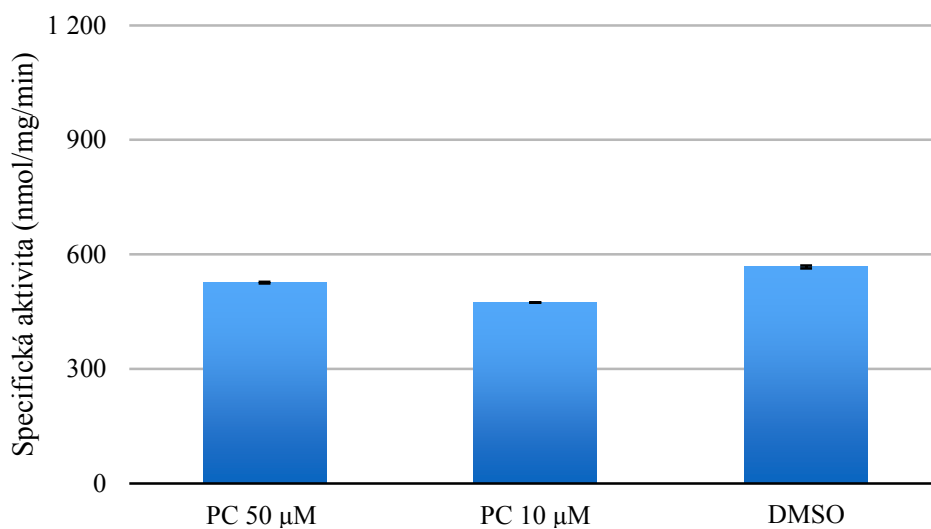
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Flavopiridol | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 552 | 548 \pm 10 | 93 | 7 |
| 2/ 50 μM | 557 | | | |
| 3/ 50 μM | 533 | | | |
| 1/ 10 μM | 567 | 542 \pm 18 | 92 | 8 |
| 2/ 10 μM | 534 | | | |
| 3/ 10 μM | 525 | | | |
| 1/ DMSO | 591 | 589 \pm 35 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 630 | | | |
| 3/ DMSO | 546 | | | |



Obr. 39. Aktivita enzymu CBR1 s flavopiridolem. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze tří vzorků \pm směrodatná odchylka.

Tab. 24. Výsledky měření inhibice CBR1 inhibitorem palbociclibem

| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické activity | Aktivita | Inhibice |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| Inhibitor Palbociclib | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 50 μM | 524 | 526 ± 2 | 93 | 7 |
| 2/ 50 μM | 528 | | | |
| 1/ 10 μM | 474 | 474 ± 1 | 84 | 16 |
| 2/ 10 μM | 475 | | | |
| 1/ DMSO | 571 | 567 ± 4 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 563 | | | |



Obr. 40. Aktivita enzymu CBR1 s PC. DMSO jakožto kontrolní vzorek představuje maximální aktivitu (100 %). Každý sloupec představuje průměr ze dvou vzorků \pm směrodatná odchylka.

V druhé části mé práce se zabývám účinkem inhibitorů CDK k enzymům AKR1C3 a CBR1. Inhibitory CDK snižují eflux ANT z buňky (Gottesman a sp. 2002), pokud by i efektivně inhibovaly enzymy AKR a CBR, výrazně by se tím zvýšil účinek ANT.

Snahou této práce bylo určení inhibice karbonyl redukujících enzymů AKR1C3 a CBR1 s inhibitory CDK. V této studii bylo použito devět vybraných inhibitorů CDK: R547, palbociclib, AT7519, SNS032, AZD5438, dinaciclib, flavopiridol, LEE011, purvalanol A. Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že některé inhibitory velmi dobře snižují aktivitu AKR1C3, naopak některé mají velmi malý nebo nemají žádný vliv na daný typ enzymu (Tab. 25, Obr. 50). Nejlépe se osvědčily inhibitory AZD5438, dinaciclib a purvalanol A. Nejsilnější inhibiční aktivitu vykazoval inhibitor dinaciclib, který inhiboval enzym z 96 % při 50 μ M koncentraci inhibitoru a z 92 % při 10 μ M koncentraci. Purvalanol A inhiboval enzym z 90 % při 50 μ M koncentraci inhibitoru a z 64 % při 10 μ M koncentraci. AZD5438 měl inhibiční aktivitu 78 % při 50 μ M koncentraci inhibitoru a 41 % při 10 μ M koncentraci. U dalších inhibitorů byla inhibice stanovena mezi 20 - 50 % při 50 μ M koncentraci inhibitoru a mezi 3 - 19 % při 10 μ M koncentraci inhibitoru. Např. u LEE byla změřena inhibice v 50 μ M koncentraci, ale při nižší koncentraci nedocházelo k žádné inhibici. Dokonce u PC (Tab.15) je jasně zobrazeno, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru docházelo ke zvýšení aktivity enzymu a PC se v tomto případě choval spíše jako aktivátor. Proto do dalšího pokračování měření byly vybrány pouze dva enzymy: dinaciclib a AZD5438. Zbylý purvalanol A by měl být předmětem dalšího studia.

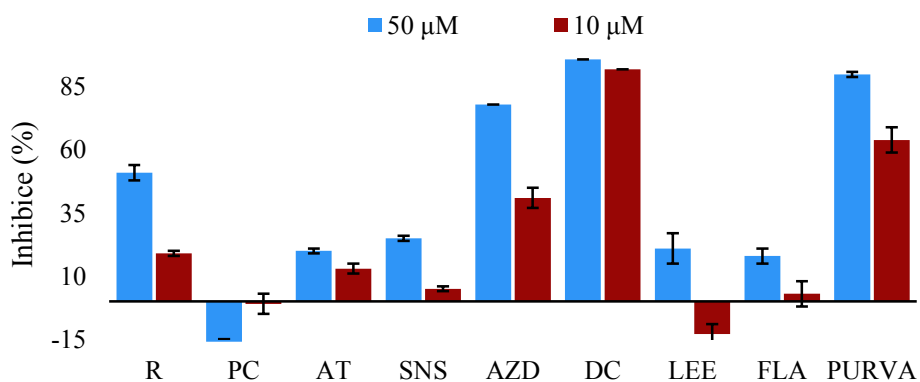
Naopak enzym CBR1 nebyl pomocí inhibitorů CDK inhibován tak významně jako enzym AKR1C3. Bohužel se nenašel inhibitor CDK, který by měl silnou inhibiční aktivitu k tomuto enzymu. Inhibice CBR1 se pohybovaly mezi 1 - 16 %. AZD a PURVA nevykazovali inhibiční aktivitu vůbec. Při takto slabých inhibicích jsme se už dalším studiem těchto látek nezabývali. Výsledky inhibice pro CBR1 jsou shrnuté v tabulce 26 a graficky znázorněny na Obr. 42.

Při stanovování aktivity inhibice některých inhibitorů CDK, konkrétně u enzymu CBR1 s inhibitorem SNS032 a purvalanolem A, na první pohled z grafu vyplývá, že koncentrovanější roztok (50 μ M) měl menší inhibiční aktivitu k enzymu než inhibitor o 10 μ M koncentraci. Zdá se, že zde také dochází ke zvýšení aktivity enzymu při zvyšující se koncentraci inhibitoru. Při inkubacích těchto inhibitorů se postupovalo

přesně dle postupu v kapitole 4.3.1. Je pravděpodobné, že tyto výsledky byly zapříčiněny chybou měření.

Tab. 25. Souhrn naměřených hodnot inhibice v % jednotlivých inhibitorů k enzymu AKR1C3

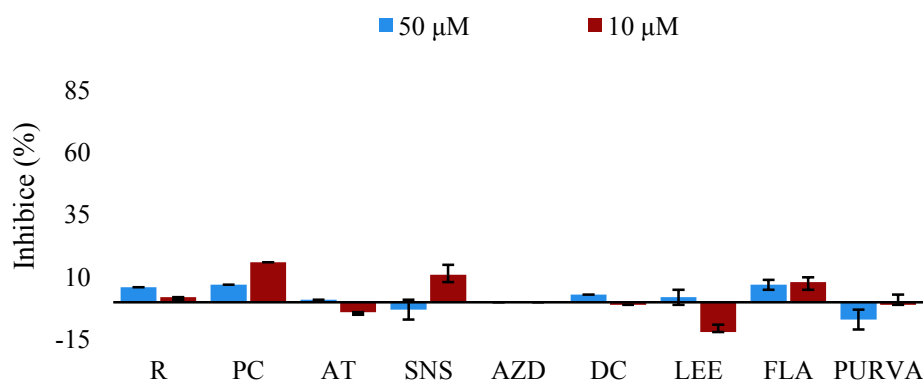
| | R | PC | AT | SNS | AZD | DC | LEE | FLA | PURVA |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 50 μ M | 51 \pm 3 | -16 \pm 1 | 20 \pm 1 | 25 \pm 1 | 79 \pm 0 | 96 \pm 0 | 21 \pm 6 | 18 \pm 3 | 90 \pm 1 |
| 10 μ M | 19 \pm 1 | -1 \pm 4 | 13 \pm 2 | 5 \pm 1 | 41 \pm 4 | 92 \pm 0 | -13 \pm 4 | 3 \pm 5 | 64 \pm 5 |



Obr. 50. Porovnání inhibice jednotlivých inhibitorů v koncentraci 50 μ M a 10 μ M k enzymu AKR1C3.

Tab. 26. Souhrn naměřených hodnot inhibice v % jednotlivých inhibitorů k enzymu CBR1

| | R | PC | AT | SNS | AZD | DC | LEE | FLA | PURVA |
|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-------------|-----------|------------|
| 50 μ M | 6 \pm 0 | 7 \pm 0 | 1 \pm 0 | -3 \pm 4 | 0 \pm 0 | 3 \pm 0 | 2 \pm 3 | 7 \pm 2 | -7 \pm 4 |
| 10 μ M | 2 \pm 1 | 16 \pm 0 | 0 \pm 1 | 11 \pm 3 | 0 \pm 0 | -1 \pm 0 | -12 \pm 0 | 8 \pm 3 | -1 \pm 0 |



Obr. 51. Porovnání inhibice jednotlivých inhibitorů v koncentraci 50 μM a 10 μM k enzymu CBR1.

Neměli bychom také opomenout, že některé z vypsanych inhibitorů CDK se řadí také k významným inhibitorům a substrátům pro ABC-transportéry a počítat tak ještě s další možností zasažení do procesů v lidských buňkách. Např. inhibitory flavopiridol a SNS-032 nejenže inhibují ABC-transportéry, ale oba docílily synergického antiproliferačního efektu v nádorových buňkách v kombinaci se substráty ABC-transportérů např. daunorubicinem nebo topotekanem. Taková to kombinace by možná mohla vést k překonání vícečetné lékové rezistence. Dinaciclub je pro některé ABC-transportéry substrátem, ale také inhibitorem, který značně inhibuje eflux daunorubicinu zprostředkovaný jedním z ABC-transportérů. Právě dinaciclub může ovlivňovat eflux přes membrány a proto by mohl vést k lékovým interakcím (Číhalová a sp. 2015).

Slibnou cestou pro terapii nádorových onemocnění by mohla být možnost užití inhibitoru CDK, který má vliv, jak na karbonyl redukující enzymy, tak na ABC-transportéry. Za prvé by nedocházelo k přeměně látky na její méně účinnější formu v podobě sekundárního metabolitu, čímž by se pravděpodobně mohlo zabránit i rezistenci nádorových buněk na léčbu daunorubicinem. Za druhé by nedocházelo k efluxu cytostatika ven z buňky a lék by nebyl tak rychle eliminován. Nádorová terapie by byla podpořena na dvou klíčových místech. Teoreticky by se tímto duálním mechanismem mohly snížit dávky podávaného cytostatika.

5.4. Stanovení IC₅₀ pro vybrané inhibitory

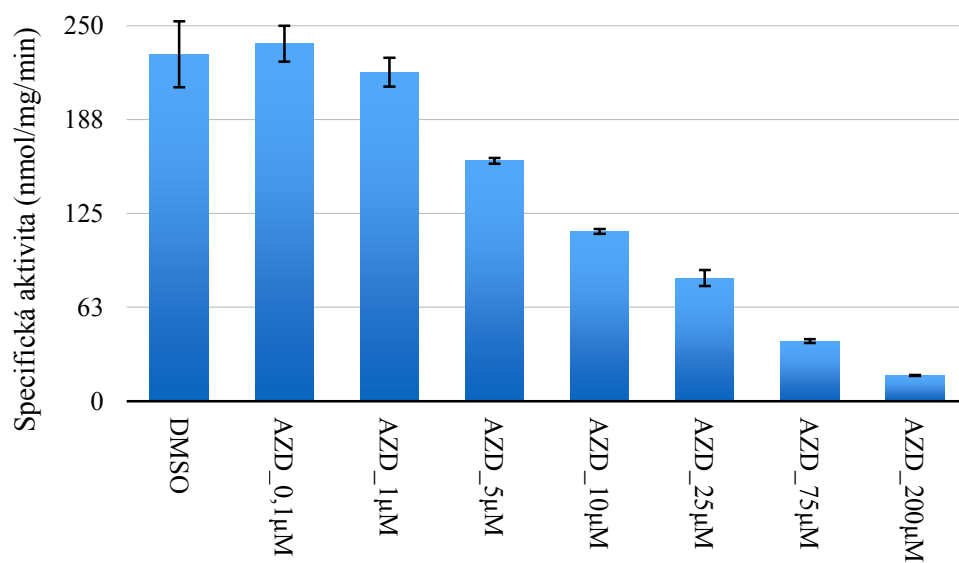
Pro další detailnější testování byl vybrán enzym AKR1C3 s inhibitory AZD5438 a dinaciclíbem. Dle předchozího měření se tato kombinace enzymu s inhibitory prokázala jako jedna z nejlepších. Koncentrace jednotlivých inhibitorů byly zvoleny podle předchozího měření u AZD5438: 200, 75, 25, 10, 5, 1, 0,1 μM, u dinaciclíbu: 200, 50, 1, 0,1, 0,01 μM. V následujících tabulkách (Tab. 27, 28) jsou uvedeny výsledky inkubace pro inhibiční koncentraci (IC₅₀). Na obrázcích (Obr. 44, 45) jsou graficky znázorněny specifické aktivity jednotlivých koncentrací inhibitorů. Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny pomocí programu GraphPadPrism7 (Obr. 46, 47).

Tab. 27. Výsledky měření pro IC₅₀ s AZD

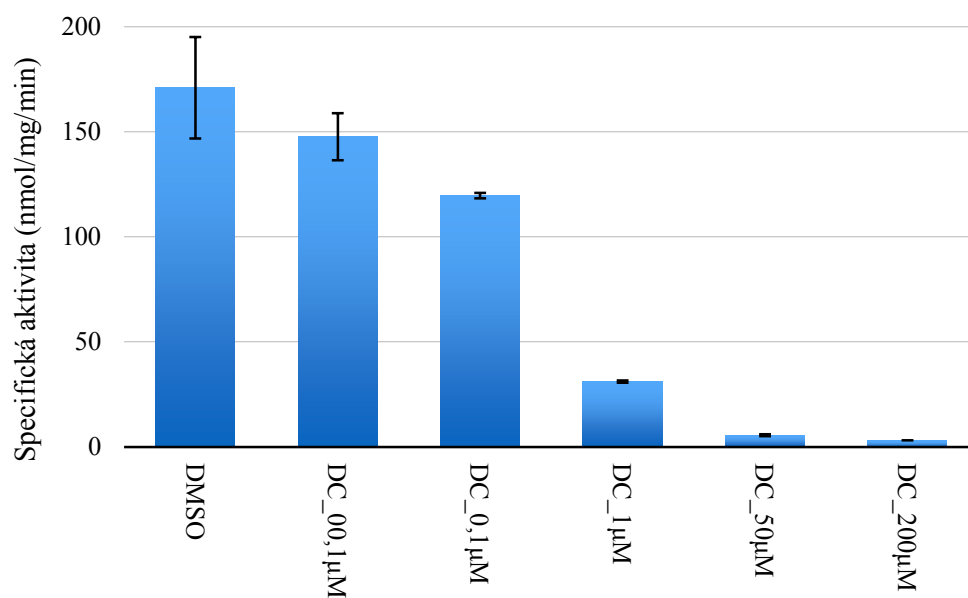
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|-----------------|---------------------|----------------------------|----------|----------|
| AZD5438 | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 200μM | 16 | 17 ± 0 | 7 | 93 |
| 2/ 200μM | 17 | | | |
| 3/ 200μM | 17 | | | |
| 1/ 75μM | 39 | 40 ± 1 | 17 | 83 |
| 2/ 75μM | 39 | | | |
| 3/ 75μM | 41 | | | |
| 1/ 25μM | 87 | 82 ± 5 | 35 | 65 |
| 2/ 25μM | 75 | | | |
| 3/ 25μM | 84 | | | |
| 1/ 10μM | 113 | 113 ± 2 | 49 | 51 |
| 2/ 10μM | 114 | | | |
| 3/ 10μM | 111 | | | |
| 1/ 5μM | 163 | 160 ± 2 | 69 | 31 |
| 2/ 5μM | 158 | | | |
| 3/ 5μM | 160 | | | |
| 1/ 1μM | 218 | 219 ± 10 | 95 | 5 |
| 2/ 1μM | 231 | | | |
| 3/ 1μM | 208 | | | |
| 1/ 0,1μM | 227 | 239 ± 12 | 103 | -3 |
| 2/ 0,1μM | 234 | | | |
| 3/ 0,1μM | 255 | | | |
| 1/ DMSO | 252 | 231 ± 22 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 201 | | | |
| 3/ DMSO | 241 | | | |

Tab. 28. Výsledky měření pro IC₅₀ s dinacilibem

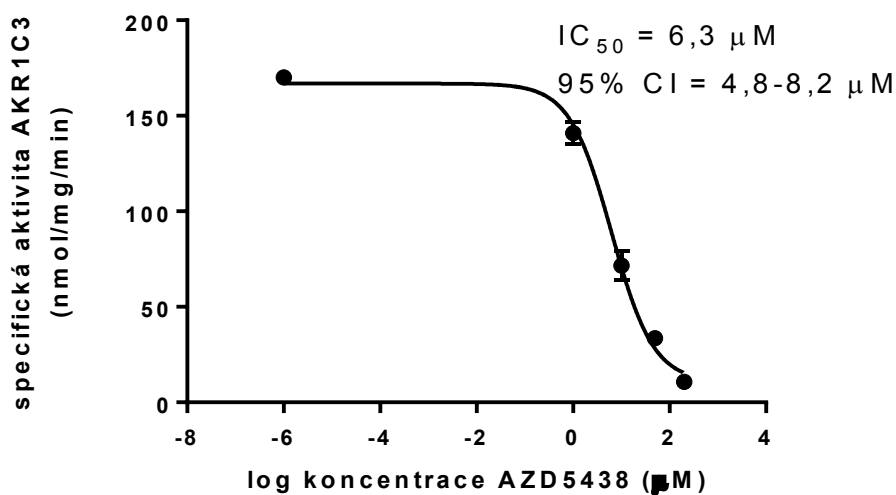
| VZOREK | Specifická aktivita | Průměr specifické aktivity | Aktivita | Inhibice |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Dinacilib | nmol/mg/min | nmol/mg/min | % | % |
| 1/ 200 μM | 3 | 3 ± 0 | 2 | 98 |
| 2/ 200 μM | 3 | | | |
| 3/ 200 μM | 3 | | | |
| 1/ 50 μM | 5 | 5 ± 0 | 3 | 97 |
| 2/ 50 μM | 6 | | | |
| 3/ 50 μM | 5 | | | |
| 1/ 1 μM | 30 | 31 ± 1 | 18 | 82 |
| 2/ 1 μM | 31 | | | |
| 3/ 1 μM | 32 | | | |
| 1/ 0,1 μM | 119 | 120 ± 1 | 70 | 30 |
| 2/ 0,1 μM | 121 | | | |
| 3/ 0,1 μM | 119 | | | |
| 1/ 0,01 μM | 140 | 1480 ± 11 | 86 | 14 |
| 2/ 0,01 μM | 164 | | | |
| 3/ 0,01 μM | 139 | | | |
| 1/ DMSO | 174 | 171 ± 24 | 100 | 0 |
| 2/ DMSO | 199 | | | |
| 3/ DMSO | 140 | | | |



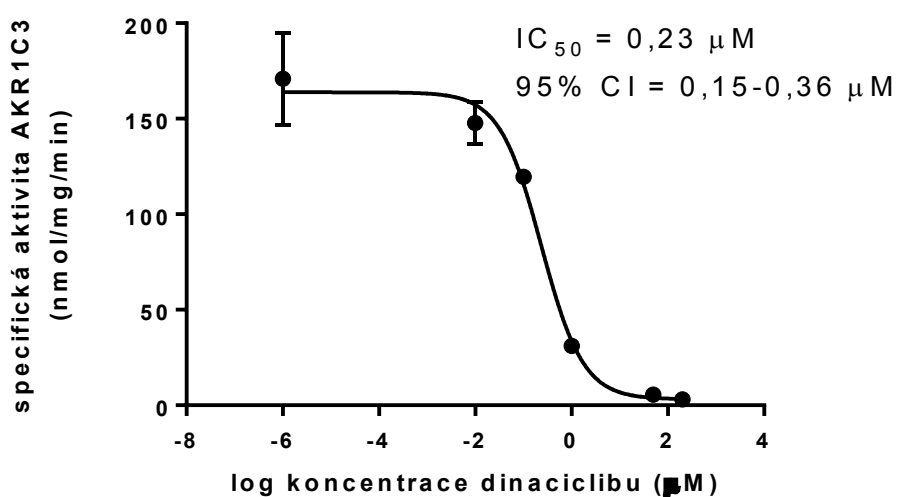
Obr. 42. Aktivita enzemu AKR1C3 s AZD5438 ve vybraných koncentraciách.



Obr. 43. Aktivita enzemu AKR1C3 s dinaciclibem ve vybraných koncentraciách.



Obr. 44. Závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace inhibitoru, ze kterého je určena IC_{50} . (CI = konfidenční interval)

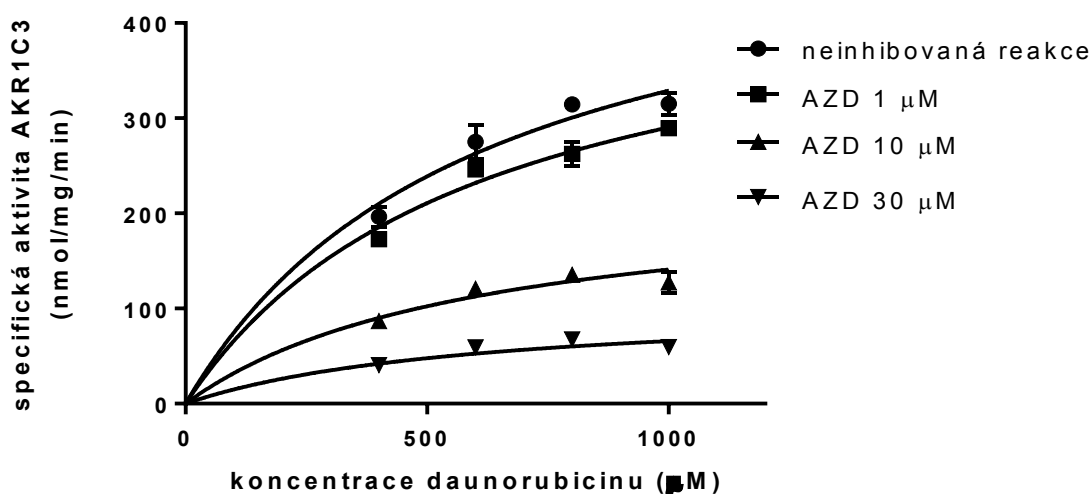


Obr. 45. Závislost specifické aktivity AKR1C3 na log koncentrace inhibitoru, ze kterého je určena IC_{50} . (CI = konfidenční interval)

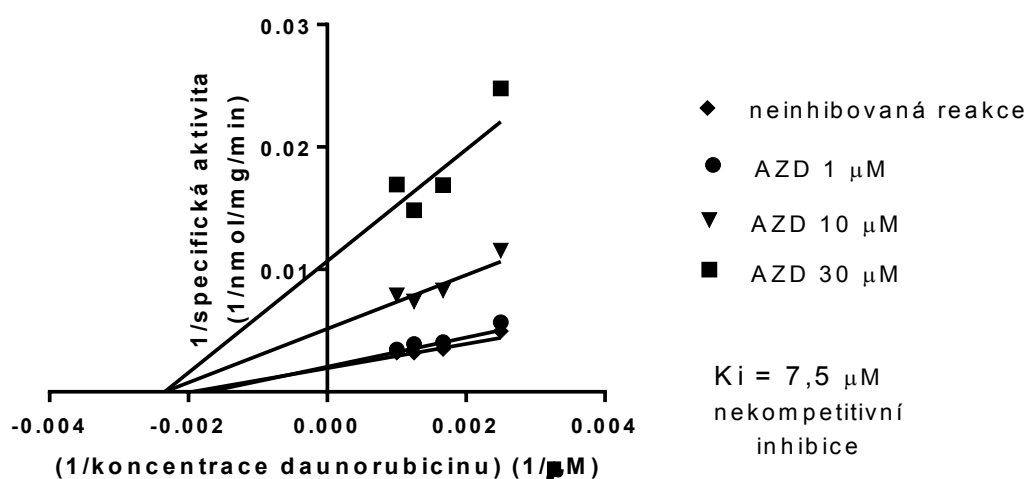
Pro podrobnější a charakterističtější popis inhibice pomocí AZD5438 a dinaciclibu s enzymem AKR1C3 byla stanovena poloviční inhibiční koncentrace (IC₅₀). Z obou grafů vytvořených pro IC₅₀ (Obr. 42, 43) je zřetelně vidět sestupnost specifické aktivity vždy při vyšší koncentraci inhibitoru. Na Obr. 43 (u dinaciclibu) si můžeme všimnout velkého skoku mezi koncentracemi 0,1 μM a 1 μM a mezi 50 μM a 200 μM je už jen minimální rozdíl. Je tedy patrné, že vysoké inhibice dosáhneme i s nízkou koncentrací tohoto inhibitoru. Koncentrace 1 μM inhibuje enzym již z 80 % (Tab. 28). V porovnání s AZD5438 je na inhibici z 80 % potřeba koncentrace okolo 75 μM (Tab. 27). Hodnota IC₅₀ pro AZD5438 byla 6,3 μM a pro dinaciclíb se IC₅₀ = 0,235 μM. Z těchto výsledků je patrné, že dinaciclíb je silnějším inhibitorem než AZD5438, u kterého byla hodnota značně IC₅₀ vyšší oproti DC. Dinaciclíb se se svou nízkou hodnotu IC₅₀ zdá být potenciálním kandidátem pro klinickou praxi. Je nutno zde připomenout, že je nejlepším inhibitorem enzymu AKR1C3 ze všech 9 inhibitorů CDK sledovaných v této práci.

5.5. Stanovení inhibiční konstanty (K_i)

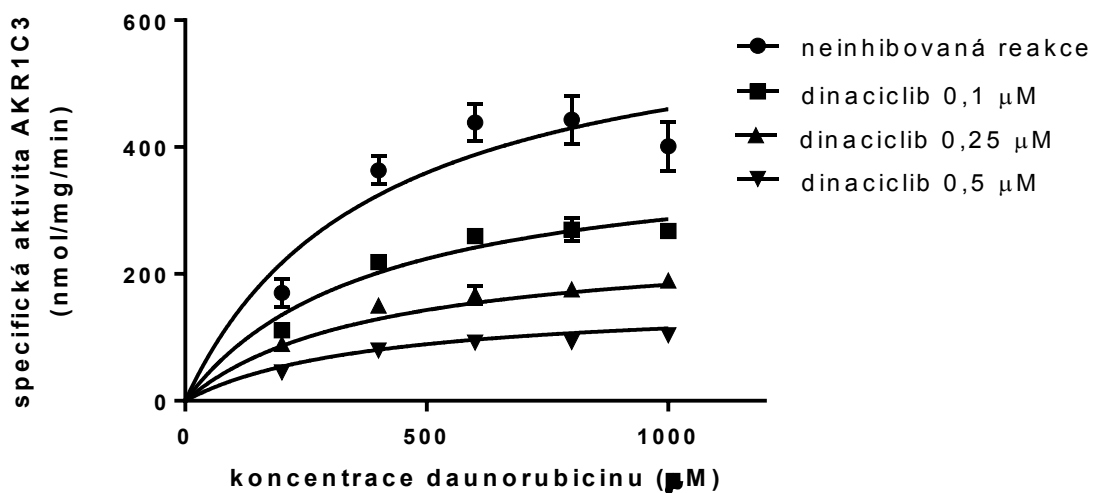
K přesnému stanovení inhibiční konstanty byla použita Lineweaver-Burkova závislost (Obr. 47, 49). Ze závislosti dle Lineweavera a Burka vyplývá, že se jedná o nekompetitivní inhibici.



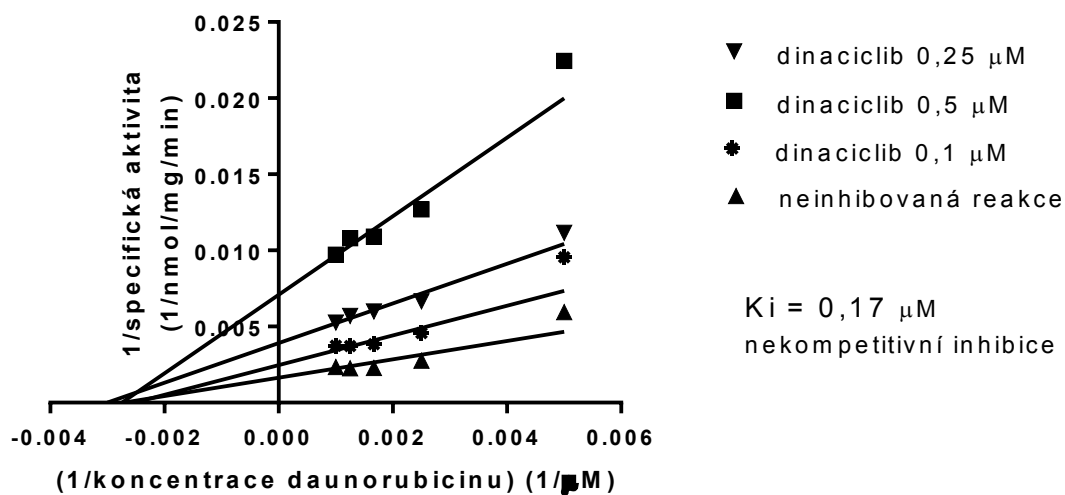
Obr. 46. Závislost jednotlivých koncentrací AZD na koncentraci daunorubicinu.



Obr. 47. Vliv inhibitoru AZD5438 na rychlost redukce daunorubicinu enzymem AKR1C3.



Obr. 48. Závislost jednotlivých koncentrací dinacilibu na koncentraci daunorubicinu.



Obr. 49. Vliv inhibitoru dinacilibu na rychlost redukce daunorubicinu enzymem AKR1C3.

V poslední části práce byla stanovena inhibiční konstanta u enzymu AKR1C3 s inhibitory AZD5438 a dinacilibem dle Michaelise a Mentenové. K přesnému stanovení pak byla použita závislost dle Lineweavera a Burka. U inhibitoru AZD5438 bylo stanoveno $K_i = 7,5 \mu\text{M}$, u dinacilibu bylo stanoveno $K_i = 0,165 \mu\text{M}$. Inhibiční efektivita AZD5438 a DC byla stanovena dvěma různými způsoby. Při porovnání výsledných hodnot K_i a IC_{50} můžeme říci, že výsledky se v podstatě shodují.

Stanovením kinetických parametrů byla zjištěna nekompetitivní inhibice u obou inhibitorů. Při této inhibici se inhibitor váže na jiné místo než na to, které je určeno pro substrát a znesnadňuje tak katalytickou reakci. Inhibitor svým navázáním mírně pozmění aktivní místo enzymu a tím zpomalí tvorbu produktu. Jelikož se jedná o nekompetitivní inhibici, v případě nutnosti zvýšení dávky DAU nebude potřeba zvýšit ani dávka inhibitoru, protože zvýšením koncentrace substrátu nelze zvrátit inhibici, což je terapeuticky výhodné.

6. Závěr

Jelikož enzymy ze skupiny reduktas hrají důležitou roli v metabolismu xenobiotik a i v patogenezi různých onemocnění, je potřeba stále studovat jejich možnost ovlivnění a zabránění jejich negativním vlivům.

V této práci se jako první stanovila aktivita vybraných enzymů z nadrodiny aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem k daunorubicinu. Největší aktivitu prokázal enzym CBR1, dále pak enzymy v pořadí AKR1A1, AKR1C3, AKR1B10, AKR1B1. Pro další detailnější testování byly vybrány enzymy CBR1 a AKR1C3.

Bylo zjištěno, že některé inhibitory CDK mohou mít inhibiční vliv na enzymy z nadrodiny aldo-ketoreduktas a z nadrodiny SDR. Nejsilnější inhibiční aktivita se projevila na enzymu AKR1C3 a to hlavně s inhibitorem AZD5438 a dinacliclibem *in vitro*, zatímco enzym CBR1 byl inhibován jen slabě nebo vůbec.

Následné měření pro IC_{50} probíhalo s inhibitory AZD5438 a DC. Oba inhibitory se při inhibici enzymu AKR1C3 prokázaly velmi pozitivně. Avšak DC ukázal velký inhibiční potenciál už při jeho nižších koncentracích.

Na základě stanovení inhibiční konstanty byla u obou inhibitorů stanovena nekompetitivní inhice. Hodnoty inhibiční konstanty jsou 7,5 μM pro AZD a 0,17 μM pro DC.

Pro dosažení optimální terapie nádorů by bylo vhodné kombinovat cytostatika s inhibitorem aldo-ketoreduktas AKR1C3 nebo inhibitorem karbonylreduktas CBR1. Tím by se snížila biotransformace a nežádoucí účinky chemoterapeutik. Další pozitivní vliv nalezneme ve snížení rezistence buněk k cytostatickým léčivům. Odolnost vůči těmto látkám je jednou z hlavních překážek úspěšné chemoterapie. I pokud současné studium metabolizace antracyklinů a inhibice těchto enzymů nepřinese hned nová léčiva, pomůže tak objasnit složitou patofyziologii rezistence na cytostatika a kardiotoxicity. Tato práce nepřinesla jen základní výzkum ohledně DAU, pomohla také najít účinné nástroje k ovlivnění jeho osudu v těle a umožní tak další navazující výzkum.

7. Seznam zkratek

| | |
|--------------|---|
| <i>AKR</i> | <i>Aldo-ketoreduktasy</i> |
| <i>ANT</i> | <i>Antracykliny</i> |
| <i>AT</i> | <i>AT7519</i> |
| <i>AZD</i> | <i>AZD5438</i> |
| <i>CBR</i> | <i>Karbonylreduktasy</i> |
| <i>CDK</i> | <i>Cyklin-dependentní kinasy</i> |
| <i>CDKi</i> | <i>Inhibitor cyklin-dependentní kinasy</i> |
| <i>CYP</i> | <i>Cytochrom P450</i> |
| <i>DAU</i> | <i>Daunorubicin</i> |
| <i>DC</i> | <i>Dinaciclib</i> |
| <i>DOX</i> | <i>Doxorubicin</i> |
| <i>DMSO</i> | <i>Dimethylsulfoxid</i> |
| <i>FLA</i> | <i>Flavopyridol</i> |
| <i>GSH</i> | <i>Glutathion</i> |
| <i>GST</i> | <i>Glutathion S-transferasa</i> |
| <i>LEE</i> | <i>LEE011</i> |
| K_i | <i>Inhibiční konstanta</i> |
| <i>NQO</i> | <i>NAD(P)H chinonoxidoreduktasa</i> |
| <i>PC</i> | <i>Palbociclib</i> |
| <i>PTX</i> | <i>Paclitaxel</i> |
| <i>PURVA</i> | <i>Purvanol</i> |
| <i>R</i> | <i>R547</i> |
| <i>SDR</i> | <i>Dehydrogenasy/Reduktasy s krátkým řetězcem</i> |
| <i>SNS</i> | <i>SNS032</i> |

8. Literatura

Ali M. A., Choy H., Habib A. A., Saha D. (2007): SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor. *Neoplasia*. 9, 370–381.

Arguello F., Alexander M., Sterry J. A., Tudor G., Smith E. M., Kalavar N. T., Greene J. F. Jr., Koss W., Morgan C. D., Stinson S. F., Siford T. J., Alvord W. G., Klabansky R. L., Sausville E. A. (1998): Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity *In vivo* against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood*. 91, 2482–90.

Ax W., Soldan M., Koch L., Maser E. (2000): Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction, *Biochem Pharmacol*. 59, 293–300.

Bains O. S., Grigliatti A. T., Reid R. E., Riggs K. W. (2010): Naturally Occurring Variants of Human Aldo-Keto Reductases with Reduced *In Vitro* Metabolism of Daunorubicin and Doxorubicin. *JPET*. 335, 533–545.

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, 904–10.

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, 553–624.

Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C.A., Capranico G., Animati F. (2001): Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 1, 113–130.

Boss D. S., Schwartz G. K., Middleton M. R., Amakye D. D., Swaisland H., Midgley R. S., Ranson M., Danson S., Calvert H., Plummer R., Morris C., Carvajal R. D., Chirieac L. R., Schellens J. H., Shapiro G. I. (2010): Safety, tolerability, pharmacokinetics

and pharmacodynamics of the oral cyclin-dependent kinase inhibitor AZD5438 when administered at intermittent and continuous dosing schedules in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol.* 21, 884–94.

Boucek R. J. Jr., Miracle A., Anderson M., Engelman R., Atkinson J., Dodd D. A. (1999): Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 31, 1435–46.

Boušová I., Skálová L., Souček P., Matoušková P. (2015): The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols. *Drug Metab Rev.* 47, 520–33.

Bray J., Marsden B. D., Oppermann U. (2009): The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: a bioinformatics summary. *Chem Bio Interact.* 178, 99–109.

Cadoo K. A., Gucalp A., Traina T. A. (2014): Palbociclib: an evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 4, 123–33.

Cicenas J., Kalyan K., Sorokinas A., Jatulyte A., Valiunas D., Kaupinis A., Valius M. (2014): Highlights of the Latest Advances in Research on CDK Inhibitors. *J Cancer.* 6, 2224–2242.

Cicenas J. and Valius M. (2011): The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 137, 1409–1418.

Číhalová D., Čečková M., Kučera R., Klimeš J., Štaud 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, 465–482.

Den Boer M. L., Pieters R., Veerman A. J. (1998): Mechanisms of cellular anthracycline resistance in childhood acute leukemia. *Leukemia.* 12, 1657–1670.

Deng S., Wojnowski L. (2007): Genotyping the risk of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 7, 129–134.

Dhillon S. (2015): Palbociclib: first global approval. *Drugs*. 75, 543–51.

Dispenzieri A., Gertz M. A., Lacy M. Q., Geyer S. M., Fitch T. R., Fenton R. G., Fonseca R., Isham C. R., Ziesmer S. C., Erlichman C., Bible K. C. (2006): Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points. *Haematologica*. 91, 390–3.

DePinto W., Chu X., Yin X., Smith M., Packman K., Goelzer P., Lovey A., Chen Y., Qian H., Hamid R., Xiang Q., Tovar Ch., Blain R., Nevins T., Higgins B., Luistro L., Kolinsky K., Felix B., Hussain S., Heimbrook D. (2006): In vitro and in vivo activity of R547: a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. *Mol Cancer Ther*. 5, 2644-58.

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 M. Ch. (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, 505–512.

Ellenberger S., Schuster S., Wöstemeyer J. (2013): Correlation between sequence, structure and function for trisporoid processing proteins in the model zygomycete *Mucor mucedo*. *J. Theor. Biol*. 320, 66–75.

Ferrans V. J., Clark J. R., Zhang J., Yu Z. X., Herman E. H. (1997): Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. *Tsitologiya*. 39, 928–937.

Flynn J., Jones J., Johnson A. J., Andritsos L., Maddocks K., Jaglowski S., Hessler J., Grever M. R., Im E., Zhou H., Zhu Y., Zhang D., Small K., Bannerji R., Byrd J. C. (2015): Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 29, 1524–9.

Forrest R. L., Gonzales N. R. (2000): Carbonyl reductase. *Chem Bio Interact*. 129, 21–40.

Geleta B., Makonnen E., Abay S. M. (2016): Cyclic Dependent Kinase (CDK): Role in Cancer Pathogenesis and as Drug Target in Cancer Therapeutics. *J Cancer Sci Ther.* 8, 160–167.

Goodman J., Hochstein P. (1977): Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun.* 77, 797–803.

Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2, 48–58.

Heath E. I., Bible K., Martell R. E., Edelman D. C., Lorusso P. M. (2008): A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors. *Invest New Drugs.* 26, 59–65.

Hale J. P., Lewis I. J. (1994): Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. *Arch Dis Child.* 71, 457–462.

Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P. (2006): *Farmaceutická chemie IV.* Karolinum. Praha. 166 stran.

Hofman J., Skarka A., Havrankova J., Wsol V. (2015): Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochem Pharmacol.* 96, 168–178.

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, 238–248.

Internet 1: Dostupné z: <<http://www.onconet.cz/index.php?pg=aktuality&aid=981>>, <<http://www.svod.cz/publikace/60.pdf>>, [cit. 2017-06-17].

Internet 2: Dostupné z <<http://www.onconet.cz/index.php?pg=aktuality&aid=981>> [26.6.2017].

Jez J. M., Penning T. M. (2001): The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact.* 130–132, 499–525.

Jin Y., Penning T. M. (2007): Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47, 263–92.

Jörnvall H., Landreh M., Östberg L. J. (2015): Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem Biol Interact.* 234, 75–9.

Klener P. (2002): *Klinická onkologie. První vydání.* Galén, Karolinum. Praha. 686 stran.

Komoto J., Yamada T., Watanabe K., Takusagawa F. (2004): Crystal structure of human prostoglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry.* 43, 2188–2198.

Li J., Guo Y., Duan L., Hu X., Zhang X., Hu J., Huang L., He R., Hu Z., Luo W., Tan T., Huang R., Liao D., Zhu Y., Di-Xian L. (2017): AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. *Oncotarget.* 8, 33694–33703.

Liang Q., Liu R., Du S., Ding Y. (2015): Structural insights on the catalytic site protection of human carbonylreductase 1 by glutathione. *J Struct Biol.* 192, 138–44.

Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2006): *Biochemie pro studující medicíny I.díl.* Karolinum. Praha. 274 stran.

Leonard R. C., Williams S., Tulpule A., Levine A. M., Oliveros S. (2009): Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy : focus on liposomal doxorubicin (Myocet). *Breast.* 18, 218–224.

Lincová D., Farghali H. (2007): *Základní a aplikovaná farmakologie. Druhé, doplněné a přepracované vydání.* Galén. Praha. 672 stran.

Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. (2004): *Farmakologie a toxikologie.* 15. přepracované vydání. Grada. Praha. 728 stran.

Malumbres M., Barbacid M. (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends*

Biochem Sci. 30, 630–41.

Martínková J., Chládek J., Mičuda S., Chládková J. (2007): Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada. Praha. 380 stran.

Matsunaga T., Shintani S., Hara A. (2006): Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21, 1–18.

Menna P., Recalcati S., Cairo G., Minotti G. (2007): An introduction to the metabolic determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 7, 80–85.

Mindnich R., Penning T. M. (2009): Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum Genomics.* 3, 362–70.

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, 185–229.

Minotti G., Parlani M., Salvatorelli E., Menna P., Cipollone A., Animati F., Maggi C. A., Manzini S. (2001): Impairment of myocardial contractility by anticancer anthracyclines: role of secondary alcohol metabolites and evidence of reduced toxicity by a novel disaccharide analogue. *Br J Pharmacol.* 134, 1271–1280.

Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennely P. J., Rodwell V. W., Weil P. A. (2012): Harperova ilustrovaná biochemie. Galén. Praha. 730 stran.

Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klin Onkol.* 13, 4–9.

Oeffinger K. C., Mertens A. C., Sklar C. A., Kawashima T., Hudson M. M., Meadows A. T., Friedman D. L., Marina N., Hobbie W., Kadan-Lottick N. S., Schwartz C. L., Leisenring W., Robison L. L. (2006): Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 355, 1572–1582.

Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N., Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R., Nomeir A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft

M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E. M. (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 9, 2344–53.

Phelps M. A., Lin T. S., Johnson A. J., Hurh E., Rozewski D. M., Farley K. L., Wu D., Blum K. A., Fischer B., Mitchell S. M., Moran M. E., Brooker-McEldowney M., Heerema N. A., Jarjoura D., Schaaf L. J., Byrd J. C., Grever M. R., Dalton J. T. (2009): Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 113, 2637–2645.

Persson B., Kallberg Y. (2013): Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Bio Interact.* 202, 111–5.

Reddy M., Arbitrario J. P., Jones J., Taverna P. (2007): SNS- 032 has potent antitumor activity in vivo against human leukemia and multiple myeloma xenografts. *Mol Cancer Ther.* 6, 3419S–3420S.

Rivera E. (2010): Implications of anthracycline-resistant and taxane-resistant metastatic breast cancer and new therapeutic options. *Breast J.* 16, 252–63.

Rodrigues A. D. (2002): Drug-Drug interactions. New York. Marcel Dekker. 650 stran.

Rouchal M. (2011): Cílená modifikace biologicky aktivních látek. Disertační práce. Ústav chemie Technologická fakulta Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 171 stran.

Santo L., Vallet S., Hideshima T., Cirstea D., Ikeda H., Pozzi S., Patel K., Okawa Y., Gorgun G., Perrone G., Calabrese E., Yule M., Squires M., Ladetto M., Boccadoro M., Richardson P. G., Munshi N. C., Anderson K. C., Raje N. (2010): AT7519, A novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma via GSK-3beta activation and RNA polymerase II inhibition. *Oncogene.* 29, 2325–2336.

Scully R. E., Lipshultz S. E. (2007): Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc Toxicol.* 7, 122–128.

Skálová L., Boušová E., Machala M., Pávek P., Szotáková B., Wsól V. (2013): Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Karolinum. Praha. 171 stran.

Skríbek H., Otvos R., Flaberg E., Nagy N., Markasz L., Eksborg S., Masszi T., Kozma A., Adam E., Miseta A., Klein E., Szekely L. (2010): Chronic lymphoid leukemia cells are highly sensitive to the combination of prednisolone and daunorubicin, but much less to doxorubicin or epirubicin. *Exp Hematol.* 38, 1219–30.

Solem L. E., Henry T. R., Wallace K. B. (1994): Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 129, 214–222.

Swain S. M., Whaley F. S., Gerber M. C., Ewer M. S., Bianchine J. R., Gams R. A. (1997): Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J Clin Oncol.* 15, 1333–1340.

Šimůnek T., Štěřba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. (2009): Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.* 61, 154–171.

Tadesse S., Yu M., Kumarasiri M., Le B. T., Wang S. (2015): Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. *Cell Cycle.* 14, 3220–3230.

Tamura K., Mukai H., Naito Y., Yonemori K., Kodaira M., Tanabe Y., Yamamoto N., Osera S., Sasaki M., Mori Y., Hashigaki S., Nagasawa T., Umeyama Y., Yoshino T. (2016): Phase I study of palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4 / 6 inhibitor, in Japanese patients. *Cancer Sci.* 107, 755–63.

Toffoli G., Simone F., Gigante M., Boiocchi M. (1994): Comparison of mechanisms responsible for resistance to idarubicin and daunorubicin in multidrug resistant LoVo cell lines. *Biochem Pharmacol.* 48, 1871–1881.

Tong W. G., Chen R., Plunkett W., Siegel D., Sinha R., Harvey R. D., Badros A. Z., Popplewell L., Coutre S., Fox J. A., Mahadocon K., Chen T., Kegley P., Hoch U., Wierda W. G. (2010): Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 28, 3015–3022.

Villerbu N., Gaben A. M., Redeuilh G., Mester J. (2002): Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *Int J Cancer*. 97, 761–9.

Wittmann S., Bali P., Donapaty S., Nimmanapalli R., Guo F., Yamaguchi H., Huang M., Jove R., Wang H. G., Bhalla K. (2003): Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. *Cancer Res*. 63, 93–9.

Wyatt P. G., Woodhead A. J., Berdini V., Boulstridge J. A., Carr M. G., Cross D. M., Davis D. J., Devine L. A., Early T. R., Feltell R. E., Lewis E. J., McMenamin R. L., Navarro E. F., O'Brien M. A., O'Reilly M., Reule M., Saxty G., Seavers L. C., Smith D. M., Squires M. S., Trewartha G., Walker M. T., Woolford A. J. (2008): Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design. *J Med Chem*. 51, 4986–4999.