

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

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

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Dagmar Louvarová

„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.“

Dagmar Louvarová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D. za vedení mé práce, ochotu, vstřícnost a cenné rady, a dále pak RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za trpělivost, předání zkušeností a rad během práce v laboratoři a také za pomoc při vyhodnocování výsledků na UHPLC.

Obsah

ÚVOD	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 LÉKOVÁ REZISTENCE V NÁDOROVÉ TERAPII.....	8
1.1.1 Typy lékové rezistence.....	8
1.1.2 Mechanismy vzniku lékové rezistence.....	8
1.2 ANTRACYKLINY	10
1.2.1 Obecné vlastnosti daunorubicinu a doxorubicinu	11
1.2.2 Metabolismus antracyklinů	12
1.3 KARBONYL REDUKUJÍCÍ ENZYMY (CRE).....	13
1.3.1 Aldo-keto reductasy (AKR).....	16
1.3.1.1 AKR1A1	17
1.3.1.2 AKR1B1.....	18
1.3.1.3 AKR1B10.....	18
1.3.1.4 AKR1C1-C4.....	19
1.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)	20
1.3.2.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1).....	21
1.3.2.2 Karbonylreduktasa 3 (CBR3).....	21
1.3.2.3 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 β -HSD).....	22
1.3.3 Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)	22
1.4 INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINAS (CDKI).....	23
1.4.1 AT-7519	24
1.4.2 AZD5438	25
1.4.3 Dinaciclub	26
1.4.4 Flavopiridol.....	28
1.4.5 Ribociclub (LEE011).....	29
1.4.6 Palbociclub.....	30
1.4.7 Purvalanol A.....	31

1.4.8	R-547	32
1.4.9	SNS-032	33
2	CÍL PRÁCE.....	35
3	MATERIÁLY A METODIKA	36
3.1	MATERIÁLY	36
3.1.1	Chemikálie	36
3.1.2	Přístroje	37
3.1.3	Ostatní pomůcky	37
3.2	METODIKA.....	37
3.2.1	Stanovení enzymové aktivity vybraných CRE s daunorubicinem	37
3.2.1.1	Příprava NADPH-regeneračního systému.....	37
3.2.1.2	Příprava substrátu	38
3.2.1.3	Příprava enzymů.....	38
3.2.1.4	Příprava vzorků na inkubaci.....	39
3.2.1.5	Preinkubace a inkubace.....	39
3.2.1.6	UHPLC analýza	40
3.2.1.7	Vyhodnocení výsledků	40
3.2.2	Testování inhibičních účinků jednotlivých inhibitorů.....	41
3.2.2.1	Příprava regeneračního systému.....	41
3.2.2.2	Příprava substrátu	41
3.2.2.3	Příprava CRE	41
3.2.2.4	Příprava CDKi.....	42
3.2.2.5	Příprava vzorků na inkubaci.....	42
3.2.2.6	Preinkubace a inkubace.....	42
3.2.2.7	UHPLC analýza	42
3.2.2.8	Vyhodnocení výsledků	43
3.2.3	Stanovení inhibiční koncentrace IC ₅₀	43
3.2.3.1	Příprava vzorků	43
3.2.3.2	Výpočet inhibiční koncentrace	43
3.2.3.3	Určení typu inhibice	43

4	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1	STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY VYBRANÝCH LIDSKÝCH KARBONYL REDUKUJÍCÍCH ENZYMŮ VŮČI SUBSTRÁTU DAUNORUBICINU	44
4.2	TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ JEDNOTLIVÝCH INHIBITORŮ	48
4.2.1	Screening účinku inhibitorů na AKR1A1	49
4.2.2	Screening účinku inhibitorů na AKR1B10	55
4.3	STANOVENÍ IC ₅₀ VYBRANÝCH INHIBITORŮ NA AKR1B10	62
5	ZÁVĚR	64
6	SEZNAM ZKRATEK	65
7	LITERATURA.....	69

ÚVOD

Dle statistiky Světové zdravotnické organizace jsou nádorová onemocnění v celosvětovém měřítku druhou nejčastější příčinou úmrtí, v roce 2015 byla odpovědná za 8,8 milionu úmrtí. Očekává se, že množství nových případů se v následujících dvou desetiletích zvýší přibližně o 70 %. Zhruba třetina úmrtí způsobených rakovinou je zapříčiněna těmito pěti návyky spojenými se špatným životním stylem a stravováním: vysokým indexem tělesné hmotnosti, nízkým příjmem ovoce a zeleniny, nedostatkem fyzické aktivity, užíváním tabáku a alkoholu. Z hlediska ekonomické vyspělosti se přibližně 70 % úmrtí na rakovinu vyskytuje v zemích s nízkým a středním příjmem. (Internet 1)

Z toho důvodu je snaha o neustálé vyvíjení nových léčebných metod, které by pomohly s touto nemocí úspěšně bojovat. Řada klinických studií zjistila, že příčinou selhání léčby nemusí být nedostatečná účinnost samotného cytostatika, ale často je hlavním viníkem mnohočetná léková rezistence.

Teoretická část se věnuje právě výše zmíněné lékové rezistenci v terapii nádorů. Popsány jsou hlavní redukující enzymy mající vliv na určité typy rakoviny, jejichž nadměrná exprese nebo aktivita způsobuje selhání či nedostatečnou účinnost protinádorové terapie. Spolu s nimi je uveden i přehled inhibitorů cyklin-dependentních kinas, potenciálních nízkomolekulárních látek pro zvýšení účinnosti léčby rakoviny.

Experimentální část poté obsahuje výsledky měření aktivity vybraných redukujících enzymů vůči cytostatiku daunorubicinu a účinnost jednotlivých vybraných inhibitorů, včetně popisu metodiky práce.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Léková rezistence v nádorové terapii

Mnohočetná léková rezistence (MDR) je jedním z hlavních problémů, který limituje účinnost chemoterapeutik při léčbě nádorových onemocnění. Často bývá také příčinou jejího selhání, a to u více než 90 % pacientů trpících metastazující rakovinou. V případě objevu účinného prostředku, který by dokázal vznik MDR výrazně snížit či mu úplně zamezit, by došlo k velmi významnému zvýšení šance na přežití. (Longley and Johnston 2005)

1.1.1 Typy lékové rezistence

Lékovou rezistenci můžeme rozdělit na primární a sekundární, v závislosti na tom, kdy odolnost nádorových buněk vůči cytostatiku vzniká.

O primární (přírozenou) rezistenci se jedná v případě, že jsou nádorové buňky odolné proti cytostatikům ještě před jejich podáním.

Oproti tomu sekundární (získanou) rezistenci pozorujeme až v průběhu léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se razantně snižuje. Rovněž může dojít i k rozvoji tzv. zkřížené rezistence, kdy při vzniku odolnosti vůči určitému léčivu zároveň vzniká odolnost i k jinému, většinou strukturně podobnému cytostatiku.

O mnohočetné lékové rezistenci mluvíme v případě rozvoje takové zkřížené rezistence, která probíhá mezi cytostatiky lišícími se jednak strukturně, jednak i mechanismem účinku. Poprvé byla popsána v roce 1970 a od té doby probíhá její intenzivní výzkum a to z toho důvodu, že MDR je dnes považována za jednu z nejzávažnějších komplikací protinádorové léčby. Bylo prokázáno, že se vztahuje i na antracykliny, vinca alkaloidy a etoposid, tj. hydrofobní léčiva s mírně zásaditým charakterem. (Biedler and Riehm 1970, Noskova et al. 2000, Seeber et al. 1982)

1.1.2 Mechanismy vzniku lékové rezistence

Mechanismy vzniku rezistence nádorových buněk jsou komplexní povahy. Příčinou nejčastěji bývají:

- změny farmakokinetiky,

- změny cytokinetiky buněčné populace,
- metabolické a funkční změny buňky (snížená či zvýšená exprese/aktivita enzymů, ovlivnění transportu cytostatika buněčnou membránou, zvýšená intenzita oprav DNA).

Nejméně významné jsou změny farmakokinetiky. Příkladem může být snížení resorpce cytostatika, urychlení biotransformace nebo urychlení eliminace.

Změny cytokinetiky se začínají objevovat spolu s narůstajícími nádorovými buňkami, jelikož většina buněk přechází do stavu G_0 (klidový stav), kde je citlivost k chemoterapeutikům omezená. S nárůstem množství nádorových buněk zároveň dochází ke vzniku spontánních mutací buněk. Ty jsou nadále příčinou vzniku rezistentních buněčných klonů.

Avšak jednoznačně nejčastějším způsobem vzniku rezistence jsou strukturální či funkční změny buňky, kdy dochází ke snížení, resp. zvýšení koncentrace enzymů ovlivňujících metabolismus cytostatika.

Problém snížené koncentrace enzymů nutných pro přeměnu cytostatika na účinnou látku je popisován např. u merkaptopurinu a enzymu pyrofosfatasy. Buňky mající nízkou koncentraci tohoto enzymu jsou k působení merkaptopurinu rezistentní.

Opačný stav, tedy zvýšenou koncentraci enzymů v buňce, lze uvést na příkladu metotrexátu. V buňkách rezistentních k jeho působení byla nalezena až 20krát vyšší koncentrace dihydrofolátreduktasy. Kromě toho může být také porušena intracelulární distribuce cytostatika vazbou na lyzosomy a rovněž může dojít k omezení průniku cytostatika buněčnou membránou.

Zvláštním mechanismem je MDR, během které dochází k intenzivnímu vyplavování cytostatika z buňky ven. Příčinou toho je nahromadění fosfoglykoproteinu v buněčné membráně, nazývaného glykoprotein P (Pgp). Pgp patří do rodiny transportérových proteinů ABC (ATP-binding cassette), které jsou v těle fyziologicky přítomny a mají za úkol chránit buňky před toxiny z vnějšího prostředí. Je to produkt genu lokalizovaného na 7. chromosomu (MDR-gen). Množství MDR-genu v buňce lze zjistit pomocí metody PCR (polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce) a podle toho určit stupeň rezistence daného nádoru. U různých typů nádorů je exprese MDR-genu různá. Nejvyšší bývá u kolorektálních karcinomů a u karcinomů jater, ledvin a pankreatu.

Spolu s Pgp se do rodiny transportérových proteinů ABC řadí MRP (multidrug related protein) a TAP (transporter of antigenic peptides). MRP funguje na principu ATP-dependentní pumpy. Jeho nejvyšší koncentrace se nachází u bronchogenního karcinomu, karcinomu štítné žlázy a prsu. Zvýšená exprese TAP způsobuje rezistenci k daunorubicinu, etoposidu a vinkristinu.

Dále se na mechanismu vzniku rezistence může podílet LRP (lung resistance protein) patřící do skupiny proteinů zprostředkovávajících transport různých látek z jádra do cytoplasmy a ven z buňky. Jeho vysoká koncentrace byla zjištěna u karcinomu kolorekta, ledviny a pankreatu. (Klener 2002)

1.2 Antracykliny

Antracykliny jsou jednou z významných skupin léčiv uplatňující se při léčbě rakoviny. Řadí se mezi protinádorová antibiotika. Jako první byly objeveny daunorubicin (DAU) a doxorubicin (DOX), a to již v 60. letech 20. století, izolací z bakterie *Streptomyces peucetius*. Až do dnešní doby jsou využívány velmi často. (Arcamone et al. 1969, Tan et al. 1967) Hlavní využití DAU je při léčbě akutní lymfoblastové a myeloblastové leukémie. Oproti tomu DOX má využití značně širší, od solidních nádorů až k hematologickým malignitám. (Kufe et al. 2003) Poté došlo k hledání analogů těchto dvou látek, které by prokázaly lepší účinky. Výsledkem byl objev asi 2000 analogů, z nichž se jen velmi malé množství dostalo až do stádia klinických studií a schválení. Jedná se například o idarubicin či epirubicin. (Minotti et al. 2004)

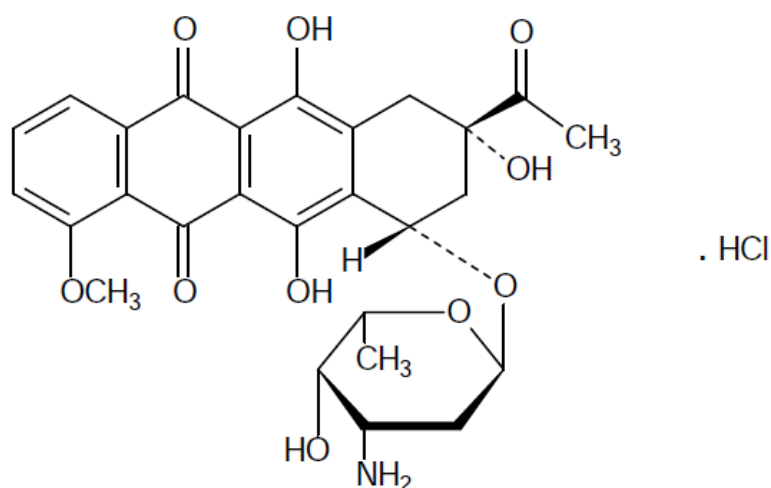
I přes to, že jsou antracykliny využívány již řadu let, zůstává jejich mechanismus působení v rakovinných buňkách stále kontroverzní záležitostí. Jedním z mechanismů je interkalace cytostatika do DNA, dále pak tvorba volných radikálů či inhibice topoisomerasy II. Všechny tyto mechanismy iniciují poškození DNA. (Minotti et al. 2004)

Hlavní nevýhodou antracyklinových cytostatik je jejich kardiotoxicita. Její přesný mechanismus stále není popsán a je předmětem mnoha dalších výzkumů. (Puma et al. 2008) Klinickým projevem kardiotoxicity může být arytmie, infarkt myokardu až chronické srdeční selhání. Objevují se převážně do jednoho týdne (akutní příznaky) či do jednoho roku (subakutní příznaky) od podání léčiva. (Puchnerova et al. 2016)

Další problematikou omezující užití antracyklinů při léčbě rakoviny je jejich rezistence, která je blíže popsána v kapitole 1.1.

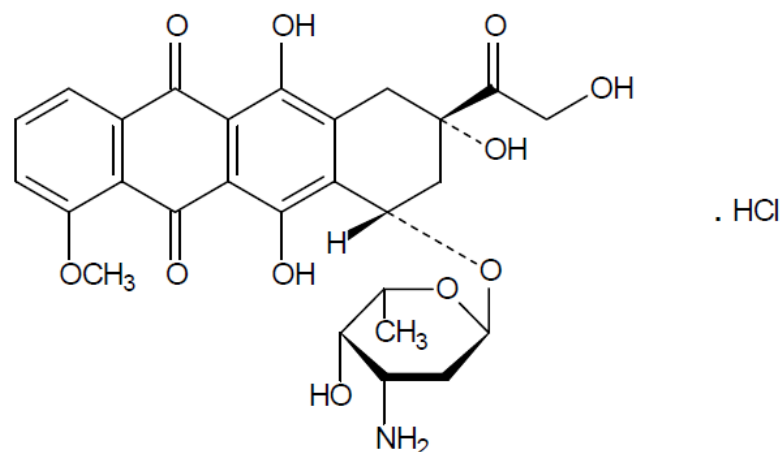
1.2.1 Obecné vlastnosti daunorubicinu a doxorubicinu

Daunorubicin-hydrochlorid (DAU) je oranžovočervený krystalický hygroskopický prášek, snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, těžce rozpustný v ethanolu 96 %. Je třeba ho skladovat ve vzduchotěsných obalech a chránit před světlem. Jeho molekula se skládá z chinonového aglykonu, odvozeného z částečně hydrogenovaného tetracenu a z bazického cukru daunosaminu, který je glykosidickou vazbou připojen v poloze 10. Chemický název je (8S,10S)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-*lyxo*-hexopyranosyl)oxy]-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion-hydrochlorid, sumárním vzorcem vyjádřen jako $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$. Relativní molekulová hmotnost je 563,99. (ČL 2009, Hartl et al. 2006)



Obr. 1 Strukturní vzorec daunorubicin-hydrochloridu

Doxorubicin-hydrochlorid (DOX) má stejný vzhled jako DAU, je dobře rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v methanolu. Chemicky je to (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-*lyxo*-hexopyranosyl)oxy]-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion-hydrochlorid, sumárním vzorcem vyjádřen jako $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$. Relativní molekulová hmotnost je 579,99. (ČL 2009)



Obr. 2 Strukturní vzorec doxorubicin-hydrochloridu

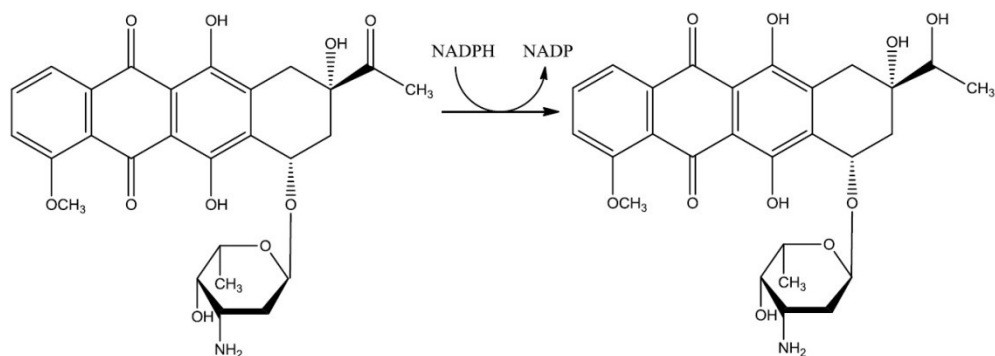
U obou látek je konjugovaný systém aglykonu chromoforem pro viditelnou oblast a díky tomu se vyznačují charakteristickým červenooranžovým zbarvením. (Hartl et al. 2006)

1.2.2 Metabolismus antracyklinů

Asi 50 % z celkového množství antracyklinů v těle je z něho vyloučeno v nezměněné podobě. Zbylé množství je v játrech metabolizováno na uhlíku C13, na kterém dochází k redukci oxo skupiny za vzniku alkoholu. Tím vznikají metabolity daunorubicinol (DAU-OL), resp. doxorubicinol (DOX-OL), které jsou jednak více kardiotoxické, jednak mají nižší antineoplastický účinek, což může vést ke vzniku rezistence rakovinných buněk k léčivu. Samozřejmě vznikají i další metabolity, převážně aglykony DAU a DAU-OL, resp. DOX a DOX-OL, které jsou oproti těm předcházejícím jen ve velmi malých koncentracích. (Bachur and Huffman 1971, Kassner et al. 2008, Skarka et al. 2011)

U DOX bylo zjištěno, že jeho nejdůležitějším metabolickým orgánem jsou játra, kde největší katalytický účinek na redukci léčiva vykazuje CBR1. Naopak jeho metabolizaci v srdci indukuje především AKR1A1. (Kassner et al. 2008)

Oproti tomu u DAU bylo prokázáno, že na jeho biotransformaci v má největší podíl AKR1B10. (Balendiran et al. 2008).



Obr. 3 Schéma redukční přeměny daunorubicinu na daunorubicinol

1.3 Karbonyl redukující enzymy (CRE)

Karbonylové sloučeniny jsou hojně rozšířeny všude kolem nás. Jsou to látky jak přírodního, tak syntetického původu. V lidském těle se vyskytují jako endogenní látky (steroidní hormony, glukokortikoidy, monosacharidy, prostaglandiny a mastné kyseliny). Také se však nachází v potravě, jsou to látky znečišťující životní prostředí, případně také léčiva, jako např. haloperidol, fenofibrát, naltrexon, warfarin, daunorubicin, doxorubicin aj. Problémem je deaktivace těchto léčiv enzymy redukujícími jejich karbonylovou skupinu, čímž dochází k výraznému snížení jejich účinku. (Rosemond and Walsh 2004, Matsunaga et al. 2006, Oppermann and Maser 2000)

Redukce karbonylové skupiny se spolu s oxidací a hydrolýzou řadí do fáze I biotransformačních reakcí a hraje velmi důležitou roli ve fyziologických procesech lidského těla. (Rosemond and Walsh 2004) Redukční reakce mohou probíhat v mnoha různých tkáních – v játrech, plicích, mozku, srdci, ledvinách, varlately či v krvi. (Felsted and Bachur 1980)

Aldehydy jsou metabolizovány jednak oxidací katalyzovanou aldehyddehydrogenasou za vzniku příslušné karboxylové kyseliny, jednak redukcí aldehydreduktasou na primární alkohol. Díky jejich vyšší schopnosti reaktivity mohou interagovat s nukleofilními centry nukleových kyselin či proteinů. (Oppermann and Maser 2000, Matsunaga et al. 2006)

Oproti tomu jsou ketony, jakožto méně reaktivní látky, přeměněny ketonreduktasami nebo alkoholdehydrogenasami pouze na příslušné sekundární alkoholy. (Oppermann and Maser 2000, Matsunaga et al. 2006)

Specifická a toxikologicky významná je metabolizace chinonů, látek rovněž patřících mezi karbonylové sloučeniny. Jednoelektronová redukce vede ke vzniku toxického semichinon radikálu, který je příčinou oxidativního stresu poškozujícího buňky. Dvouelektronovou redukcí vznikají hydrochinony, které mohou být z těla patřičně vyloučeny. (Rosemond and Walsh 2004)

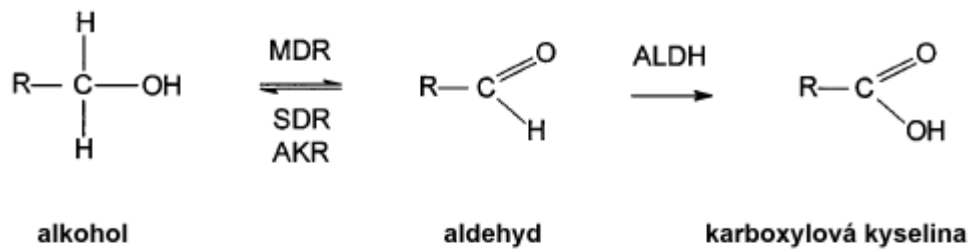
Karbonylreduktasy byly organismy vyvinuty pro detoxikaci reaktivních karbonylových sloučenin. (Matsunaga et al. 2006) Tyto enzymy katalyzují přeměnu aldehydových a ketonových skupin na příslušné alkoholy za přítomnosti kofaktorů nikotinamidadenin dinukleotidu (NADH) a nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH). Reakční mechanismus je dvouelektronový, při kterém dochází k přenosu atomu vodíku z kofaktoru na uhlík karbonylové skupiny. (Rosemond and Walsh 2004)

Karbonyl redukující enzymy se nachází ve třech hlavních nadrodinách:

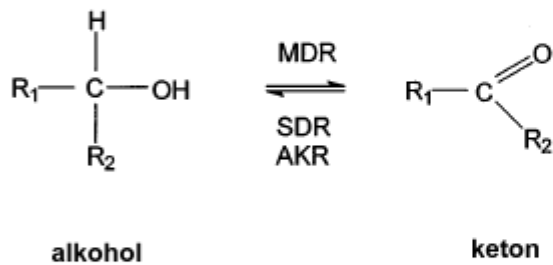
- aldo-keto reduktasy,
- dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem,
- dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem.

Nejvíce se budu věnovat popisu nadrodiny aldo-keto reduktas, jejíž enzymy byly hlavní součástí této diplomové práce. Pro úplnost však budou krátce zmíněny i ostatní dvě nadrodiny enzymů.

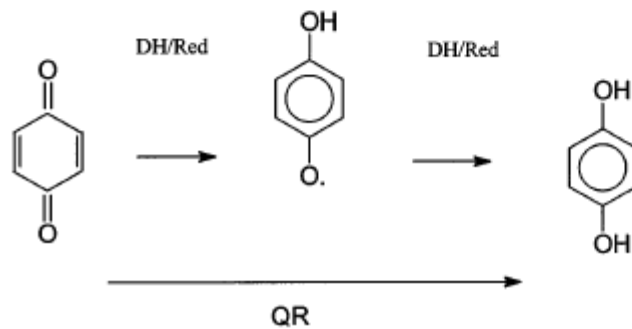
A



B



C



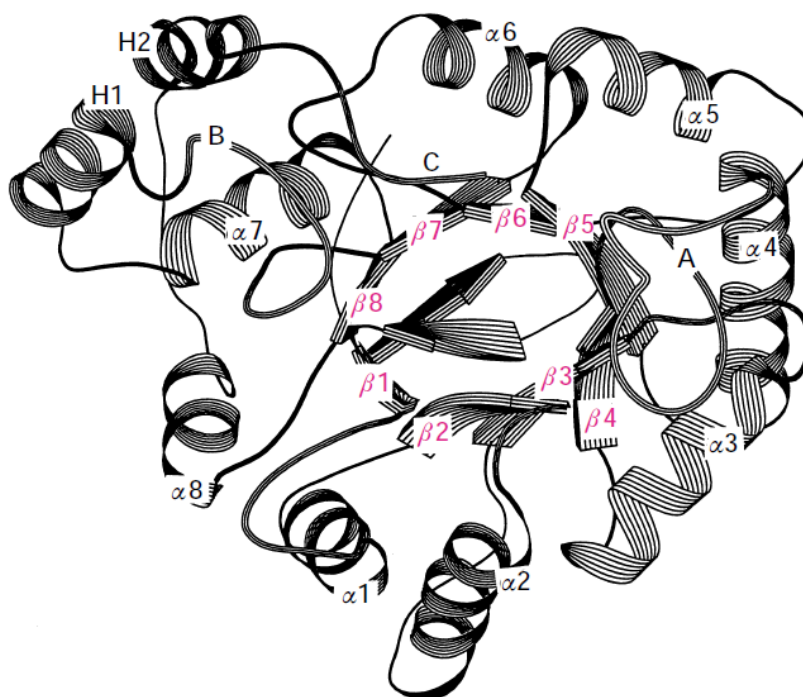
Obr. 4 (A) oxidace aldehydu na karboxylovou kyselinu, katalyzována aldehyddehydrogenasou (ALDH), resp. redukce aldehydu na primární alkohol za katalýzy aldehydreduktasou ze skupiny SDR nebo AKR, (B) oxidace sekundárního alkoholu na keton, katalyzována MDR, resp. redukce ketonu na sekundární alkohol za katalýzy enzymy ze skupiny SDR nebo AKR, (C) jednoelektronová redukce chinonu vedoucí ke vzniku semichinon radikálu, další redukcí vzniká hydrochinon; resp.

dvouelektronová redukce vedoucí přímo ke vzniku hydrochinonu (převzato z Oppermann and Maser 2000)

1.3.1 Aldo-keto reductasy (AKR)

Aldo-keto reductasy jsou poměrně širokou nadrodinou skýtající v dnešní době přibližně 190 členů. Jedná se o nadrodinu převážně cytosolických NAD(P)H-dependentních oxidoreduktas. Podle struktury jsou rozděleny do 16 rodin. Zástupci každé rodiny musí mít z více než 60 % identickou aminokyselinovou sekvenci. V jednotlivých podrodinách se musí sekvenčně shodovat alespoň ve 40 %.

Identifikovány byly u obratlovců, bezobratlých, rostlin, hub eubakterií a archebakterií. Typickým znakem všech zástupců je monomerní cytosolický protein skládající se z 320 aminokyselin a obsahující strukturu $(\alpha/\beta)_8$ -soudku. Mají širokou substrátovou specifitu a jejich význam je v redukci karbonylové skupiny u sloučenin jako jsou: cukry, steroidy, prostaglandiny, chinony a produkty lipidové peroxidace. Kromě endogenních sloučenin jsou schopny metabolizovat i xenobiotika. (Penning 2015, Jez and Penning 2001)



Obr. 5 Struktura soudku typická pro nadrodinu AKR. 3D zobrazení jaterní 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasy. α , β jsou jednotky vytvářející strukturu soudku.

H1, H2 jsou šroubovice nacházející se mimo soudkovitou strukturu. (převzato z Jez et al. 1997)

Původně členové této nadrodiny získávaly svůj název podle substrátové specifity, což později vedlo k nejasnostem a značné nepřehlednosti, a proto byla v roce 1997 zavedena jednotná nomenklatura nadrodiny AKR. Základem názvu bylo označení nadrodiny (AKR), následovalo číslo reprezentující rodinu, poté písmeno označující podrodinu a nakonec číslo konkrétního zástupce. (Jez and Penning 2001)

Aktuální informace o nadrodině AKR jsou dostupné na webové stránce <http://www.med.upenn.edu/akr/>.

Dodnes bylo popsáno 15 lidských AKR řadících se do rodin 1, 6 a 7. Jedná se o AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1B15, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR1D1, AKR1E2, AKR6A3, AKR6A5, AKR6A9, AKR7A2 a AKR7A3. (Internet 2)

Níže budou podrobněji popsány pouze vybrané lidské aldo-keto reduktasy, které byly předmětem zkoumání této práce.

1.3.1.1 AKR1A1

AKR1A1 (aldehydreduktasa) je jedním z prvních objevených enzymů nadrodiny AKR. Jedná se o cytosolický, NADPH-dependentní enzym, jehož mRNA je složena z 1140 nukleotidů. Má širokou substrátovou specifitu. Je schopný katalyzovat redukcí aromatických nebo steroidních aldehydů a sloučenin obsahujících karboxylovou skupinu, na druhé straně však také katalyzuje oxidaci blízkých trans-dihydrodiolů na o-chinony.

Jak bylo zjištěno již v roce 1961, hlavní význam AKR1A1 u hlodavců je v biosyntéze kyseliny askorbové. (Mano et al. 1961) Na rozdíl od hlodavců však člověk není schopen kyselinu askorbovou syntetizovat. AKR1A1 je exprimována ve většině tkání, nejvíce však v proximálních tubulech ledvin. Její role u člověka zatím není zcela zřejmá a je předmětem dalších studií. (Bohren et al. 1989, Barski et al. 2005, Reddy et al. 1981) Znamé však je, že se účastní biotransformace chemoterapeutik. (Chen and Zhang 2012)

Novější studie z r. 2012 ukazuje, že zvýšená exprese AKR1A1 pravděpodobně chrání buňky plicního epitelu před toxickými účinky polycyklických aromatických uhlovodíků, tedy látek vyskytujících se v tabákovém kouři. (Abedin et al. 2012)

1.3.1.2 AKR1B1

AKR1B1 (aldosareduktasa) je přítomna prakticky ve všech tkáních a je charakteristická svou širokou substrátovou specifiitou - katalyzuje redukci isokortikosteroidů, produktů lipidové peroxidace, jako jsou oxidované fosfolipidy, glutathionové konjugáty, látky znečišťující životní prostředí aj. (Srivastava et al. 1995, Srivastava et al. 2004, Wermuth and Monder 1983)

Vzhledem k její schopnosti metabolizovat glukosu je nejvíce studovaným enzymem nadrodiny AKR. (Dvornik et al. 1973, Gabbay et al. 1966) Enzymatická aktivita AKR1B1 je spojována s poškozením tkání vlivem hyperglykemie a je příčinou mnoha diabetických komplikací, jako jsou retinopatie, neuropatie, nefropatie nebo rozvoj kataraktu. (Dyck et al. 1988, Jaspan et al. 1983, Sima et al. 1988) Z toho důvodu jsou v klinické praxi využívány specifické inhibitory tohoto enzymu (sorbinil, tolrestat, epalrestat, ranirestat, fidarestat). Nedávná metaanalýza klinických studií naznačuje prospěšnost právě těchto inhibitorů při léčbě diabetických kardiovaskulárních neuropatií. (Penning 2015)

Bylo prokázáno, že AKR1B1 hraje významnou roli nejen v proliferaci buněk hladkého svalstva cév během aterosklerózy (Ramana et al. 2002), ale také během zánětlivých procesů. Vysoká exprimace AKR1B1 byla totiž objevena při akutní myeloidní leukémii či rakovině tlustého střeva. Toto zjištění vedlo k předpokladu, že právě díky tomu by AKR1B1 mohla být slibným cílem léčiv. (Laffin and Petrash 2012)

1.3.1.3 AKR1B10

AKR1B10 (aldosareduktasa tenkého střeva) byla poprvé popsána roku 1998. (Cao et al. 1998, Hyndman and Flynn 1998) Shoda její aminokyselinové sekvence s AKR1B1 je 71 %. Avšak oproti AKR1B1, která je exprimována ve všech tkáních, se AKR1B10 nachází především v játrech, tenkém a tlustém střevě, brzlíku a nadledvinách. (Cao et al. 1998, Hyndman and Flynn 1998, Chen and Zhang 2012) Mimo to je její přítomnost typická i při některých nádorových onemocněních. Vysoce exprimována je u kuřáků s nemalobuněčným karcinomem plic, při rakovině jater, kolorektálním karcinomu nebo

rakovině dělohy. (Cao et al. 1998, Fukumoto et al. 2005, Penning 2015, Yoshitake et al. 2007)

Oproti AKR1B1 vykazuje přibližně 100krát vyšší katalytickou účinnost vůči all-trans-retinaldehydu a některým ketonům, jako je například daunorubicin a dolasetron. Nedostatek kyseliny retinové je spojován se vznikem metaplazie dýchacích cest. Právě kvůli zvýšené expresi je AKR1B10 připisován významný podíl v patogenezi rakoviny plic. (Gallego et al. 2006, Martin et al. 2006, Penning 2015, Wang et al. 2010)

1.3.1.4 AKR1C1-C4

AKR1C1-C4 (hydroxysteroiddehydrogenasy) jsou čtyři enzymy jedné podrodiny. Shoda jejich aminokyselinové sekvence je vysoká, činí 86 %. (Jez et al. 1997) Všechny čtyři enzymy jsou exprimovány v játrech, liší se pouze svojí extrahepatální distribucí. Zatímco AKR1C4 najdeme převážně pouze v játrech, pro AKR1C1 je typickým místem jejího výskytu navíc ještě prostata a mléčná žláza. U AKR1C3 je to mozek, ledviny, placenta a varlata. (Penning et al. 2004)

Na rozdíl od podrodin AKR1A a 1B jsou tyto enzymy schopny metabolizovat jak aldehydy, tak ketony. AKR1C1 se spolu s AKR1C2 a AKR1C3 se podílí na metabolismu steroidních hormonů a prostaglandinů. Jaterní AKR1C4 je enzymem katalyzujícím biotransformaci žlučových kyselin. Kromě endogenních látek se AKR1C1-C4 významně podílejí i na detoxikaci léčiv a xenobiotik. (Barski et al. 2008, Ebert et al. 2011, Chen and Zhang 2012)

AKR1C1 je reductasa redukující ketosteroidy v poloze 20. Katalyzuje přeměnu progesteronu na jeho neaktivní metabolit 20 α -hydroxyprogesteron. Je nezbytnou součástí v prevenci předčasného porodu a v potlačení estrogeních účinků při endometrióze nebo rakovině endometria. Její zvýšená exprese byla pozorována právě při endometrióze a dále také při androgen-dependentní rakovině prostaty či rakovině plic. Často je spojována s lékovou rezistencí při léčbě různých typů rakoviny. Jeho hlavními inhibitory jsou salicyláty a jejich deriváty, např. 3-bromo-5-fenylsalicylát a 3-chloro-5-fenylsalicylát.

AKR1C2 je reductasa redukující ketosteroidy v poloze 3 podílející se na biotransformaci 5 α -dihydrotestosteronu na jeho neaktivní metabolit 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol a také na biotransformaci 5 β -dihydroprogesteronu na neuroaktivní steroid

allopregnanolon. Inhibitory AKR1C2 by tudíž byly vhodné při potížích spojených s nedostatkem androgenů v těle. Naopak aktivátory tohoto enzymu by mohly přispívat ke zvýšení hladiny allopregnanolonu, jehož nedostatek je spojován s premenstruačním syndromem.

AKR1C3 je znám také jako prostaglandin- $F_{2\alpha}$ -syntasa. Účastní se přeměny Δ^4 -androsten-3,17-dionu na testosteron, 5α -androstan-3,17-dionu na 5α -dihydrotestosteron a zároveň také estronu na 17β -estradiol. Jeho zvýšená exprese byla zjištěna při leukémii, rakovině prostaty či prsu. Inhibitory AKR1C3 by proto byly při léčbě rakoviny prostaty, případně prsu velice přínosné. Jako inhibitory AKR1C3 byly dosud popsány indometacin a 6-medroxyprogesteronacetát. Druhý zmíněný našel své využití v léčbě akutní myeloidní leukémie. V dnešní době je popsáno velké množství dalších inhibitorů tohoto enzymu. Zatím jsou však předmětem preklinických a klinických studií. (Penning 2015, Chen and Zhang 2012)

1.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) je jednou z největších proteinových skupin. Známá je již od roku 1991, kdy zahrnovala přibližně 20 struktur, v dnešní době je to již více než 650 000 členů. Sekvenční párová identita je velmi nízká, udává se mezi 20 - 30 %. SDR je tedy značně heterogenní skupina. Mnoho jejích členů je prokaryotických, ale již byly objeveny také savčí enzymy z placenty, jater a dalších tkání. (Kallberg et al. 2010, Persson et al. 1991, Persson and Kallberg 2013, Internet 3)

Trojrozměrná struktura však ukazuje charakteristický strukturní rys, který je společný mnoha členům nadrodiny SDR. Jedná se o tzv. Rossmannův záhyb, skládající se z β -listu vloženého mezi třemi α -helixy na každé straně. Jde o místo vazby kofaktorů. Aktivní místo je tvořeno typickou tetradou složenou z aminokyselinových zbytků Tyr-Lys-Ser-Asn. Vazba na substrát probíhá ve štěrbině blízko místa vazby koenzymu. Tato štěrbinina je mezi jednotlivými zástupci značně liší, čímž je vysvětleno široké substrátové spektrum této nadrodiny. (Kallberg et al. 2010, Matsunaga et al. 2006)

V lidském těle bylo popsáno 75 genů kódujících SDR. Mají významný vliv na funkci steroidních hormonů, prostaglandinů a na metabolismus retinoidů. Rovněž také hrají

zásadní roli v metabolismu xenobiotik. (Kallberg et al. 2010, Persson and Kallberg 2013, Internet 3)

Vzhledem k tomu, že se nadrodina SDR rozrůstala značně rychle, bylo třeba vytvořit jednotný systém nomenklatury pro přehledné a především jednoznačné označování jednotlivých enzymů. V roce 2009 Persson et al. ve své publikaci popsali základní pravidla při tvorbě názvosloví. Každé ze 48 rodin lidských SDR bylo přiděleno číslo. Dále bylo třeba rozlišit, zda se jedná o proteiny "klasické" (C) nebo "prodloužené" (E). Rozlišeny jsou podle velikosti podjednotky a sekvenčních vzorců v místě vazby koenzymu. Tudíž je číslo rodiny následováno písmenem označujícím, o který typ SDR se jedná. Dále už je připojeno pouze číslo určitého zástupce.

Abych to shrnula, výsledný název se tedy skládá z názvu nadrodiny (SDR), čísla rodiny (1-48), označení typu SDR (C, resp. E) a čísla daného zástupce. (Persson et al. 2009)

Kvůli značně rychlému progresu této nadrodiny, jsou aktuální informace k dispozici na internetových stránkách <http://www.sdr-enzymes.org/>.

1.3.2.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1)

Lidská CBR1, novým názvem dle zavedené nomenklatury známá jako SDR21C1, je enzym katalyzující NADPH-dependentní redukci různých karbonylových sloučenin. Z endogenních látek metabolizuje CBR1 prostaglandiny, isatin a některé z 3-ketosteroidů. Naopak mezi typická xenobiotika sloužící jako substráty pro CBR1 patří daunorubicin, doxorubicin, haloperidol, bromperidol, loxoprofen, metyrapon, NNK, chinony aj. Redukčním produktem DAU je DAU-OL, kardiotoxická látka, a proto je CBR1 považována za příčinu závažných potíží spojených s kardiotoxicitou při léčbě DAU. (Matsunaga et al. 2006)

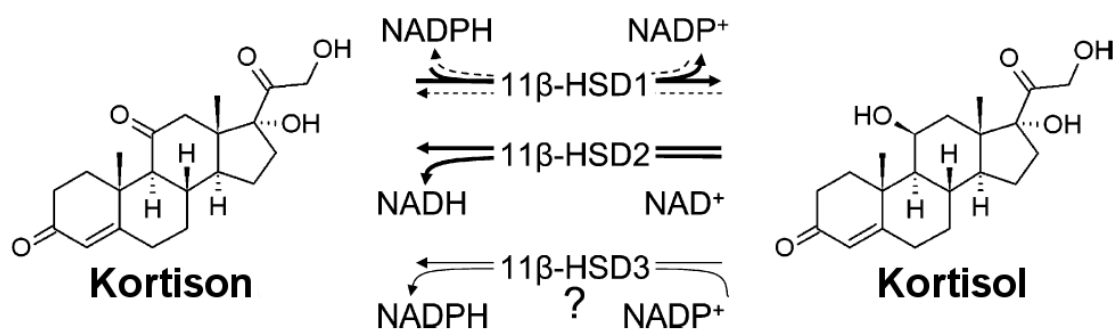
1.3.2.2 Karbonylreduktasa 3 (CBR3)

CBR3 je protein skládající se z 277 aminokyselin. Jeho sekvenční shoda s lidskou CBR1 činí 71 %, oproti tomu se zvířecí CBR2 je to pouhých 23 %. Exprimována je prakticky ve všech tkáních, nejvíce však v ledvinách, mozku a játrech.

Oproti CBR1 postrádá oxidoredukční aktivitu k prostaglandinům, na druhou stranu vykazuje mnohem vyšší aktivitu k DAU a isatinu. (Matsunaga et al. 2006, Pilka et al. 2009)

1.3.2.3 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 β -HSD)

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa je membránově vázaná mikrozomální karbonylreduktasa mající význam v metabolismu glukokortikoidů. V lidském organismu byla doposud ve dvou typech: typ I (11 β -HSD1) a typ II (11 β -HSD2). 11 β -HSD2 působí jako NAD-dependentní dehydrogenasa na kortisolu a oxiduje ho na kortison. (Rosemond and Walsh 2004) Oproti tomu schopností 11 β -HSD1 je jak redukční, tak oxidační působení na glukokortikoidy. Díky tomu se stala významným regulátorem metabolických funkcí a pomáhala organismu přizpůsobit se nejrůznějším náročným situacím. (Odermatt and Nashev 2010) Nedávné studie však ukazují, že obousměrná enzymatická reakce katalyzovaná 11 β -HSD1 probíhá pouze in vitro. In vivo se 11 β -HSD1 uplatňuje pouze ve funkci reduktasy. (Maser et al. 2002)



Obr. 6 Průběh biotransformace kortisolu a kortisonu za přítomnosti obou typů 11 β -hydroxysteroiddehydrogenas (převzato z Odermatt and Nashev 2010)

Kromě vlivu na biotransformaci glukokortikoidů bylo zjištěno, že 11 β -HSD1 má rovněž vliv na detoxikaci xenobiotik - redukuje je na alkoholy, které jsou pak snadněji konjugovány a eliminovány z organismu. Mezi významná xenobiotika podléhající redukci jejich karbonylové skupiny katalyzované 11 β -HSD1 se řadí oracin a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). (Maser et al. 2006)

1.3.3 Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Nadrodina dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem čítá v současné době více než 155 000 zástupců, z toho u člověka jich bylo identifikováno 40, kódovaných 25 geny. (Jörnvall et al. 2015) Rozděleny jsou podle sekvenčních podobností do

8 rodin. Nejpočetnější skupinou je skupina alkoholdehydrogenas (ADH) a cinnamylalkoholdehydrogenas (CAD).

Pro strukturu těchto enzymů je typická přítomnost dvou domén, kde C-terminální doména váže koenzym s Rossmannovým záhybem, zatímco N-terminální doména váže substrát s jádrem antiparalelních β -vláken a povrchově umístěným α -helixem. Domény jsou navzájem od sebe odděleny štěrbinou obsahující hlubokou kapsu, ve které je umístěn kofaktor a aktivní místo. (Persson 2008)

1.4 Inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKi)

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou proteinové kinasy zahrnuté do kritických buněčných procesů, jako je buněčný cyklus či transkripce. Aktivita těchto procesů vyžaduje spojení se specifickou podjednotkou CDK. (Malumbres et al. 2009) Z toho vyplývá, že jakékoli abnormality v jejich regulaci nebo expresi mohou vést k patogenním změnám vedoucím k různým malignitám. Na druhou stranu, potlačením jejich aktivity se nám otevírají nové možnosti v léčbě rakoviny. (Cihalova et al. 2013)

Na základě sekvenční podobnosti obsahuje lidský genom 21 genů kódujících CDK a dalších 5 genů kódujících vzdálenější skupinu proteinů, známých jako CDK-like (CDKL).

Současná nomenklatura zahrnuje 11 klasických CDK (CDK1-11), 2 nově navržené členy rodiny (CDK12-13) a další proteiny, jejichž jména jsou založena na přítomnosti prvku vázajícího cyklin nebo na základě sekvenčního vztahu s původními CDK. (Malumbres et al. 2009)

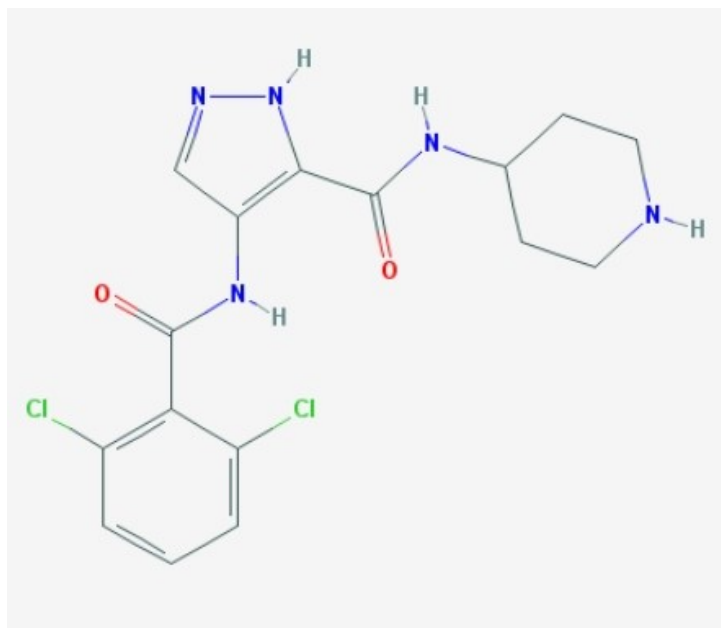
Vysoký potenciál v použitelnosti při protinádorové léčbě mají inhibitory cyklin-dependentních kinas. Lze je rozdělit na dvě generace. První, zahrnující inhibitory méně specificky působící, jako je flavopiridol či roscovitin, díky čemuž je u nich typický vyšší výskyt vážných, případně nepředvídatelných nežádoucích účinků. Druhá, jejíž inhibitory působí na vybrané CDK selektivně a zároveň velmi silně a vykazují příznivější bezpečnostní profil. Sem spadají například palbociclib, ribociclib či abemaciclib. (Finn et al. 2016)

V současné době je mnoho látek ze skupiny CDKi součástí preklinických či klinických studií. Nevýhodou jsou různé aspekty jejich farmakokinetiky, které zatím nejsou detailně známy a současně jsou předmětem dalších a dalších studií. Nejčastěji byly vyhodnocovány jejich farmakodynamické vlastnosti, novější výzkumy se však již zaměřují spíše na jejich interakce s efluxními transportéry (Cihalova et al. 2013)

1.4.1 AT-7519

AT-7519 je nízkomolekulární inhibitor mnoha CDK, silně inhibuje především CDK1, CDK2, CDK4-6 a CDK9. Byl syntetizován za použití přístupů léčebné chemie založených na fragmentu, spojených s vysoce výkonnou rentgenovou krystalografií. AT-7519 rovněž vykazuje určitou protinádorovou aktivitu proti mnoha buněčným liniím a nádorovým štěpům. (Chen et al. 2014)

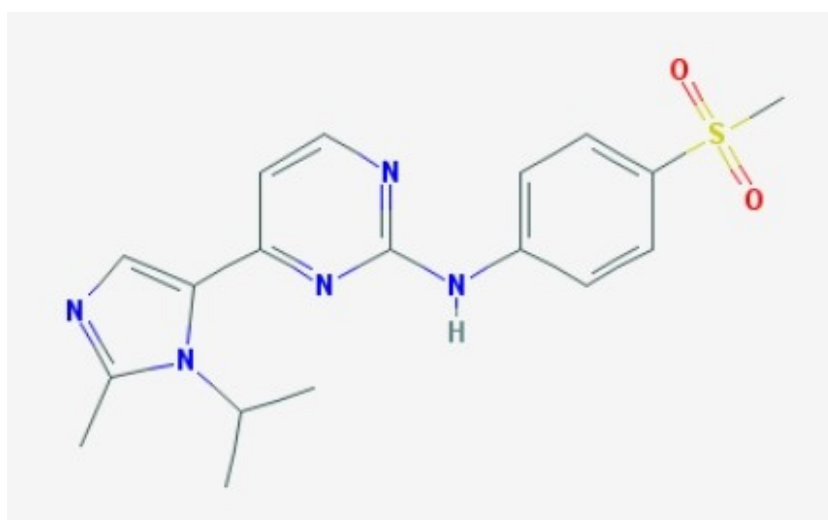
Nedávná studie z r. 2014 se zabývala otázkou bezpečnosti a tolerance tohoto inhibitoru při jeho podávání intravenózní infuzí po dobu 1 dne až 3 týdnů. Při dávce 27,0 mg/m² dosahovala hladina plazmatické koncentrace až nad koncentrace biologicky aktivní. U pacientů byla pozorována jistá protinádorová aktivita, a to jak u solidních tumorů, tak u hematologických malignit. Mechanismem účinku je indukce apoptózy v buňkách myelomů inhibicí fosforylace RNA polymerasy II. V předklinických studiích bylo zjištěno, že nejlepší účinnost a snášenlivost poskytovala intermitentní cyklická schémata. (Chen et al. 2014) V roce 2017 byly publikovány prozatím nejnovější výsledky týkající se studia fáze II v působení inhibitoru AT7519 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) či lymfomem z pláštěvých buněk (MCL). Ukázalo se, že bezpečné je podání pacientům s relapsem CLL/MCL. Objektivní míra účinku u MCL byla stanovena na 27%, u CLL byla daleko nižší, avšak i přesto k jisté redukci nádorového bujení u pacientů došlo. (Seftel et al. 2017)



Obr. 7 Strukturální vzorec AT-7519

1.4.2 AZD5438

AZD5438 je nový cyklin-dependentní kinasový inhibitor, u něhož byla v předklinických studiích zjištěna aktivita proti řadě lidských nádorových štěpů. Fáze I klinických studií ukázala poměrně krátký poločas rozpadu (1 - 3 hodiny). (Dickson and Schwartz 2009)



Obr. 8 Strukturální vzorec AZD5438

Je to inhibitor komplexů cyklin E-CDK2, cyklin A-CDK2 a cyklin B-CDK1, s biologickou dostupností i při perorálním podání. Mechanismem účinku je inhibice fosforylace CDK2 substrátů proteinu Rb a p27 a fosforylace CDK1 substrátu nucleolinu a proteinfosfatasy 1 α . V exponenciálně rostoucích nádorových buňkách vyvolá

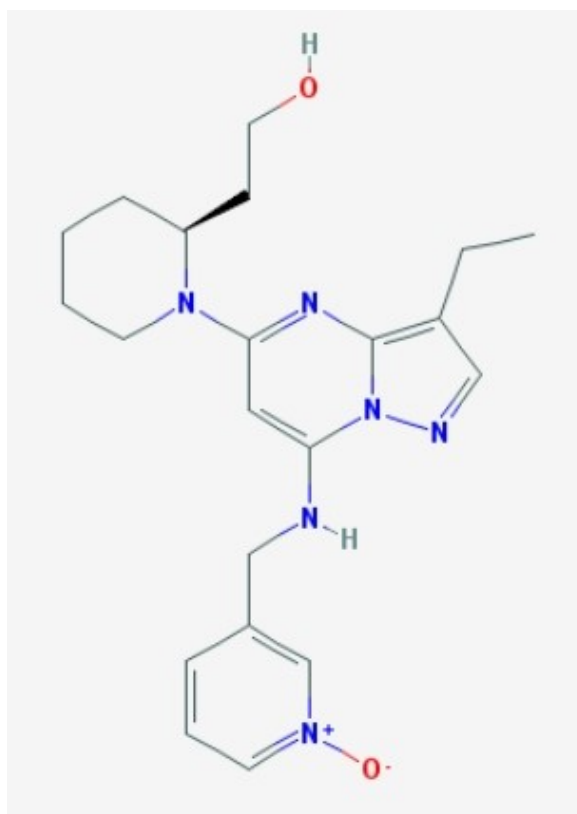
AZD5438 zástavu S a G₂ fází buněčného cyklu. Při studiu na 23 buněčných liniích (včetně nádorových buněk v plicích, kolorektu, prsu, prostatě a krvi) byla naměřena inhibiční konstanta IC₅₀ 0,17 μM (u nádorových buněk způsobujících rakovinu prsu) až po IC₅₀ 1,7 μM (u plazmatických buněk při leukémii). (Boss et al. 2010)

AZD5438 tedy prošel klinickým hodnocením podobně jako mnoho jiných inhibitorů CDK. Jeho benefitem oproti jiným CDKi je jeho biologická dostupnost při perorálním podání, což umožňuje trvalé denní dávkování, které je pravděpodobně nezbytné pro inhibici nádorového růstu v nepřítomnosti indukce apoptózy. Většina toxických účinků byla gastrointestinálního původu a jejich výskyt se zvyšoval v závislosti na velikosti dávky. Kontinuální podávání AZD5438 však vedlo k rozvoji celého komplexu symptomů spojených s tachykardií, hypotenzí, hyponatremií aj. Stupeň závažnosti nežádoucích účinků však nebyl očekáván a není srovnatelný s pozorovanými nežádoucími účinky jiných CDKi. AZD5438 tedy neprokázal přiměřený poměr rizika a přínosu, a proto byly jeho klinické studie přerušeny. Jeho užitečnost jako protinádorového činidla, případně v monoterapii nebo kombinované terapii, zůstává tedy dosud neobjasněna. (Boss et al. 2010)

V roce 2010 byly publikovány výsledky stanovení bezpečnosti, tolerance, farmakokinetiky a farmakodynamiky perorálně podávaného inhibitoru AZD5438. Absorpce po jednorázovém podání inhibitoru byla rychlá. Čas dosažení maximální plazmatické koncentrace se pohyboval mezi 0,5 a 4 hodinami napříč sledovanými dávkami. Maximální plazmatická koncentrace v plazmě se však v průběhu času rychle snížila. Při podávání inhibitoru 4krát denně po dobu jednoho týdne byla jednotlivá tolerovaná dávka 90 mg. Žádné vážné projevy toxicity nebyly pozorovány. Avšak podávání AZD5438 4krát denně v nepřetržitém režimu vedlo k podstatnému zvýšení toxických účinků. Nejčastěji se jednalo o nauzeu, zvracení, únavu a letargii. Žádné objektivní výsledky působení na nádorovou odpověď nebyly v této studii pozorovány. (Boss et al. 2010)

1.4.3 Dinaciclíb

Dinaciclíb (DC) je selektivní inhibitor CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9, jehož minimální inhibiční koncentrace (IC₅₀) je v rozmezí od 1 do 4 nM. (Parry et al. 2010)



Obr. 9 Strukturní vzorec dinaciclibu

Díky pozitivním výsledkům při in vivo screeningu byl dinaciclib vybrán pro klinické testování. Oproti flavopiridolu byl jednoznačně účinnější a lépe tolerován. DC se již in vitro vyznačuje lepšími vlastnostmi, které následně napomáhají zlepšit jeho terapeutický index in vivo. Jedná se například o silnou selektivitu k rodině CDK, jež má evidentně unikátní strukturální rysy, které se neobjevují v blízkce příbuzných serin/threonin kinasách. (Parry et al. 2010)

U myšího modelu karcinomu vaječníků vykazuje příznivý terapeutický index maximální tolerované dávky a dávky účinné. Konkrétně terapeutický index dinaciclibu byl 10, oproti tomu terapeutický index pro SNS-032 byl 2 a pro flavopiridol dokonce méně než 1. (Flynn et al. 2015)

V preklinických studiích se ukázalo, že dinaciclib má poměrně dobrou terapeutickou účinnost proti nádorovým buňkám chronické lymfocytární leukémie a zároveň nevykazuje cytotoxicitu vůči T-lymfocytům. To vedlo k řadě dalších výzkumů. Nakonec dinaciclib kompletně prošel fází I klinického hodnocení. Prokázána byla jeho významná klinická aktivita a dobrá snášenlivost. Pozorován byl vedlejší účinek

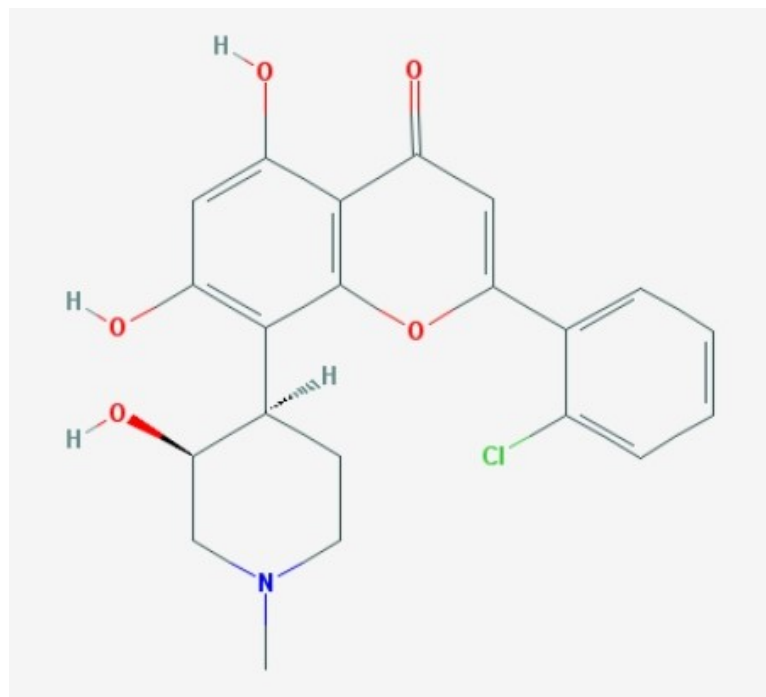
neutropenie a syndrom uvolňování cytokinů. Oproti flavopiridolu se neobjevil průjem ani únava a může být tak podáván dlouhodobě. (Flynn et al. 2015)

V letech 2009 - 2010 proběhla fáze II klinického testování dinaciclibu na pacientech trpících akutní myeloidní leukémií v pokročilém stádiu. Ze studia farmakokinetiky bylo zřejmé, že dosažení maximální koncentrace je velmi rychlé, tj. 2 hodiny. Na druhou stranu i distribuce a eliminace dinaciclibu je velmi rychlá, tudíž nemůže zajistit v organismu trvalý účinek. Ukázalo se ale, že dlouhodobou expozicí dinaciclibu lze dosáhnout mnohem lepšího vlivu na smrt nádorových buněk. (Gojo et al. 2013)

Aktuálně probíhá testování účinku DC při léčbě pacientů s hematologickými malignitami, pokročilým stádiem rakoviny prsu či s pokročilými solidními tumory. (Internet 4, 5, 6)

1.4.4 Flavopiridol

Flavopiridol (FLA) je látka inhibující CDK2, CDK4 a CDK6 v nanomolárních koncentracích. (Dickson and Schwartz 2009) Chemicky se jedná o flavon, jenž byl částečně syntetizován z přírodní sloučeniny získané ze stromu rodu *Dysoxylum*. Ostatní rostliny tohoto rodu jsou tradičně používány v ajurvédské medicíně už po staletí pro léčbu nejrůznějších autoimunitních chorob. (Blachly et al. 2016)



Obr. 10 Strukturní vzorec flavopiridolu

Mechanismem účinku in vitro je zastavení buněčného cyklu při přechodu z fáze G₁ do S, tak i při přechodu z G₂ do metafáze. (Dickson and Schwartz 2009) Byl jedním z prvních inhibitorů, který byl v klinických studiích testován pro své účinky při léčbě chronické lymfocytární leukémie. (Blachly et al. 2016)

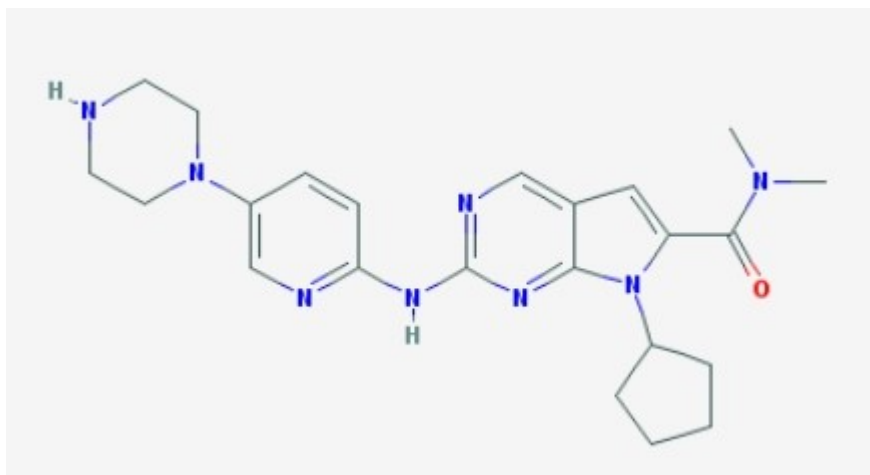
Provedeno bylo několik studií fáze I i II, které naznačují účinek FLA při léčbě různých solidních nádorů a hematologických malignit. Částečné pozitivní odpovědi ve fázi I bylo dosaženo u 40 % pacientů trpících chronickou lymfocytární leukémií. Fáze II se zabývala testováním jeho účinku při metastatickém melanomu, adenokarcinomu endometria a mnohočetném myelomu. Nebyly však pozorovány žádné objektivní důkazy protinádorové aktivity. Hlavní toxicitou byla myelosuprese a průjem.

FLA má větší potenciál při zesilování účinku cytotoxické chemoterapie. To bylo prokázáno v kombinaci s irinotekanem. Zjištěné maximální tolerované dávky byly 100 mg/m² irinotekanu při použití 60 mg/m² FLA a 125 mg/m² irinotekanu s 50 mg/m² FLA. Jiné kombinace FLA s chemoterapeutikem vykazovaly jen mírnou aktivitu.

Kromě klinické aktivity při chronické lymfocytární leukémii a akutní myeloidní leukémii byla v preklinických studiích popsána aktivita i u akutní lymfoblastické leukémie. (Dickson and Schwartz 2009).

1.4.5 Ribociclib (LEE011)

LEE011 je specifický inhibitor CDK4 a CDK6. Tyto dvě cyklin-dependentní kinasy regulují buněčnou fosforylaci proteinu retinoblastomu (Rb). Dysregulace tohoto proteinu se často objevuje právě u různých typů rakoviny a vede k progresi buněčného cyklu. Preklinické studie uvádějí antiproliferativní aktivitu v nádorech, které exprimují funkční Rb protein. (Infante et al. 2016) Studie prokázaly jeho nejlepší účinek při léčbě hormon-dependentního nádoru prsu, a to konkrétně v kombinaci s antagonisty estrogenních receptorů. Podáván je, podobně jako níže zmiňovaný palbociclib, intermitentně (3 týdny léčby, poté týdenní pauza). (Chen et al. 2016)

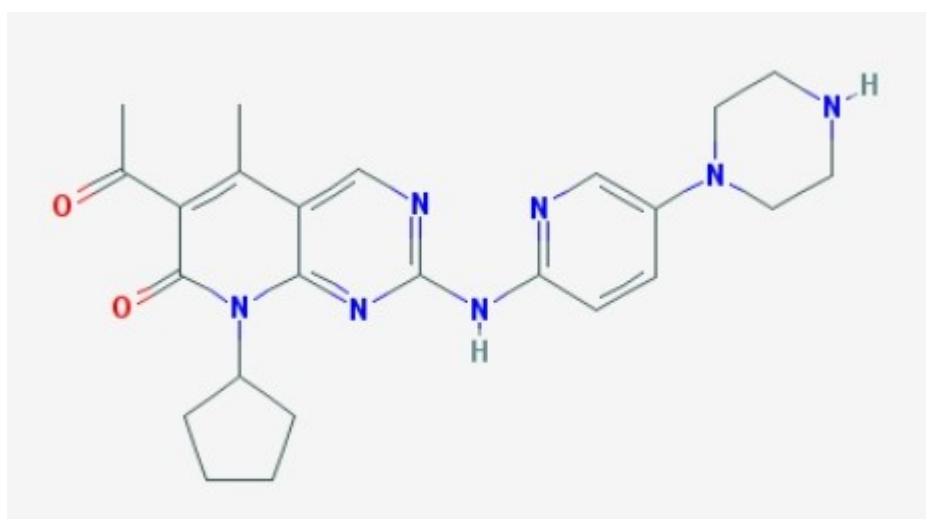


Obr. 11 Strukturální vzorec ribociclibu

V roce 2017 Evropská komise na základě studie fáze III schválila LEE011 jako první inhibitor, selektivní pro CDK4/6, který je možno používat v první linii léčby postmenopauzálních žen s pokročilým nebo metastatickým nádorem prsu v kombinaci s inhibitorem aromatasy. (Internet 7)

1.4.6 Palbociclib

Podobně jako ribociclib je i palbociclib (PD) selektivním inhibitorem CDK4 a CDK6.



Obr. 12 Strukturální vzorec palbociclibu

Fáze II klinických studií testovala působení PD spolu s antagonisty estrogenních receptorů na hormon-dependentní nádory prsu u postmenopauzálních žen. Ukázalo se, že tato kombinace vykazuje synergický efekt při blokadě proliferace nádorových buněk v prsu a díky tomu byl v roce 2015 schválen FDA pro první linii léčby pokročilého

hormon-dependentního nádoru prsu v kombinaci s letrozolem. (Criscitiello et al. 2014, Chen et al. 2016, Finn et al. 2016).

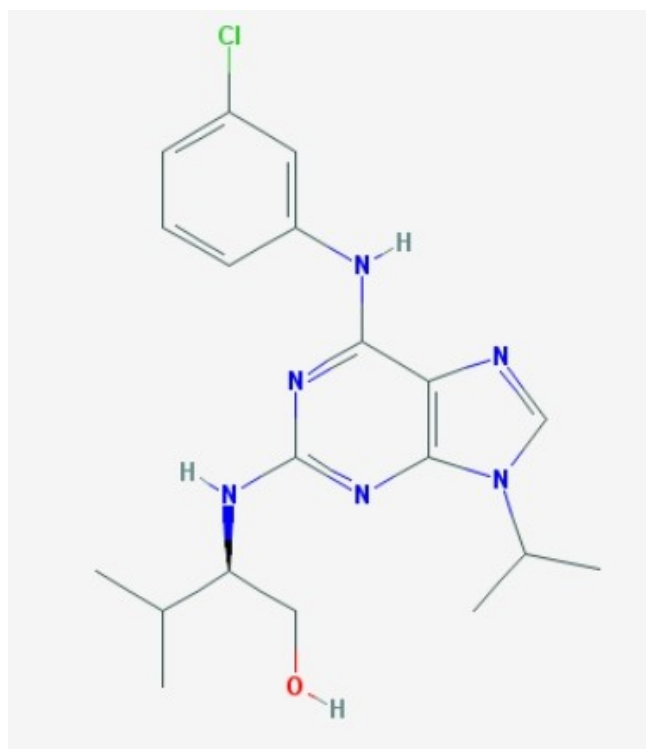
Kromě pozitivních účinků je třeba zmínit i jeho toxické působení na organismus, které se nejvíce projevuje na funkci kostní dřeně. Nejčastěji se jedná o neutropenii a leukopenii, v menší míře také o anémii. Dále jsou zmiňovány i mírné nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt (průjem, nauzea, zvracení). (Chen et al. 2016)

Jeho výhodou je však jeho biologická dostupnost i při perorálním podání. Prokázána byla vysoká účinnost na CDK4/6, kde IC_{50} byla rovna 0,01 μ M, ale současně byl také vysoce selektivní při hodnocení dalších 36 kinas, včetně CDK2, kde byla naměřena hodnota $IC_{50} > 5 \mu$ M. (Finn et al. 2016)

V dnešní době již probíhá fáze IV týkající se studia kvality života pacientů trpících hormon dependentním, metastazujícím karcinomem prsu, kteří podstupují léčbu palbociclibem v kombinaci s inhibitory aromatasy (letrozol, anastrozol) či fulvestrantem. (Internet 8)

1.4.7 Purvalanol A

Purvalanol A je vysoce specifický, ATP-kompetitivní inhibitor CDK1 a CDK2. Nejprve byl testován jeho účinek na nejrůznějších proteinkinasach (mimo CDK), na které, jak se ukázalo, nemá prakticky žádný vliv. V předběžných studiích na buněčných liniích však vykazoval, na rozdíl od olomoucínu či roscovitinu, jistou aktivitu při koncentraci 10 μ M. Mechanismem jeho účinku je reverzibilní blokáda buněčného cyklu (G1 i G2 fáze) a zároveň selektivní inhibice fosforylace některých ze substrátů CDK. Pro srovnání, roscovitin o stejné koncentraci 10 μ M a za stejných podmínek byl schopen inhibovat proliferaci buňky, nikoli však způsobovat smrt buňky. (Villerbu et al. 2002)

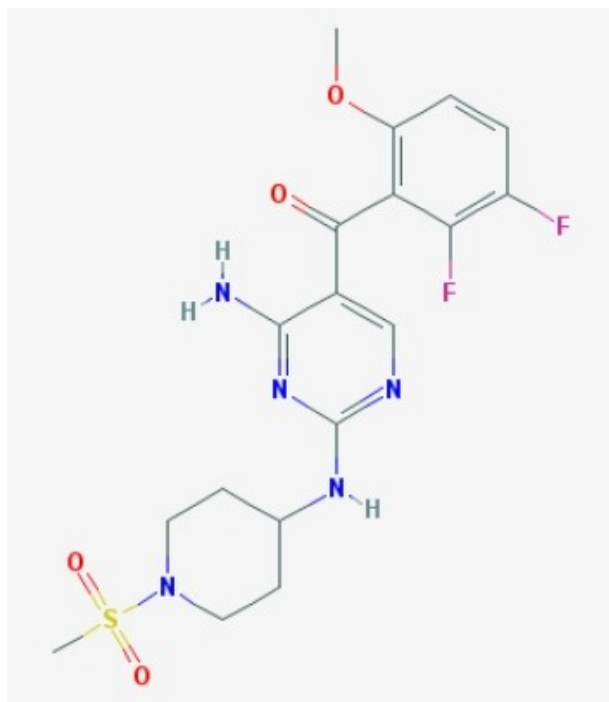


Obr. 13 Strukturální vzorec purvalanolu A

1.4.8 R-547

R-547, diaminopyrimidinová sloučenina, je silný, ATP-kompetitivní a vysoce selektivní inhibitor CDK1, CDK2 a CDK4. In vitro inhibuje proliferaci nádorových buněčných linií. Testován byl na 19 buněčných liniích a v každé z nich bez ohledu na původní tkáň, MDR nebo přítomnost proteinu p53, vykazoval silnou antiproliferační aktivitu. In vivo způsobil signifikantní inhibici nádorového bujení na všech testovaných modelech, a to jak po intravenózním, tak po perorálním podání. Na modelech nádorových štěpů inhiboval fosforylaci proteinu retinoblastomu, čímž poskytl farmakodynamický biomarker pro klinické použití. Jeho profil inhibice i preklinická protinádorová aktivita naznačují, že by mohlo jít o slibnou molekulu pro hodnocení léčby solidních nádorů.

Mechanismus působení R-547 při léčbě nádorových buněčných linií spočíval (v závislosti na dávce) v blokování buněčného cyklu v G₁ fázi a na přechodu z fáze G₂ do M a následném vyvolání apoptózy.



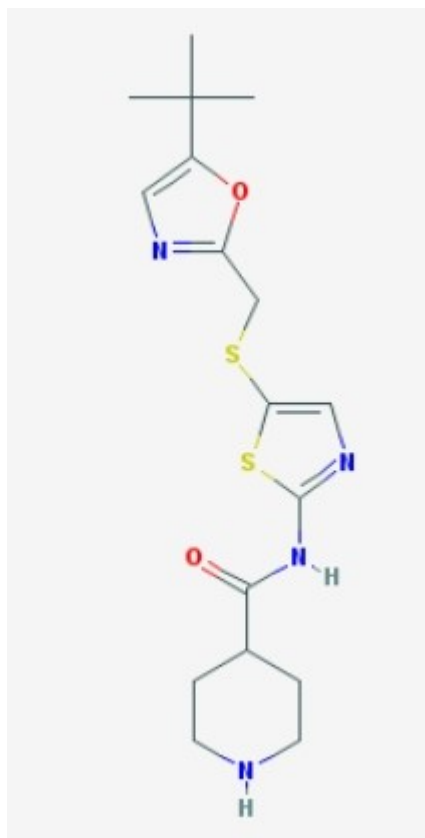
Obr. 14 Strukturní vzorec R-547

Z údajů dostupných na webové stránce <https://clinicaltrials.gov> vyplývá, že v současné době se na dalším výzkumu tohoto inhibitoru nepracuje. Poslední studie zabývající se testováním účinku R-547 proběhla roku 2006, kdy byl daný inhibitor předmětem klinického hodnocení fáze I. Fosforylace proteinu retinoblastomu se používá k monitorování cílové modulace nádorových buněk spojené s R-547. (DePinto et al. 2006)

1.4.9 SNS-032

SNS-032 je silný a selektivní inhibitor CDK2, CDK7 a CDK9, které vykazovaly silnou in vitro cytotoxicitu proti nádorovým buněčným liniím. Nedávno zveřejněná studie fáze I ukazuje vliv SNS-032 u pacientů s metastatickými solidními nádory. Při infuzním podání jednou týdně nebyla pozorována žádná toxicita závislá na dávce. Objevila se pouze únava a nevolnost. Zároveň bylo prokázáno, že i perorální podávání může být proveditelné. (Dickson and Schwartz 2009)

Mechanismus působení SNS-032 je v rychlé reverzibilní inhibici fosforylace RNA-polymerasy II a rychlé down-regulaci antiapoptotických proteinů Mcl-1 a XIAP. Podobným mechanismem působí i FLA, SNS-032 je v tomto případě silnějším inhibitorem. In vivo byla aktivita SNS-032 potvrzena při leukémii a mnohočetném myelomu. (Tong et al. 2010)



Obr. 15 Strukturní vzorec SNS-032

In vitro studie s primárními buňkami chronické lymfocytické leukemie a SNS-032 prokázaly reverzibilní inhibici CDK s expozicí méně než 10 hodin. K odstranění SNS-032 z kultivačního media po ukončení léčby došlo za dobu ≤ 6 hodin. Díky tomu mohlo dojít k refosforylaci RNA-polymerasy II, což vedlo k re-expresi proteinu Mcl-1 a následnému přežití buněk. Ve skutečnosti byla u pacienta zaznamenána refosforylace RNA-polymerasy II až v době, kdy plazmatická hladina SNS-032 klesla pod cílovou hladinu. Proto pro maximalizaci protinádorové aktivity může být vyžadována delší expozice, které by mohlo být dosaženo prodloužením trvání infuze, tj. ideálně po dobu 6 hodin. Běžně pozorovanou toxicitou byla myelosuprese. (Tong et al. 2010)

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo studium nové generace inhibitorů protein kinas, a to konkrétně AT-7519, AZD5438, dinaciclibu, flavopiridolu, LEE-011, palbociclibu, purvalanolu A, R547 a SNS-032, a následné stanovení jejich vlivu na aktivitu biotransformačních enzymů, lidských reuktas. V případě signifikantní inhibice těchto reuktas bychom přispěli k porozumění molekulárního mechanismu, který pravděpodobně přispívá k mnohočetné lékové rezistenci. V praxi by pak mohla být onkologickým pacientům poskytnuta mnohem účinnější léčba.

K naplnění tohoto základního cíle vede hned několik dílčích cílů práce:

- stanovení specifické aktivity všech vybraných karbonyl redukujících enzymů (CRE), tedy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, CBR1 a CBR3, k daunorubicinu a výběr nejvíce aktivních pro další zkoumání,
- screening inhibičních účinků všech vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kinas na jednotlivých CRE s nejvyšší naměřenou aktivitou,
- stanovení inhibiční koncentrace IC_{50} u CDKi s největším inhibičním potenciálem.

3 MATERIÁLY A METODIKA

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

amoniak 25%	Penta, Česká republika
daunorubicin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Německo
ethylacetát	Sigma-Aldrich, Německo
enzymy CRE ^a	Katedra biochemických věd FaF
glukosa-6-fosfát	Applichem, Německo
glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	Roche, Německo
chlorid hořečnatý	Katedra biochemických věd FaF
inhibitory CDK ^b	Katedra farmakologie a toxikologie FaF
NADP ⁺	Roche, Německo
0,1M sodno-fosfátový pufr pH 7,4	Katedra biochemických věd FaF

^a rekombinantně připravené lidské enzymy v expresním systému *E.coli*, rozpuštěné v 0,2M draselno-fosfátovém pufru a 20% glycerolu, pH 7,4; připraveny na Katedře biochemických věd FaF UK HK; AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, CBR1, CBR3

^b AT-7519, AZD5438, R547, LEE-011, dinaciclib, palbociclib (Axon Medchem, Nizozemí); flavopiridol, SNS-032 (SelleckChem, USA); purvalanol A (Sigma-Aldrich, Německo); na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK HK připraveny koncentrace 20 mM pro palbociclib (rozpuštěním v destilované vodě) a 10 mM pro všechny ostatní CDKi (rozpuštěním v DMSO)

3.1.2 Přístroje

analytické váhy Scaltec SBC 22	Scaltec, USA
minicentrifuga MiniSpin Plus	Eppendorf, Německo
minitřepačka a třepačka IKA Vortex Genius 3	IKA, Německo
přístroj pro výrobu ledové tříště Scotsman AF80	Scotsman, Velká Británie
termomixer Bioer Mixing Block MB-102	Biotech, USA
UHPLC systém Agilent 1290 (gradientová pumpa, autosampler, odplyňovač, termostatovaná část pro kolonu, fluorescenční detektor)	Agilent Technologies, USA
ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner 120T	Ultrazvuk, s.r.o., ČR
vakuový koncentrátor Concentrator plus	Eppendorf, Německo

3.1.3 Ostatní pomůcky

alobal, automatické pipety Biohit (0,5 µl – 1000 µl), buničitá vata, destilovaná voda, kádinky, kopistka, ledová lázeň, lžička, mikrozkuhavky Eppendorf 1,5ml, mrazicí box, rukavice, software GraphPad Prism 7.03 (Graphpad Software, USA), stojan na zkuhavky, stopky, špičky Sartorius Biohit

3.2 Metodika

3.2.1 Stanovení enzymové aktivity vybraných CRE s daunorubicinem

Nejprve bylo třeba zjistit aktivitu vybraných CRE s daunorubicinem jakožto specifickým substrátem, abychom následně mohli testovat účinky inhibitorů pouze na enzimech aktivních a ty neaktivní nebo aktivní velmi málo hned z počátku vyloučili.

3.2.1.1 Příprava NADPH-regeneračního systému

Regenerační systém je pro správný průběh reakce velice důležitý. Enzymy, zde tedy konkrétně reduktasy, při reakci využívají jako kofaktor NADP⁺. Právě NADP⁺ je

jednou ze součástí regeneračního systému, a proto je nutné zajistit jeho dostatečné množství během celé reakce.

Příprava regeneračního systému spočívala v navážení 6 mM glukoso-6-fosfátu, 0,8 mM NADP⁺ a jejich následném rozpuštění v 0,1 M Na-fosfátovém pufru pH 7,4 a 3 mM MgCl₂. Pokud i po důkladném promíchání na vortexu byly v roztoku viditelné nerozpuštěné krystalky, bylo třeba je rozpustit navíc ještě v ultrazvukové lázni. Regenerační systém byl uchováván na ledu. V čase potřeby bylo přidáno 35 j. glukosa-6-fosfátdehydrogenasy. Do reakce bylo poté přidáváno 20 µl takto připraveného regeneračního systému.

Regenerační systém byl připraven dohromady s kolegyní, která paralelně prováděla stejné měření pro vzájemné potvrzení správnosti výsledků. Hromadnou přípravou jsme zajistily téměř identické podmínky pro průběh obou měření a snížily tak riziko lidského pochybení hned v počátcích měření, případně drobných odlišností při pipetování biologického materiálu, které se může pokaždé mírně lišit.

3.2.1.2 Příprava substrátu

Substrát, daunorubicin-hydrochlorid $M = 529,54 \text{ g/mol}$, byl rozpuštěn v destilované vodě. Požadovaná koncentrace byla 5mM, do reakce ho bylo přidáváno 10 µl. Jeho finální koncentrace v reakci byla 500 µM. Substrát byl připraven opět dohromady s kolegyní, podobně jako výše uvedený NADPH-regenerační systém. Zároveň bylo třeba ho kvůli jeho fotosenzitivitě uložit na tmavém místě.

3.2.1.3 Příprava enzymů

Enzym byl naředěn 0,1 M Na-fosfátovým puftrem pH 7,4. Do reakce bylo pipetováno 10 µl. V jedné reakci (100 µl) bylo vždy 5 µg enzymu. Připravený enzym byl uchováván na ledu.

Zásobní koncentrace jednotlivých enzymů, se kterými jsme pracovali, jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Přehled zásobních koncentrací použitých enzymů

Název enzymu	Koncentrace [mg/ml]
AKR1A1	1,7
AKR1B1	1,63
AKR1B10	1,61
AKR1C1	1,84
AKR1C2	1,96
AKR1C3	1,92
AKR1C4	1,77
CBR1	2,11
CBR3	1,93

3.2.1.4 Příprava vzorků na inkubaci

Do čistých označených mikrozkuvek Eppendorf bylo napipetováno 60 μ l 0,1 M Na-fosfátového pufru a následně byly vloženy na led. Poté bylo přidáno 20 μ l regeneračního systému, na vortexu promícháno a opět vloženo do ledu. Stejným postupem bylo přidáno 10 μ l enzymu.

Všechny vzorky byly připravovány a měřeny v tripletech pro větší spolehlivost výsledků, výsledek je potom průměrem těchto tří hodnot.

Připravené vzorky zůstaly poté 10 minut uloženy v ledu.

3.2.1.5 Preinkubace a inkubace

Vzorky v mikrozkuvkách byly vloženy do termomixeru předehřátého na 37 °C a preinkubovány po dobu 5 minut.

Reakce byla zahájena přidáním 10 μ l 5 mM DAU. Celkový objem reakční směsi byl tedy 100 μ l. Po krátkém promíchání na vortexu byla mikrozkuvka vložena zpět do termomixeru.

Reakce probíhala 30 minut, ukončena byla přidáním 40 μ l amoniaku a zchlazením v ledové lázni po dobu 10 minut.

Poté byla provedena dvojnásobná extrakce DAU a jeho metabolitů ethylacetátem tak, že ke každému vzorku bylo pipetováno 1000 μ l ethylacetátu a následně byl protřepáván na třepačce při rychlosti 4 po dobu 15 minut. Následovala 2 minutová centrifugace při

13400 RPM, kde došlo působením odstředivé síly k oddělení dvou vrstev. Do předem připravených čistých a popsanych mikrozkušavek bylo napipetováno 1000 μ l ethylacetátové vrstvy, do které byl extrahován DAU spolu s jeho metabolity. Důležité je nenarušit spodní vrstvu obsahující sedimentované nečistoty, které by mohly ucpat kolonu UHPLC. Následně byl ve vakuovém koncentrátoru při 30 °C odpařen ethylacetát přibližně po dobu 30 minut. Během toho bylo do původních mikrozkušavek napipetováno dalších 1000 μ l ethylacetátu a postupovalo se stejně jako předtím. Poté bylo do odpařených vzorků opět pipetováno 1000 μ l ethylacetátové vrstvy a znovu odpařeno do sucha. Výsledné odparky byly vloženy do mrazáku a uchovávány při -20 °C.

3.2.1.6 UHPLC analýza

Odparky jednotlivých vzorků bylo třeba před jejich vyhodnocováním na UHPLC znovu rozpustit a přepipetovat do vialek.

Nejprve byla připravena mobilní fáze, která je tvořena 74 % kyseliny mravenčí a 26 % acetonitrilu. Ta byla v objemu 400 μ l přidána k odparkům, které byly zvortexovány a na 5 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Důkladně rozpuštěný vzorek byl znovu zvortexován a zcentrifugován. Pipetováno bylo 80 μ l do vialek s inserty. Nástřík vzorku na kolonu byl 5 μ l.

Množství přeměněného DAU-OL bylo detekováno přístrojem UHPLC Agilent 1290 Series, který je vybaven kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus (2,1 x 50 mm, 1,8 μ m) s 1290 Infinity inline filtrem. Nastavení systému UHPLC bylo následující: isokratická eluce 1,0 ml/min, mobilní fáze - roztok 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu v poměru 74:26 v/v, teplota 40 °C, fluorescenční detekce při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 560 nm.

3.2.1.7 Vyhodnocení výsledků

Z analýzy na UHPLC byly získána hmotnost DAU-OL, jednoho z metabolitů, na který je daunorubicin biodegradován, v jednotlivých testovaných vzorcích. Dále bylo třeba vypočítat výslednou hodnotu specifické aktivity (viz vzorec níže), která byla vyjádřena v nmol/mg/ml.

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

a	specifická aktivita [nmol/mg/ml]
m	hmotnost DAU-OL ve vzorku
K	koeficient zředění; zde 80 (odparek byl před UHPLC analýzou naředěn na 400 μ l, nástřík na kolonu byl 5 μ l, tudíž byla získána jen 1/80 celkové hmotnosti DAU-OL)
1000	převod na mg
t	čas inkubace (30 minut)
c	koncentrace enzymu v 1 vzorku (5 μ g)
Mr	relativní molekulová hmotnost DAU (Mr = 529,54)

3.2.2 Testování inhibičních účinků jednotlivých inhibitorů

3.2.2.1 Příprava regeneračního systému

Příprava regeneračního systému je shodná s přípravou regeneračního systému pro stanovení aktivit jednotlivých enzymů, která je detailně popsána v kapitole 3.2.1.1. Liší se pouze v připravovaném objemu, a to dle počtu vzorků. Zde bylo potřeba si připravit množství regeneračního systému na 30 vzorků.

3.2.2.2 Příprava substrátu

Rovněž postup přípravy substrátu je shodný s tím uvedeným v kapitole 3.2.1.2. Daunorubicin byl opět použit v koncentraci 5 mM. Roztok byl vždy připravován ideálně v nadbytku, tj. o jednu reakci více.

3.2.2.3 Příprava CRE

K dalšímu měření byly použity enzymy dva. AKR1A1 o koncentraci 1,7 mg/ml a AKR1B10 o koncentraci 1,61 mg/ml. Oba byly naředěny 0,1 M Na-fosfátovým puforem pH 7,4 tak, aby výsledný obsah enzymu v jednotlivých inkubacích byl 5 μ g.

Do reakce bylo opět pipetováno 10 μ l.

3.2.2.4 Příprava CDKi

V této práci bylo použito 9 různých inhibitorů lidských reduktas. Dodávány byly v koncentraci 10 mM a byly rozpuštěny v DMSO, výjimkou byl palbociclib, který byl dodán v koncentraci 20 mM a rozpuštěn v destilované vodě.

Mezi inhibitory vybrané pro tento pokus patří AT-7519, AZD5438, dinaciclub, flavopiridol, LEE-011, palbociclib, purvalanol A, R547 a SNS-032. Inhibitory byly vždy před měřením ředěny tak, aby jejich finální koncentrace v reakční směsi byla 10 μ M a 50 μ M.

3.2.2.5 Příprava vzorků na inkubaci

Podrobný postup je již popsán v kapitole 3.2.1.4. Výsledný objem reakční směsi byl opět 100 μ l.

Obdobným způsobem byly připraveny i všechny kontrolní vzorky, které jsou důležité pro ověření správnosti měření. Následně byly výsledky inhibičních účinků vztahovány právě k hodnotě aktivity enzymu s DMSO, jelikož všechny inhibitory byly právě v DMSO rozpuštěny a DMSO sám o sobě již určitou inhibici enzymu vykazuje. Výjimkou však byl inhibitor PD, který byl rozpuštěn ve vodě, a tudíž byl jeho inhibiční vliv vztahován k aktivitě samotného enzymu.

Tab. 2 Přehled složení reakční směsi

Reakční směs	100 μ l
0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4	58 μ l
Regenerační systém	20 μ l
CRE	10 μ l
Inhibitor CDK	2 μ l
Daunorubicin 5mM	10 μ l

3.2.2.6 Preinkubace a inkubace

Postup preinkubace a samotné inkubace je shodný jako u předchozího měření a je podrobně popsán v kapitole 3.2.1.5.

3.2.2.7 UHPLC analýza

Průběh UHPLC analýzy je uveden v kapitole 3.2.1.6.

3.2.2.8 Vyhodnocení výsledků

Výpočet specifické aktivity probíhal podle stejného vzorce, který je uveden v kap. 3.2.1.7.

Inhibice byla zjištěna odečtením získané specifické aktivity od aktivity kontrolního vzorku s DMSO, resp. od aktivity samotného enzymu v případě inhibitoru PD.

3.2.3 Stanovení inhibiční koncentrace IC₅₀

Z předchozích výsledků měření byl vybrán jeden CRE (AKR1B10) spolu se dvěma CDKi (AZD5438, dinaciclub), u kterých se prokázal největší stupeň inhibiční aktivity. Bylo třeba zvolit široké spektrum koncentrací inhibitorů, a to na základě již změřených výsledků hodnot inhibice.

3.2.3.1 Příprava vzorků

Kompletní příprava vzorků, tzn. včetně přípravy regeneračního systému, enzymu, substrátu a následné preinkubace a inkubace probíhala stejně jako v předchozím měření (viz kapitola 3.2.2.). Inhibitory bylo potřeba naředit ve zvolených koncentracích. Dále byly provedeny kontrolní vzorky v tripletu, kde byly 2 μl inhibitoru nahrazeny 2 μl DMSO.

3.2.3.2 Výpočet inhibiční koncentrace

Pro získání údajů o účinku inhibitorů byl použit software GraphPad Prism 7.03, ve kterém byla spočítána hodnota inhibiční koncentrace. IC₅₀ vyjadřuje množství inhibitoru, které je potřeba ke snížení rychlosti enzymové reakce na polovinu. Uváděna je jako molární koncentrace. (Internet 9)

3.2.3.3 Určení typu inhibice

Typ inhibice byl určován pouze u dvou nejsilněji působících inhibitorů. Provedení inkubace bylo totožné s postupem uvedeným v kap. 3.2.1.5. Rozdíl byl v použitých koncentracích daunorubicinu: 200; 400; 600; 800 a 1000 μM. Pro každou z nich byly použity tyto koncentrace inhibitorů: 0; 10; 30 a 50 μM.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení enzymové aktivity vybraných lidských karbonyl redukujících enzymů vůči substrátu daunorubicinu

Výzkumné skupiny, nejen na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, se studiu mnohočetné lékové rezistence a jejímu ovlivnění věnují již řadu let. Měření aktivity jednotlivých lidských karbonyl redukujících enzymů a následně síly inhibice nové generace inhibitorů těchto enzymů byl tedy jen střípek zapadající do celé skládačky.

Rosemond a Walsh ve své publikaci zmiňují seznam léčiv, které slouží jako substráty karbonyl redukujících enzymů. Mezi ně patří například i oracin, který už byl na Katedře biochemických věd testován dříve, ale i daunorubicin, který je klinicky užíván a byl vybrán k tomuto testování. (Rosemond a Walsh 2004)

Prvotním důležitým úkolem naší práce bylo změřeni aktivity u všech vybraných redukčních enzymů nadrodiny AKR a dvou enzymů nadrodiny SDR. Jednalo se o lidské enzymy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3.

Výsledky byly vyhodnoceny podle vzorce uvedeného v kap. 3.2.1.7.

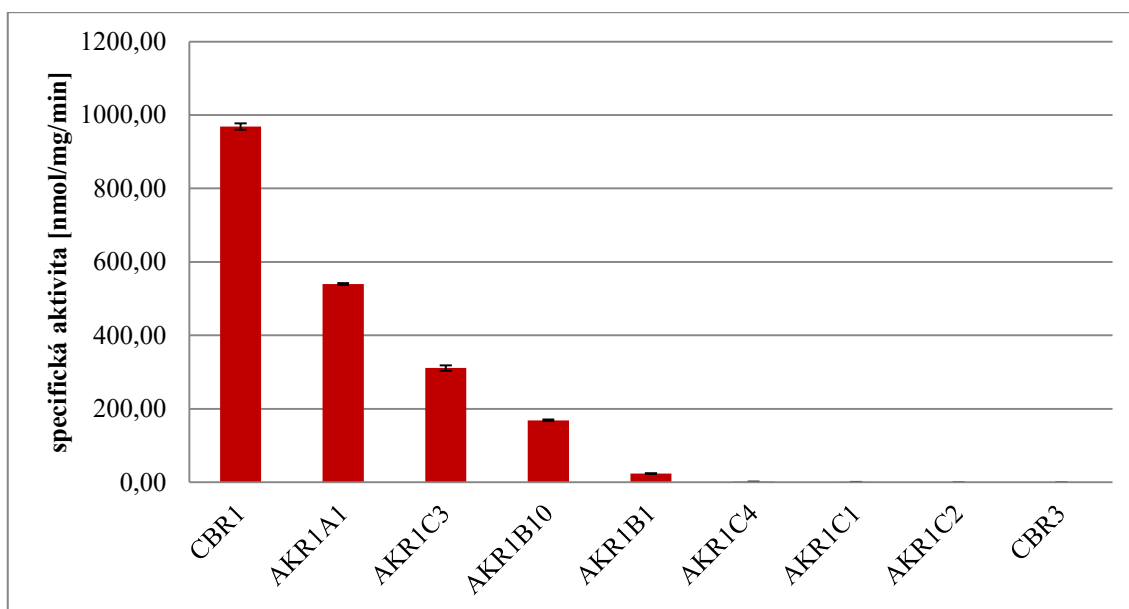
Tab. 3 Vzor tabulky pro výpočet specifické aktivity

vzorek	hmotnost DAU- OL [ng]	DAU-OL v celém vzorku [ng]	[ng/1mg/30 min]	[nmol/mg/30min]	specifická aktivita [nmol/mg/min]
CBR1/1	958,562	76684,960	15336992	28963	965
CBR1/2	952,817	76225,360	15245072	28789	960
CBR1/3	973,971	77917,680	15583536	29428	981
AKR1B10/1	167,885	13430,800	2686160	5073	169
AKR1B10/2	169,950	13596,000	2719200	5135	171
AKR1B10/3	164,734	13178,720	2635744	4977	166
AKR1B1/1	22,152	1772,160	354432	669	22
AKR1B1/2	24,027	1922,160	384432	726	24
AKR1B1/3	24,424	1953,920	390784	738	25

Tab. 4 Naměřené hodnoty specifické aktivity jednotlivých enzymů

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a
AKR1A1	540 ± 3
AKR1B1	24 ± 1
AKR1B10	169 ± 2
AKR1C1	1 ± 0
AKR1C2	0 ± 0
AKR1C3	311 ± 8
AKR1C4	2 ± 0
CBR1	969 ± 9
CBR3	0 ± 0

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



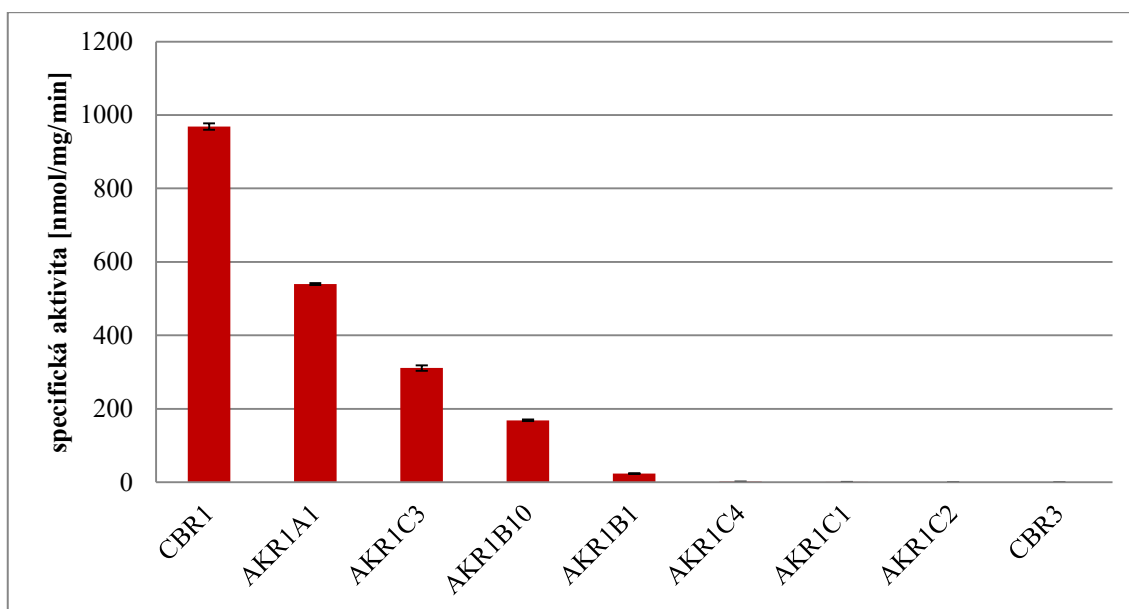
Obr. 16 Graficky vyjádřené rozložení aktivity jednotlivých enzymů vůči DAU (5 mM)

Pro potvrzení naměřených dat byl kolegyní proveden opakovaný pokus o stanovení aktivity všech vybraných enzymů. Měření probíhalo za stejných podmínek. Jeho výsledky jsou zobrazeny v tab. 5 a obr. 17.

Tab. 5 Hodnoty specifické aktivity jednotlivých enzymů získané druhým měřením

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a
AKR1A1	607 ± 7
AKR1B1	28 ± 1
AKR1B10	172 ± 5
AKR1C1	1 ± 0
AKR1C2	1 ± 0
AKR1C3	307 ± 12
AKR1C4	6 ± 1
CBR1	1 054 ± 9
CBR3	0 ± 0

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



Obr. 17 Graficky vyjádřené rozložení aktivity jednotlivých enzymů při druhém měření

Hodnoty výsledné specifické aktivity všech enzymů v druhém měření byly téměř totožné s měřením prvním, čímž jsme potvrdily správnost naměřených dat a vyloučily případnou lidskou chybu během měření.

Jako neaktivnější se ukázaly enzymy CBR1, AKR1A1, AKR1C3 a AKR1B10. Naopak enzymy AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3 vykazovaly nulovou, nebo zanedbatelnou aktivitu již pouze v přítomnosti substrátu, a proto byly z dalšího experimentu vyloučeny.

Pro srovnání, s oracinem, jakožto v té době potenciálním cytostatikem, byla v roce 2007 provedena studie ukazující vliv AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4, získaných z lidského jaterního cytosolu, na metabolizaci tohoto cytostatika, kde dochází k redukci karbonylové skupiny oracinu na neúčinný metabolit, dihydrooracin (DHO). Ukázalo se, že AKR1C2 a AKR1C4 jsou enzymy stereospecifické a produkují výhradně (+)-DHO enantiomer, na rozdíl od AKR1C1, který produkuje jak (-)-DHO (3 %), tak především ve zvýšené míře (+)-DHO (97 %). Nicméně, maximální rychlost reakce (v_{\max}) a celková účinnost těchto dvou enzymů je ve srovnání s AKR1C1 výrazně nižší. Pro AKR1C2 byla naměřena hodnota v_{\max} 30 nmol/mg/min, pro AKR1C4 pak pouhých 7 nmol/mg/min a oproti tomu u AKR1C1 byla v_{\max} rovna 640 nmol/mg/min. Výsledným zjištěním tedy bylo, že i přes to AKR1C1 působí daleko účinněji. (Wsol et al. 2007)

Rok poté bylo provedeno měření opět vůči oracinu jako substrátu, o koncentraci 0,025 mM až 0,8 mM, tentokrát s rekombinantním enzymem AKR1C3 získaným z *E. coli*, u kterého se rovněž podařilo prokázat vysokou účinnost při inaktivaci oracinu. Hodnota v_{\max} pro AKR1C3 byla rovna 169 nmol/mg/min, tj. přibližně 3krát nižší než u AKR1C1. Zároveň bylo provedeno měření AKR1C3 s doxorubicinem, v koncentracích od 0,05 mM do 1,00 mM, které ukázalo, že i toto cytostatikum podléhá inaktivaci vlivem AKR1C3. Naměřená v_{\max} byla 53 nmol/mg/min. Z těchto dvou studií jednoznačně vyplývá, že AKR1C3 hraje významnou roli v inaktivaci protinádorové léčby, zejména jedná-li se o hormon-dependentní nádory prsu či prostaty. (Novotna et al. 2008)

Další studie se zabývala měřením specifické aktivity enzymů vůči doxorubicinu. Ukázalo se, že enzymy AKR1C1, AKR1C2 a CBR3 nevykazují žádnou nebo jen velmi malou aktivitu k substrátu. U šesti enzymů (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR1C4 a CBR1) byla prokázána aktivita vůči DOX. Jednoznačně se však jako nejaktivnější jevíly AKR1C3 (183,5 nmol/mg/min) a CBR1 (20,6 nmol/mg/min). (Kassner et al. 2008). Nově zjištěné skutečnosti o účinnosti DOX na rakovinné buňky vedly ke studování možností, jak jeho účinnost ještě zvýšit a zároveň snížit jeho závažné nežádoucí účinky. Například bylo zjištěno, že v MCF-7 buňkách rakoviny prsu dokáže oracin zvyšovat antiprolifertivní efekt DOX a zároveň také inhibovat redukci na neúčinný metabolit DOX-OL. (Hanusova et al. 2013) V roce 2015 byly potvrzeny téměř stejné výsledky v porovnání s výše zmíněnou studií z roku 2008, jako nejaktivnější

enzymy se vůči doxorubicinu o koncentraci 200 μM ukázaly AKR1C3 a CBR1, a dále i AKR1A1, AKR1B10 a CBR3. Naopak velmi nízká, zanedbatelná aktivita byla stanovena u enzymů AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C4. (Hofman et al. 2015) Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i při našem měření s DAU, z čehož je vidět, že oba substráty jsou si velmi podobné a v organismu jsou metabolizovány shodnými reduktasami.

Co se týče samotného DAU, na konci roku 2017 byly publikovány výsledky týkající se vlivu adipocytů na metabolizaci DAU. Adipocyty indukují přeměnu DAU na DAU-OL, čímž snižují vliv cytostatika na nádorovou tkáň. Mechanismem je zvýšená exprese karbonyl redukujících enzymů, především AKR1C1, AKR1C2 a AKR1C3. Týká se to především druhů rakoviny bohatých právě na tukové buňky, tj. například v prsu či kostní dřeni, avšak prokázán byl i u akutní lymfoblastové leukemie. Tento poznatek může být významný zejména při léčbě nádorových onemocnění obézních pacientů. (Sheng et al. 2017)

4.2 Testování inhibičních účinků jednotlivých inhibitorů

Pro další experiment byly vybrány dva enzymy, které vykazovaly jednu z největších aktivit na DAU, a to AKR1A1 a AKR1B10. Oba enzymy byly následně postupně podrobeny testování celým spektrem CDKi.

Měření vždy probíhalo v tripletech pro lepší spolehlivost výsledků. Zároveň bylo provedeno kontrolní měření aktivity samotného enzymu bez přidání inhibitoru a také měření aktivity enzymu, kde byl inhibitor nahrazen stejným množstvím DMSO. Výsledky měření jsou uvedeny v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2.

Pro úplnost je třeba poukázat na interakci inhibitorů cyklin-dependentních kinas s efluxními transportéry, čímž rozšiřují svůj mechanismus účinku i na inhibici těchto pump. Týká se to především ABC (ATP-binding cassette) transportních proteinů, jako jsou ABCB1 (P-glykoprotein), ABCG2 (BCRP – breast cancer resistance protein) a ABCCs (MRPs – multidrug resistance associated proteins), které zajišťují membránový transport jak endogenních látek, tak xenobiotik. (Cihalova et al. 2013) Nejprve byl testován efekt pěti CDKi na transportním proteinu ABCG2. Jako první z použitých substrátů byl Hoechst 33342, kde největší inhibiční efekt vykazoval 50 μM

purvalanol A a 25 μM olomoucín II. Oba zvýšili koncentraci použitého substrátu řádově o 40 - 45 %. Druhým testovaným substrátem byl glyburid, kde se opět jako nejsilněji působící CDKi projeví purvalanol A a olomoucín II o koncentracích 5 μM . Zde dokonce zvýšili akumulaci substrátu o 96 %, resp. 60 %. Následně byly tyto dva nejsilnější inhibitory zkoumány vůči cytostatiku mitoxantronu, kde se potvrdilo jejich synergické antiproliferativní působení. (Hofman et al. 2012) V roce 2013 bylo provedeno testování interakcí inhibitorů FLA, olomoucínu II, purvalanolu A, roscovitinu a SNS-032 s transportérem ABCB1. V případě substrátu Hoechst 33342 byl nejsilnějším inhibitorem olomoucín II ($\text{IC}_{50} = 6,4$), dále pak roscovitin ($\text{IC}_{50} = 10,3$), purvalanol A ($\text{IC}_{50} = 12,1$), SNS-032 ($\text{IC}_{50} = 14,6$) a FLA ($\text{IC}_{50} = 16,9$). Poté byly všechny inhibitory testovány na buněčných liniích MDCKII-ABCB1 (Madin–Darby canine kidney) v příslušných IC_{50} koncentracích, kde se nejsilnějším inhibitorem ukázal purvalanol A (86 %), následován roscovitinem (57 %). V případě daunorubicinu byly použity 3 různé koncentrace inhibitorů – 1, 10 a 20 μM . Nejlepších výsledků dosahovala nejvyšší koncentrace inhibitorů, výjimkou byl SNS-032, který nevykazoval žádnou inhibiční aktivitu při žádné z testovaných koncentrací. Rovněž byl zjištěn synergický antiproliferativní efekt DAU a nejsilněji působících ABCB1 inhibitorů (purvalanolu A, olomoucínu II a roscovitinu), díky čemuž se předpokládá potenciální významné snížení dávky cytostatika při zachování stejného léčebného účinku. (Cihalova et al. 2013) V roce 2015 bylo testováno další spektrum CDKi na shodných buněčných liniích jako u předchozího měření, tj. na MDCKII-ABCB1 a dále pak navíc i na MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCC1. Výsledkem bylo zjištění, že nejsilnějším inhibitorem na transportních proteinech ABCG2 a ABCC1 byl jednoznačně flavopiridol, zatímco AT-7519 neinhiboval žádný z třech zmíněných transportních proteinů. V kombinaci s daunorubicinem a topotekanem vykazovaly největší synergický antiproliferativní efekt flavopiridol a SNS-032. (Cihalova et al. 2015a)

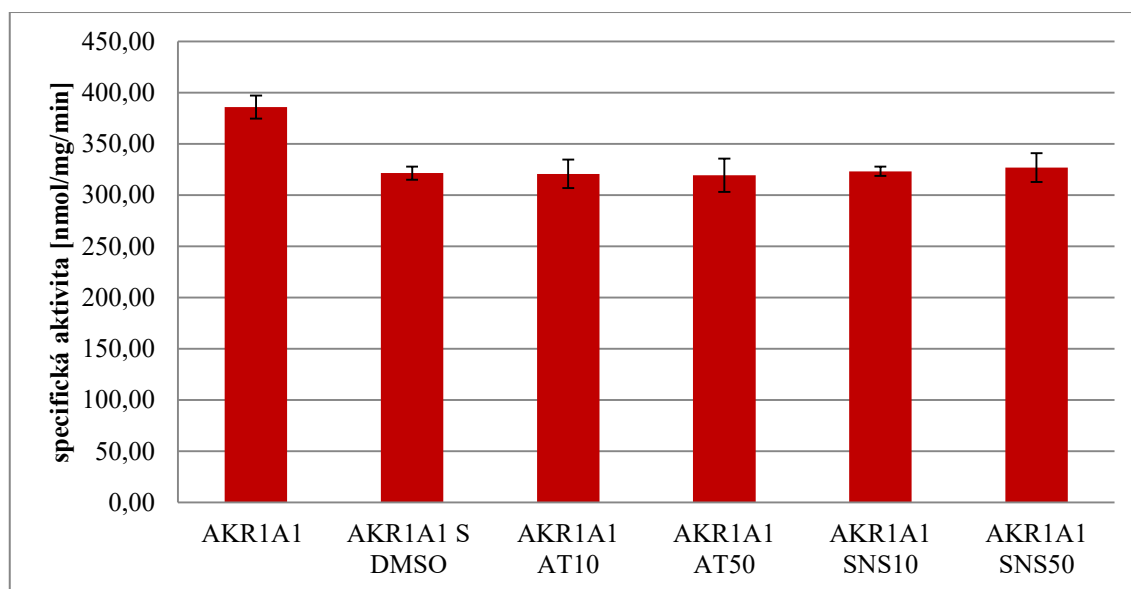
4.2.1 Screening účinku inhibitorů na AKR1A1

Pro screening byl jako substrát použit daunorubicin o koncentraci 5 mM. Do reakce se přidávalo 10 μl substrátu a tudíž jeho finální koncentrace v reakci byla 500 μM . Enzym AKR1A1 měl koncentraci 1,7 mg/ml a pro jednu reakci (100 μl) ho bylo použito 5 μg .

Tab. 6 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů AT-7519 a SNS-032

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1A1	386 ± 11	
AKR1A1 S DMSO	321 ± 6	0,00
AKR1A1 AT10	321 ± 14	0,21
AKR1A1 AT50	319 ± 16	0,63
AKR1A1 SNS10	323 ± 5	-0,58
AKR1A1 SNS50	327 ± 14	-1,69

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



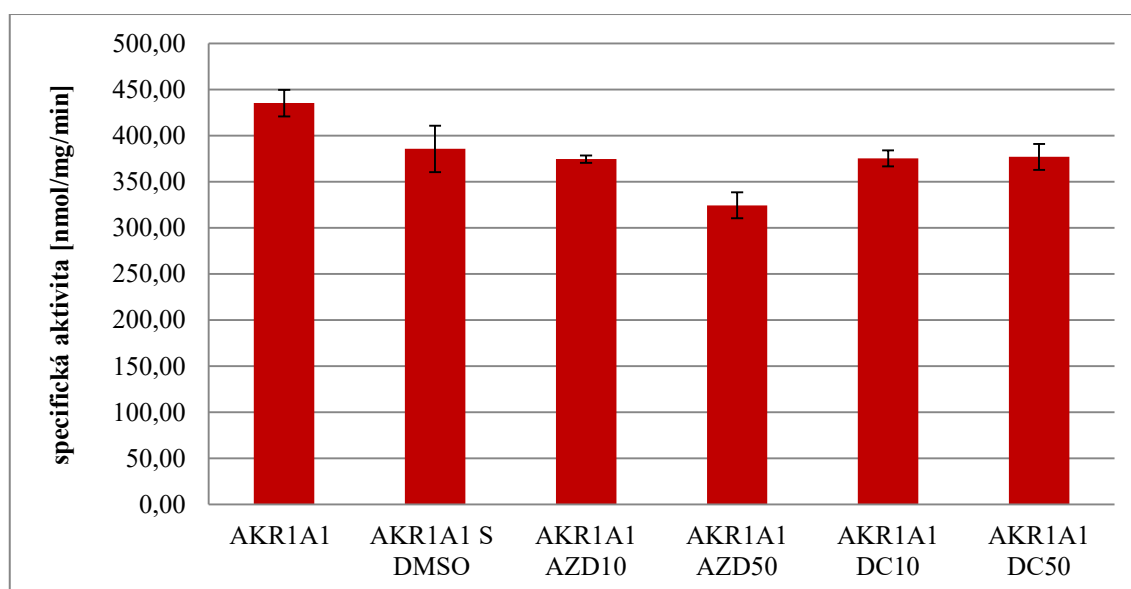
Obr. 18 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1A1 s inhibitory AT-7519 a SNS-032

Z výše uvedených hodnot vidíme, že inhibitor AT-7519 ani SNS-032 nemá na tento enzym téměř žádný signifikantní účinek.

Tab. 7 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů AZD5438 a DC

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1A1	435 ± 14	
AKR1A1 S DMSO	386 ± 25	0,00
AKR1A1 AZD10	374 ± 4	2,90
AKR1A1 AZD50	324 ± 144	15,88
AKR1A1 DC10	375 ± 9	2,71
AKR1A1 DC50	377 ± 14	2,25

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



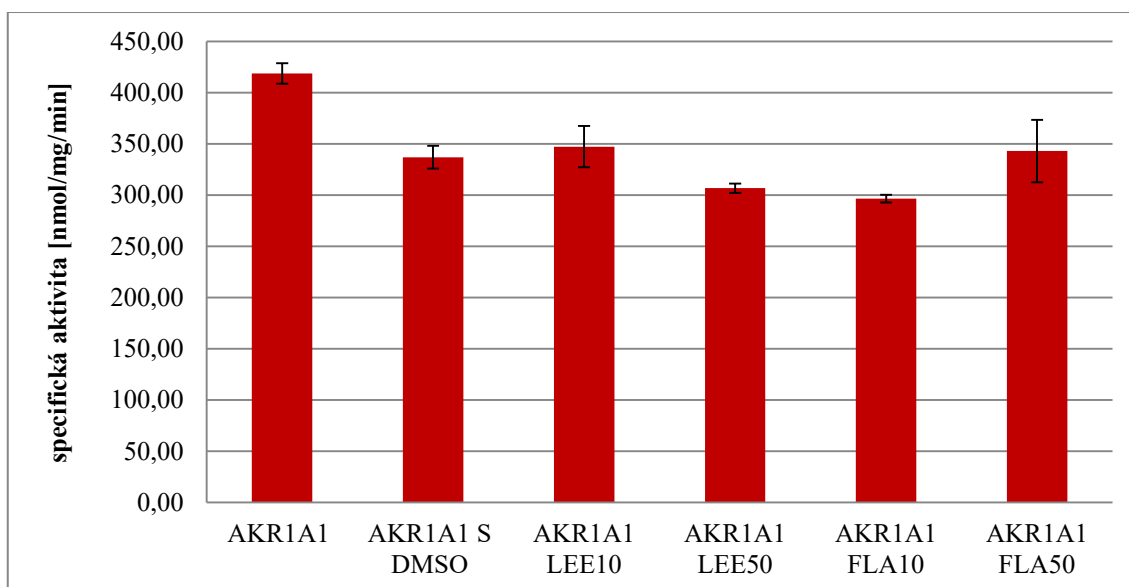
Obr. 19 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1A1 s inhibitory AZD5438 a DC

U inhibitoru AZD5438 o koncentraci 50 μ M se již nějaký inhibiční vliv projevil (viz tab. 7), avšak ani zde nijak výrazně. Inhibice byla pouhých 15 %.

Tab. 8 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů LEE-011 a FLA

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1A1	419 ± 10	
AKR1A1 S DMSO	337 ± 11	0,00
AKR1A1 LEE10	347 ± 20	-3,05
AKR1A1 LEE50	307 ± 4	8,98
AKR1A1 FLA10	297 ± 4	11,98
AKR1A1 FLA50	343 ± 31	-1,78

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



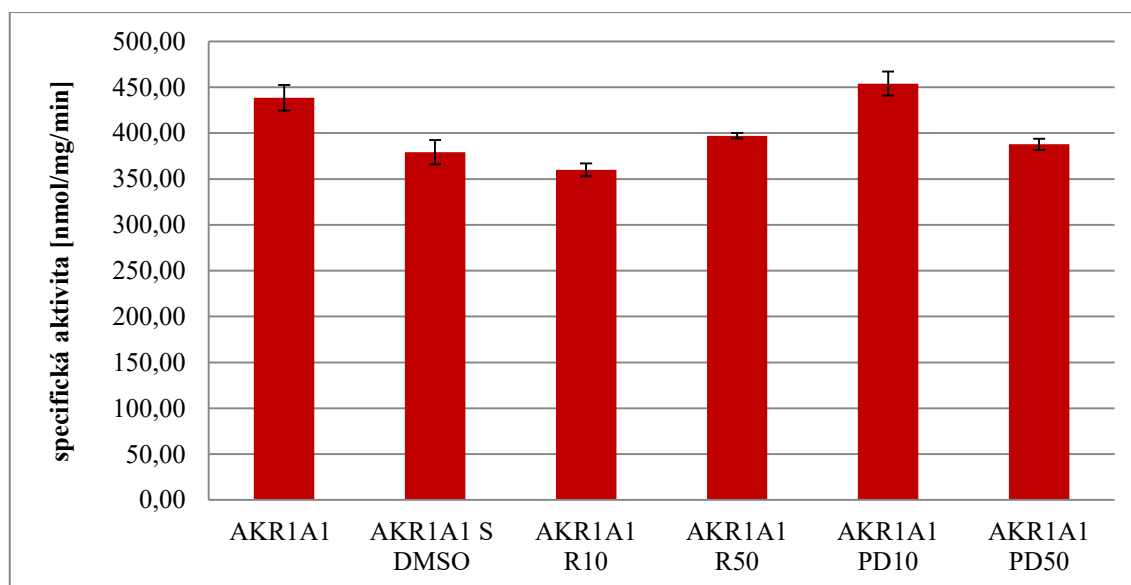
Obr. 20 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1A1 s inhibitory LEE-011 a FLA

Ani u inhibitorů LEE-011 a FLA jsme nezaznamenali žádné signifikantní inhibiční účinky. Navíc u flavopiridolu můžeme pozorovat, že jeho nižší koncentrace má vyšší inhibiční účinek. To je pravděpodobně způsobeno lidským faktorem, tj. nepřesností při pipetování či měření nebo nedůkladným promícháním směsi, případně také různorodostí použitého biologického materiálu. Tato nepřesnost se projevila už tím, že tři naměřené hodnoty pro FLA50 byly poměrně rozdílné.

Tab. 9 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů R547 a PD

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1A1	439 ± 14	
AKR1A1 S DMSO	379 ± 13	0,00
AKR1A1 R10	360 ± 7	5,12
AKR1A1 R50	397 ± 3	-4,69
AKR1A1 PD10	4545 ± 13	-3,51
AKR1A1 PD50	388 ± 6	11,59

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



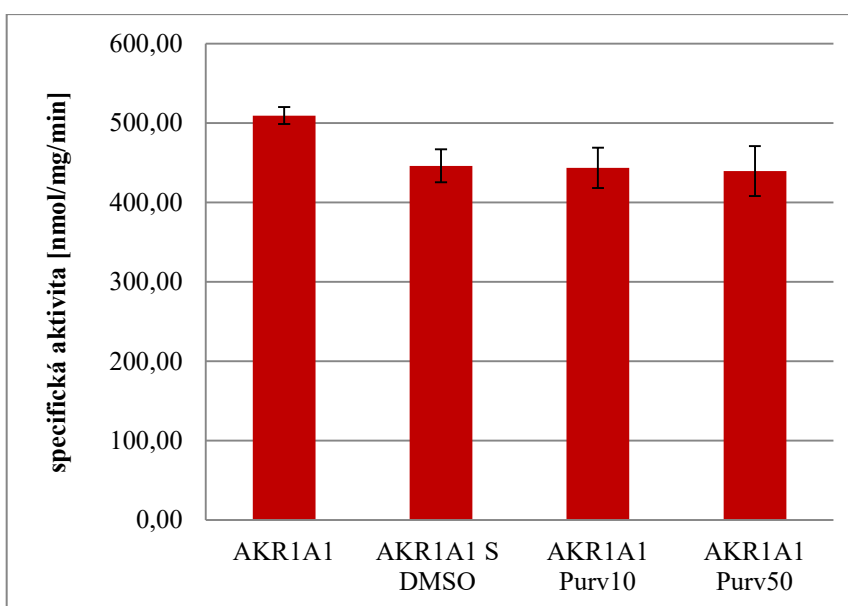
Obr. 21 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1A1 s inhibitory R547 a PD

R547 a PD rovněž nevykazovaly téměř žádnou výraznou inhibiční aktivitu.

Tab. 10 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1A1 a procentuální inhibice po přidání inhibitoru purvalanolu A

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1A1	509 ± 11	
AKR1A1 S DMSO	446 ± 21	0,00
AKR1A1 Purv10	443 ± 25	0,60
AKR1A1 Purv50	440 ± 31	1,47

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



Obr. 22 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1A1 s inhibitorem purvalanolem A

Purvalanol A prokázal téměř nulovou inhibiční aktivitu u obou stanovovaných koncentrací.

Tab. 11 Souhrnný přehled inhibiční účinnosti 50 μ M koncentrace vůči AKR1A1, řazeno sestupně

AKR1A1	
inhibitor	inhibice [%]
AZD5438	16
PD	12
LEE-011	9
DC	2
AT-7519	1
Purv. A	1
FLA	0
R547	0
SNS-032	0

U AZD5438 a PD byl zjištěn stupeň inhibice 16, resp. 12 %, což jsou sice hodnoty nejvyšší, ale přesto poměrně stále málo významné. (viz tab. 11)

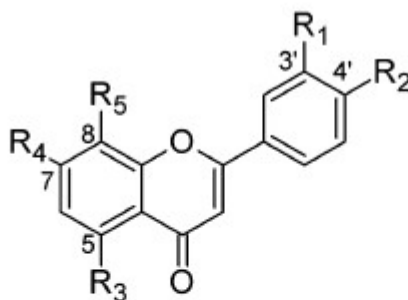
V porovnání s výsledky studie z roku 2013 na transportních proteinech ABCB1 a ABCG2 a ABCC1 (Cihalova et al.), kde se jako nejlépe působící inhibitory ukázaly FLA a SNS-032, jsou tyto výsledky diametrálně odlišné. Jak je patrné z tab. 11, tyto dva inhibitory nevykazovaly na AKR1A1 žádnou inhibiční aktivitu.

4.2.2 Screening účinku inhibitorů na AKR1B10

Tento screening byl proveden metodicky shodně s předchozím, uvedeným v kap. 4.1.2. Rozdíl byl pouze v použitém enzymu, zde AKR1B10 o zásobní koncentraci 1,61 mg/ml.

Zároveň již v roce 2015 byla na enzymu AKR1B10 provedena studie, jejímž cílem bylo testování širšího spektra potenciálních inhibitorů ze skupiny rostlinných fenolických sloučenin (vč. flavonoidů) a isochinolinových alkaloidů, jelikož na rozdíl od inhibitorů AKR1B1 je jich zde popsán jen malý zlomek. Jako kontrolní inhibitor, určený k porovnání síly účinku inhibitorů, byla použita kyselina flufenamová, která se v některém z předchozích experimentů ukázala jako jeden z nejsilnějších inhibitorů AKR1B10 ($IC_{50} = 0,76 \mu\text{M}$). Zde však měla naprosto opačný charakter, o kterém svědčí hodnota naměřené $IC_{50} = 96,0 \mu\text{M}$, což poukazuje na to, že velmi záleží na podmínkách, za kterých je měření prováděno a že tedy není možné jednoduše porovnávat výsledky různých studií. Ukázalo se, že flavonoidy a další fenolické látky jsou jednoznačně

lepšími inhibitory AKR1B10 než isochinolinové alkaloidy. Nejsilnějšími inhibitory byly stanoveny apigenin ($IC_{50} = 6,6 \mu M$), 7-hydroxyflavon ($IC_{50} = 8,3 \mu M$) a luteolin ($IC_{50} = 9,2 \mu M$). Předpokládá se, že síla inhibice je podmíněna strukturou jednotlivých látek. Důležitým znakem je zde hydroxylová skupina v poloze 7 a 4', viz obr 23. Nevýhodou je, že ve srovnání s kyselinou flufenamovou nejsou tyto inhibitory selektivní pro AKR1B10. Pro úplnost zmíním i nejsilnější z isochinolinových alkaloidů: berberin a palmatin, které jsou zároveň inhibitory AKR1B1. (Zemanova et al. 2015)



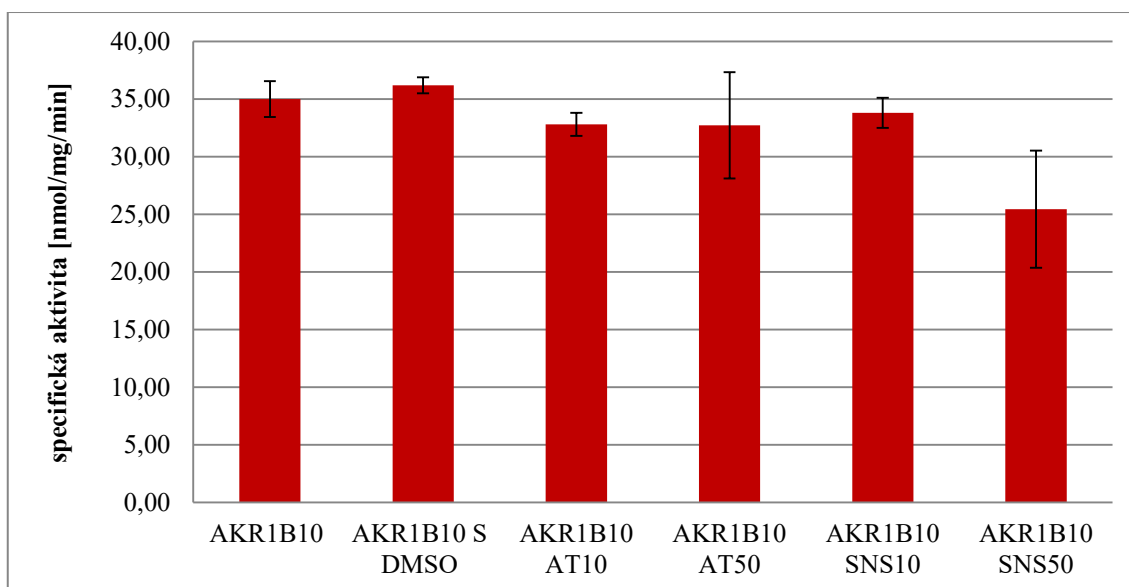
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
apigenin	H	OH	OH	OH	H
luteolin	OH	OH	OH	OH	H
7-hydroxyflavon	H	H	H	OH	H
5-hydroxyflavon	H	H	OH	H	H
vitexin	H	OH	OH	OH	CGlc

Obr. 23 Struktura flavonoidů testovaných pro inhibiční účinky na AKR1B10 (převzato z Zemanova et al. 2015)

Tab. 12 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů AT-7519 a SNS-032

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1B10	35 ± 2	
AKR1B10 S DMSO	36 ± 1	0,00
AKR1B10 AT10	33 ± 1	9,32
AKR1B10 AT50	33 ± 5	9,55
AKR1B10 SNS10	34 ± 1	6,57
AKR1B10 SNS50	25 ± 5	29,66

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



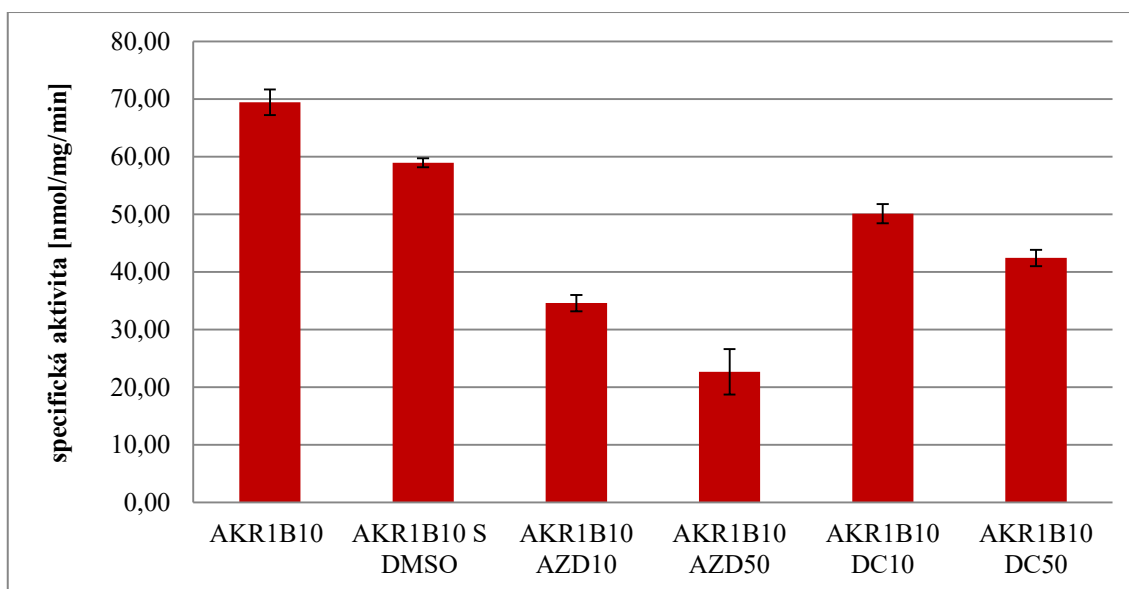
Obr. 24 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1B10 s inhibitory AT-7519 a SNS-032

Z výše uvedeného je patrné, že interakce enzymu s inhibitorem AT-7519 není významná. Naopak téměř 30 % hodnotu inhibice ukazuje SNS-032 v koncentraci 50 μ M.

Tab. 13 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů AZD5438 a DC

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1B10	69 ± 2	
AKR1B10 S DMSO	59 ± 1	0,00
AKR1B10 AZD10	35 ± 1	41,30
AKR1B10 AZD50	23 ± 4	61,51
AKR1B10 DC10	50 ± 2	14,99
AKR1B10 DC50	42 ± 1	28,03

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



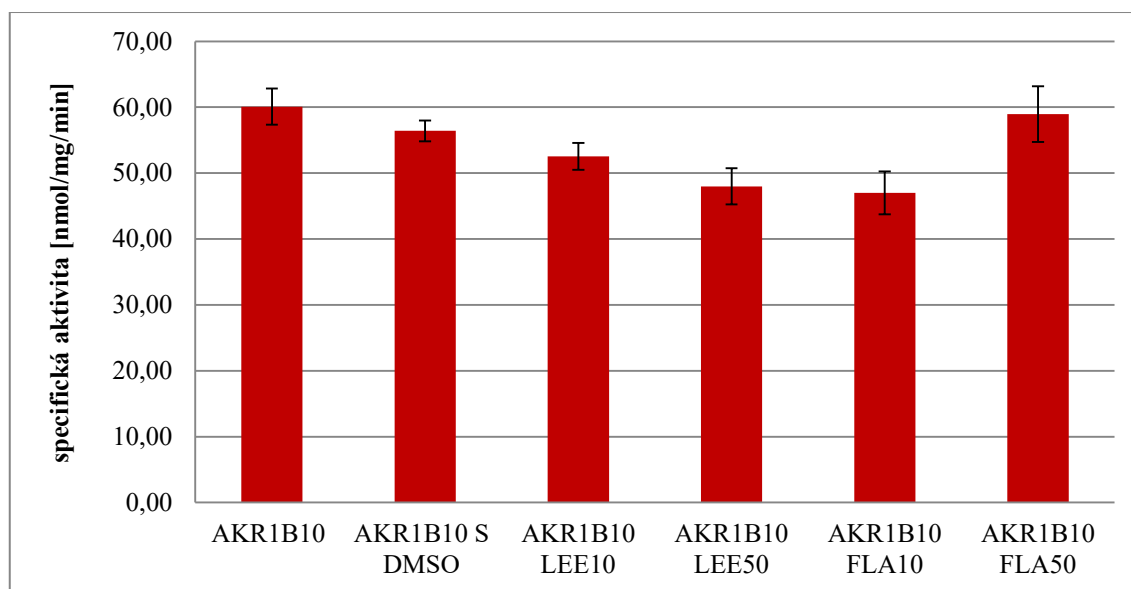
Obr. 25 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1B10 s inhibitory AZD5438 a DC

Inhibitor AZD5438 se projevuje poměrně vysokou účinností již při nízké koncentraci 10 μ M, a to přes 40 %. Ve vyšší 50 μ M koncentraci vykazuje inhibici vyšší než 60 %. Rovněž druhý inhibitor, dinacilib, vykazuje signifikantní inhibiční účinnost. Jeho schopnost inhibovat enzym AKR1B10 dosahuje téměř 30 % při koncentraci 50 μ M.

Tab. 14 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů LEE-011 a FLA

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1B10	60 ± 3	
AKR1B10 S DMSO	56 ± 2	0,00
AKR1B10 LEE10	53 ± 2	6,85
AKR1B10 LEE50	48 ± 3	14,93
AKR1B10 FLA10	47 ± 3	16,67
AKR1B10 FLA50	59 ± 4	-4,51

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



Obr. 26 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1B10 s inhibitory LEE-011 a FLA

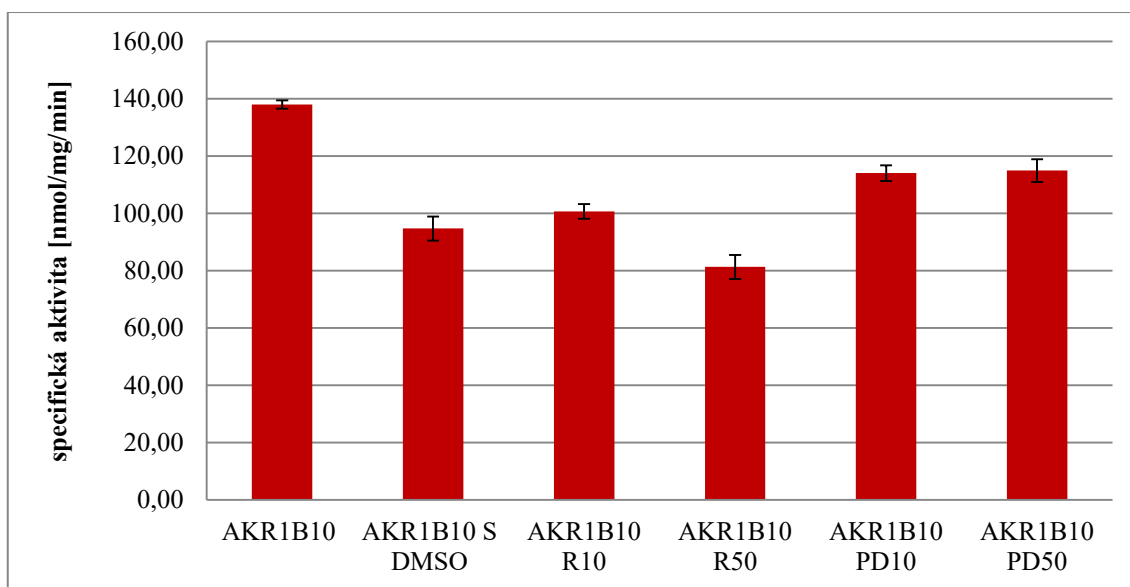
Podobně jako při screeningu inhibiční účinnosti flavopiridolu na AKR1A1, stejně tak i zde se projevila vyšší inhibice u nižší koncentrace inhibitoru. Příčinu této zvláštnosti neumíme vysvětlit.

Inhibiční účinnost jak LEE-011, tak FLA je téměř srovnatelná s jejich působením na AKR1A1, resp. zde je mírně vyšší.

Tab. 15 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a procentuální inhibice po přidání inhibitorů R547 a PD

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1B10	138 ± 1	
AKR1B10 S DMSO	95 ± 4	0,00
AKR1B10 R10	101 ± 3	-6,30
AKR1B10 R50	81 ± 4	14,16
AKR1B10 PD10	114 ± 3	17,34
AKR1B10 PD50	115 ± 4	16,72

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



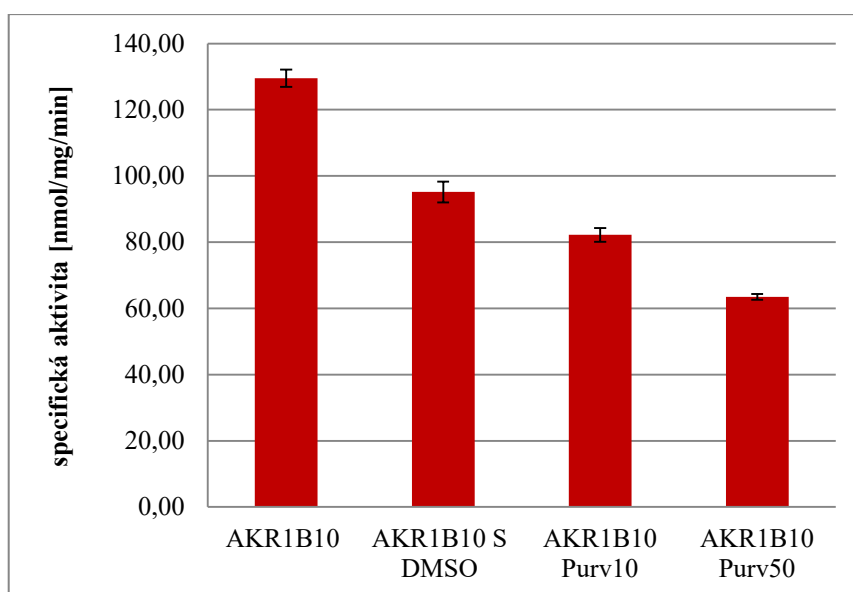
Obr. 27 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1B10 s inhibitory R547 a PD

Inhibice obou enzymů je signifikantní, ale relativně malá, tj. pohybuje se mezi 10 a 20 %.

Tab. 16 Hodnoty specifické aktivity enzymu AKR1B10 a procentuální inhibice po přidání inhibitoru purvalanolu A

enzym	specifická aktivita [nmol/mg/min] ^a	inhibice [%]
AKR1B10	130 ± 3	
AKR1B10 S DMSO	95 ± 3	0,00
AKR1B10 Purv10	82 ± 2	13,61
AKR1B10 Purv50	63 ± 1	33,29

^a aritmetický průměr z 3 měření ± směrodatná odchylka



Obr. 28 Graficky vyjádřené rozložení aktivity AKR1B10 s inhibitorem purvalanolem A

Inhibiční účinnost purvalanolu A je k AKR1B10 několikanásobně vyšší než k AKR1A1. Koncentrace 50 μ M vykazuje inhibici přes 30 %.

Tab. 17 Souhrn účinnosti inhibitorů o koncentraci 50 μM na AKR1B10, řazeno sestupně

AKR1B10	
inhibitor	inhibice [%]
AZD5438	62
Purv. A	33
SNS-032	30
DC	28
PD	17
LEE-011	15
R547	14
AT-7519	10
FLA	0

Z výše uvedeného je patrné, že nejlepší inhibiční účinek vykazuje jednoznačně AZD5438, tj. nad 60 %. Okolo 30 % pak účinkují inhibitory dinaciclib, purvalanol A a SNS-032.

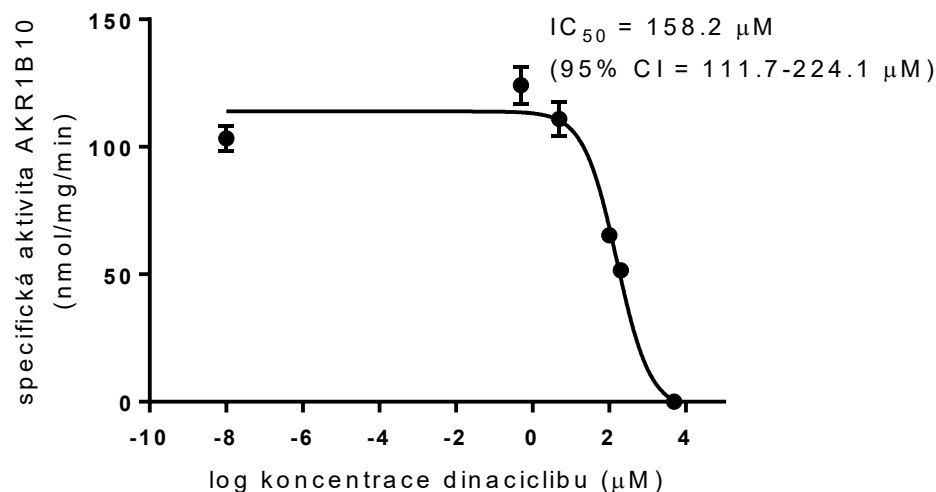
Celkově lze říci, že všechny inhibitory, s výjimkou flavopiridolu, působí na AKR1B10 mnohem lépe než na AKR1A1. Z toho důvodu byl pouze enzym AKR1B10 vybrán k dalšímu měření a ke stanovení inhibiční koncentrace.

Pokud výsledky opět porovnáme s těmi ze studie z roku 2013 (Cihalova et al.), zjistíme, že podobně jako u AKR1A1 flavopiridol nevykazuje na AKR1B10 žádnou inhibiční aktivitu. Naopak je tomu u SNS-032, který je jedním z nejsilnějších působících inhibitorů na tomto enzymu.

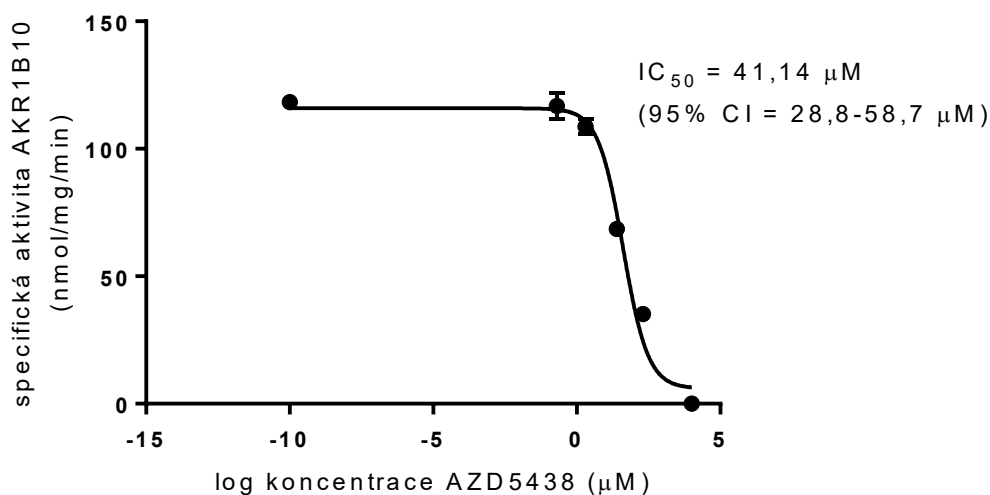
4.3 Stanovení IC_{50} vybraných inhibitorů na AKR1B10

Pro dva vybrané inhibitory, AZD a DC, které ve screeningu prokázaly jednu z nejvyšších hodnot inhibice, byly nadále stanoveny hodnoty IC_{50} .

Z již naměřených výsledků jsme odhadli přibližnou hodnotu IC_{50} , podle které byly následně navrženy koncentrace inhibitorů. Dinaciclib byl proměřen v koncentracích 0,5; 1; 5; 25; 75 a 200 μM a jeho výsledná hodnota IC_{50} byla rovna 158 μM . U AZD5438 byly použity koncentrace 2; 10; 25; 100 a 200 μM a výsledná hodnota IC_{50} odpovídala 41 μM .



Obr. 29 Graf stanovení IC_{50} dinaciclibu na enzymu AKR1B10



Obr. 30 Graf stanovení IC_{50} AZD5438 na enzymu AKR1B10

Z výše uvedeného vyplývá, že silnějším inhibitorem je tedy jednoznačně AZD5438.

U DC byla rovněž provedena studie zabývající se jeho vlivem na transportní proteiny ABCB1, ABCG2 a ABCC1 in vitro. Nejprve bylo potvrzeno, že DC je substrátem transportních proteinů ABCB1 a ABCG2. DC silně inhiboval eflux daunorubicinu způsobený proteinem ABCC1 ($EC_{50} = 18 \mu M$). (Cihalova et al. 2015b)

5 ZÁVĚR

Na závěr bych chtěla uvést, že se podařilo splnit všechny vytyčené cíle této práce. Při stanovování aktivity jednotlivých enzymů vůči daunorubicinu jako substrátu bylo zjištěno, že AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3 na tomto substrátu nepůsobí vůbec, naopak nejvíce aktivní byl jednoznačně enzym CBR1 následován AKR1C3, AKR1B10 a AKR1A1.

Nadále při screeningu účinků nové generace inhibitorů bylo zjištěno, že enzym AKR1A1 nepodléhá signifikantnímu působení žádného z testovaných inhibitorů. Opačné výsledky se však ukázaly u AKR1B10, kde AZD5438 způsobil inhibici 60 % a dále pak dinacilib, purvalanol A a SNS-032 vykazovaly inhibiční aktivitu kolem 30 %.

Díky tomu byly právě AZD5438 a dinacilib zvoleny pro podrobnější studii – určení hodnoty IC_{50} pro AKR1B10. Zjištěná hodnota IC_{50} u AZD5438 byla 41 μ M a u DC 158 μ M.

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že inhibitor AZD5438 by mohl mít díky svému příznivému vlivu na AKR1B10 in vitro potenciálně velký význam při léčbě nádorových onemocnění. Pro to je ale třeba dalších experimentů, kdy se z úrovně in vitro posuneme na úroveň buněčných linií, tedy ex vivo.

6 SEZNAM ZKRATEK

- 11 β -HSD – 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
- ABC – ATP-binding cassette
- AKR – aldo-keto reduktasy
- Asn – kyselina asparagová
- CBR1 – karbonylreduktasa 1
- CBR3 – karbonylreduktasa 3
- CDK – cyklin-dependentní kinasa
- CDKi – inhibitor cyklin-dependentních kinas
- CLL – chronická lymfocytární leukemie
- CRE – karbonyl redukující enzym
- DAU – daunorubicin
- DAU-OL – daunorubicinol
- DC – dinaciclib
- DHO – dihydrooracin
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DOX – doxorubicin
- DOX-OL – doxorubicinol
- FaF UK HK – Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
- FDA – Food and Drug Association
- FLA – flavopiridol
- IC₅₀ – inhibiční koncentrace
- LEE011 – ribociclib
- Lys – lysin
- MCL – lymfom z pláštěvých buněk
- MDCKII – Madin–Darby canine kidney
- MDR – mnohočetná léková rezistence (MultiDrug Resistance)

NADH – nikotinamidadeninukleotid

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát

NNK – nicotine-derived nitrosamine ketone

PD – palbociclib

Pgp – glykoprotein P

Rb – retinoblastom

RPM – otáčky za minutu

SDR – dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

Ser- serin

TAP – transporter of antigenic peptides

Tyr – tyrosin

UHPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie

v_{\max} – maximální rychlost reakce

7 LITERATURA

Abedin Z, Sen S, Field J, 2012, Aldo-keto reductases protect lung adenocarcinoma cells from the acute toxicity of B[a]P-7,8-trans-dihydrodiol. *Chem Res Toxicol.* 25 (1), 113-121

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C, 1969, Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 11 (6), 1101-1110

Balendiran GK, Martin HJ, El-Hawari Y, Maser E, 2008, Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chem Biol Interact.* 178 (1-3), 134-137

Bachur NR, Huffman DH, 1971, Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase. *Br J Pharmac.* 43, 828-833

Barski OL, Papusha VZ, Ivanova MM, Rudman DM, Finegold MJ, 2005, Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289 (1), 200-207

Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A, 2008, The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev.* 40 (4), 553-624

Biedler JL, Riehm H, 1970, Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30 (4), 1174-1184

Blachly JS, Byrd JC, Grever M, 2016, Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of chronic lymphocytis leukemia. *Semin Oncol.* 43 (2), 265-273

Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH, 1989, The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem.* 264 (16), 9547-9551

Boss DS, Schwartz GK, Middleton MR, Amakye DD, Swaisland H, Midgley RS, Ranson M, Danson S, Calvert H, Plummer R, Morris C, Carvajal RD, Chirieac LR, Schellens JH, Shapiro GI, 2010, Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamic of the oral cyclin-dependent kinase inhibitor AZD5438 when

administrated at intermittent and continuous dosing schedules in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol.* 21 (4), 884-894

Cao D, Fan ST, Chung SS, 1998, Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem.* 273 (19), 11429-11435

Criscitiello C, Viale G, Esposito A, Curigliano G, 2014, Dinaciclib for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig.* 23 (9), 1305-1312

Cihalova D, Hofman J, Ceckova M, Staud F, 2013, Purvalanol A, olomoucine II and roscovitine inhibit ABCB1 transporter and synergistically potentiate cytotoxic effects of daunorubicin in vitro. *PLoS One.* 8 (12)

Cihalova D, Staud F, Ceckova M, 2015a, Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AT-7519, flavopiridol and SNS-032 with ABCB1, ABCG2 and ABCC1 transporters and their potential to overcome multidrug resistance in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 76 (1), 105-116

Cihalova D, Ceckova M, Kucera R, Klimes J, Staud F, 2015b, Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro. *Biochem Pharmacol.* 98 (3), 465-472

DePinto W, Chu XJ, 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 (11), 2644-2658

Dickson MA, Schwartz GK, 2009, Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol.* 16 (2), 36-43

Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanj K, Gabbay KH, Kinoshita JH, Varma SD, Merola LO, 1973, Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science.* 182 (4117), 1146-1148

Dyck PJ, Zimmerman BR, Vilen TH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF, 1988, Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 319 (9), 542-548

Ebert B, Kisiela M, Wsol V, Maser E, 2011, Proteasome inhibitors MG-132 and bortezomib induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in human colon cancer cell lines SW-480 and HT-29. *Chem Biol Interact.* 191 (1-3), 239-249

Felsted R, Bachur NR, 1980, Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab Rev.* 11 (1), 1-60

Finn RS, Aleshin A, Slamon DJ, 2016, Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 18 (1), 17

Flynn J, Jones J, Johnson AJ, Andritsos L, Maddocks K, Jaglowski S, Hessler J, Grever MR, Im E, Zhou H, Zhu Y, Zhang D, Small K, Bannerji R, Byrd JC, 2015, Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 29 (7), 1524-1529

Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J, Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Hironaka M, Ishikawa Y, Niki T, Sohara Y, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H, Aburatani H, 2005, Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res.* 11 (5), 1776-1785

Gabbay KH, Merola LO, Field RA, 1966, Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science.* 151 (3707), 209-210

Gallego O, Belyaeva OV, Porte S, Ruiz FX, Stetsenko AV, Shabrova EV, Kostereva NV, Farres J, Pares X, Kedishvili NY, 2006, Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases, and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem J.* 399 (1), 101-109

Gojo I, Sadowska M, Walker A, Feldman EJ, Iyer SP, Baer MR, Sausville EA, Lapidus RG, Zhang D, Zhu Y, Jou YM, Poon J, Small K, Bannerji R, 2013, Clinical and laboratory studies of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in acute leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol.* 72, 897-908

Hanusova V, Tomsik P, Kriesfalusyova L, Pakostova A, Bousova I, Skalova L, 2013, In vivo effect of oracin on doxorubicin reduction, biodistribution and efficacy in Ehrlich tumor bearing mice. *Pharmacol Rep.* 65 (2), 445-452

Hartl J, Dolezal M, Miletin M, Opletalova V, Zimcik P, *Farmaceutická chemie IV.*, 1. vydání, 2006, ISBN 80-246-1169-4

Hofman J, Ahmadimoghaddam D, Hahnova L, Pavek P, Ceckova M, Staud F, 2012, Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 transporter in vitro and in situ and synergistically potentiate cytostatic effect of mitoxantrone. *Pharmacol Res.* 65 (3), 312-319

Hofman J, Skarka A, Havrankova J, Wsol V, 2015, Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochem Pharmacol.* 96 (3), 168-178

Hyndman DJ, Flynn TG, 1998, Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta.* 1399 (2-3), 198-202

Chen WD, Zhang Y, 2012, Regulation of aldo-keto reductases in human diseases. *Front Pharmacol.* 3, 35

Chen EX, Hotte S, Hirte H, Siu LL, Lyons J, Squires M, Lovell S, McIntosh L, Seymour L, 2014, A phase I study of cyclin-dependent kinase inhibitor, AT-7519, in patients with advanced cancer: NCIC Clinical Trials Group IND 177. *Br J Cancer.* 111, 2262-2267

Chen P, Lee NV, Hu W, Xu M, Ferre RA, Lam H, Bergqvist S, Solowiej J, Diehl W, He YA, Yu X, Nagata A, VanArsdale T, Murray BW, 2016, Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. *Mol Cancer Ther.* 15 (10), 2273-2281

Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, Chakraborty A, Matano A, Dobson JR, Crystal AS, Parasuraman S, Shapiro GI, 2016, A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res.* 22 (23), 5696-5705

- Jaspan J, Maselli R, Herold K, Bartkus C, 1983, Treatment of severely painful diabetic neuropathy with an aldose reductase inhibitor: relief of pain and improved somatic and autonomic nerve function. *Lancet*. 2 (8353), 758-762
- Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM, 1997, Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J*. 326, 625-636
- Jez JM, Penning TM, 2001, The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact*. 130-132 (1-3), 499-525
- Jörnvall H, Landreh M, Östberg LJ, 2015, Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem Biol Interact*. 234, 75-79
- Kallberg Y, Oppermann U, Persson B, 2010, Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J*. 277 (10), 2375-2386
- Kassner N, Huse K, Martin HJ, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, Brockmöller J, Klein K, Zanger UM, Maser E, Wojnowski L, 2008, Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver. *Drug Metab Dispos*. 36, 2113-2120
- Klener P, *Klinická onkologie*, 1. vydání, 2002, ISBN 80-7262-151-3
- Kufe DW, Holland JF, Frei E, *Cancer medicine*, 6. vydání, 2003, ISBN 1-55009-213-8
- Laffin B, Petrash JM, 2012, Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Front Pharmacol*. 3, 104
- Longley DB, Johnston PG, 2005, Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 205, 275-292
- Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ, 2009, Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol*. 11 (11), 1275-1276
- Mano Y, Suzuki K, Yamada K, Shimazono N, 1961, Enzymatic studies on TPN-L-hexonate dehydrogenase from rat liver. *J Biochem*. 49, 618-634

- Martin HJ, Breyer-Pfaff U, Wsol V, Venz S, Block S, Maser E, 2006, Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab Dispos.* 34 (3), 464-470
- Maser E, Völker B, Friebertshäuser J, 2002, 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: dimerization and enzyme cooperativity support its postulated role as glucocorticoid reductase. *Biochemistry.* 41 (7), 2459-2465
- Maser E, Wsol V, Martin HJ, 2006, 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: purification from human liver and characterization as carbonyl reductase of xenobiotics. *Mol Cell Endocrinol.* 248 (1-2), 34-37
- Matsunaga T, Shintani S, Hara A, 2006, Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21 (1), 1-18
- Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2009 2. díl*, monografie Daunorubicini hydrochloridum a Doxorubicini hydrochloridum, 1. vydání, 2009, ISBN 978-80-247-2994-7
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L, 2004, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 56 (2), 185-229
- Noskova V, Hajdich M, Mihal V, Cwjertka K, 2000, Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. *Klin Onkol.* 13 (2), 4-9
- Novotna R, Wsol V, Xiong G, Maser E, 2008, Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3. *Toxicol Lett.* 181 (1), 1-6
- Odermatt A, Nashev LG, 2010, The glucocorticoid-activating enzyme 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: physiological and toxicological considerations. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 119 (1-2), 1-13
- Oppermann UCT, Maser E, 2000, Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology.* 144 (1-3), 71-81
- Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M,

- Chen T, Kirschmeier P, Lees EM, 2010, Dinaciclib (SCH727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 9 (8), 2344-2353
- Penning TM, Jin Y, Steckelbroeck S, Rizner TL, Lewis M, 2004, Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Molecular Mol Cell Endocrinol.* 215 (1-2), 63-72
- Penning TM, 2015, The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact.* 234, 236-246
- Persson B, Krook M, Jörnvall H, 1991, Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem.* 200 (2), 537-543
- Persson B, Hedlung J, Jörnvall H, 2008, The MDR superfamily. *Cell Mol Life.* 65(24), 3879-3894
- Persson B, Bray JE, Bruford E, Dellaporta SL, Favia AD, Duarte RG, Jörnvall H, Kallberg Y, Kavanagh KL, Kedishvili N, Kisiela M, Maser E, Mindnich R, Orchard S, Penning TM, Thornton JM, Adamski J, Oppermann U, 2009, The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact.* 178 (1-3), 94-98
- Persson B, Kallberg Y, 2013, Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact.* 202 (1-3), 111-115
- Pilka ES, Niesen FH, Lee WH, El-Hawari Y, Dunford JE, Kochan G, Wsol V, Martin HJ, Maser E, Oppermann U, 2009, Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. *PLoS One.* 4 (10), 7113
- Puchnerova V, Novakova Z, Wilhelm Z, 2016, Antracykliny – kardiotoxicita a kardioprotekce – se zaměřením na mechanismus účinku. *Interv Akut Kardiol.* 15 (2), 102-105
- Puma N, Ruggiero A, Ridola V, Maurizi P, Lazzareschi I, Attina G, Mastrangelo S, De Rosa G, Riccardi R, 2008, Anthracycline-related cardiotoxicity: risk factors and therapeutic options in childhood cancers. *Signa Vitae.* 3 (1), 30-34

Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Aggarwal BB, Srivastava SK, 2002, Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 277 (35), 32063-32070

Reddy CC, Swan JS, Hamilton GA, 1981, Myo-inositol oxygenase from hog kidney. I. purification and characterization of the oxygenase and of an enzyme complex containing the oxygenase and D-glucuronate reductase. *J Biol Chem.* 256 (16), 8510-8518

Rosemond MJ, Walsh JS, 2004, Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metab Rev.* 36 (2), 335-361

Seeber S, Osieka R, Schmidt CG, Achterrath W, Crooke ST, 1982, In vivo resistance towards anthracyclines, etoposide, and cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 42 (11), 4719-4725

Seftel MD, Kuruvilla J, Kouroukis T, Banerji V, Fraser G, Crump M, Kumar R, Chalchal HI, Salim M, Laister RC, Crocker S, Gibson SB, Toguchi M, Lyons JF, Xu H, Powers J, Sederias J, Seymour L, Hay AE, 2017, The CDK inhibitor AT519M in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) and mantle cell lymphoma. A phase II study of the Canadian Cancer Trials Group. *Leuk Lymphoma.* 58 (6), 1358-1356

Sheng X, Parmentier JH, Tucci J, Pei H, Cortez-Toledo O, Dieli-Conwright CM, Oberley MJ, Neely M, Orgel E, Louie SG, Mittelman SD, 2017, Adipocytes sequester and metabolize the chemotherapeutic daunorubicin. *Mol Cancer Res.* 15 (12), 1704-1713

Sima AA, Bril V, Nathaniel V, McEwen TA, Brown MB, Lattimer SA, Greene DA, 1988, Regeneration and repair of myelinated fibers in sural-nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil. *N Engl J Med.* 319 (9), 548-555

Skarka A, Skarydova L, Strabergova H, Wsol V, 2011, Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chem Biol Interact.* 191 (1-3), 66-74

- Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK, Ansari NH, 1995, Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 217 (3), 741-746
- Srivastava S, Spite M, Trent JO, West MB, Ahmed Y, Bhatnagar A, 2004, Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids. *J Biol Chem.* 279 (51), 53395-53406
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA, 1967, Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer.* 20 (3), 333-353
- Tong WG, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey D, Badros AZ, Popplewel L, Coutre S, Fox JA, Mahadocon K, Chen T, Kegley P, Hoch U, Wierda WG, 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 AM, Redeuilh G, Mester J, 2002, Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *Int J Cancer.* 97, 761-769
- Wang R, Wang Gricard MJ, Ferris B, Strulovici-Barel Y, Salit J, Hackett NR, Gudas LJ, Crystal RG, 2010, Smoking-induced upregulation of AKR1B10 expression in the airway epithelium of healthy individuals. *Chest.* 138 (6), 1402-1410
- Wermuth B, Monder C, 1983, Aldose and aldehyde reductase exhibit isocorticosteroid reductase activity. *Eur J Biochem.* 131 (2), 423-426
- Wsol V, Szotakova B, Martin HJ, Maser E, 2007, Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. *Toxicology.* 238 (2-3), 111-118
- Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Iwanari H, Watanabe A, Aburatani H, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T, Araki Y, 2007, Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 17 (6), 1300-1306

Zemanova L, Hofman J, Novotna E, Musilek K, Lundova T, Havrankova J, Hostalkova A, Chlebek J, Cahlikova L, Wsol V, 2015, Flavones inhibit the activity of AKR1B10, a promising therapeutic target for cancer treatment. J Nat Prod. 78 (11), 2666-2674

Internet 1: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Internet 2: <https://www.med.upenn.edu/akr/members.html>

Internet 3: <https://sdr-enzymes.org>

Internet 4: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02684617>

Internet 5: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01676753>

Internet 6: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01434316>

Internet 7: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-kisqalir-ribociclib-receives-eu-approval-first-line-treatment-hrher2>

Internet 8: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03220178>

Internet 9: <https://en.wikipedia.org/wiki/IC50>