

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Studium vlivu tirabrutinibu na aktivitu enzymů účastnících se  
anthracyklinové rezistence v nádorové terapii

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Magdaléna Kašparová**  
Osobní číslo: **C20452**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Studium vlivu tirabrutinibu na aktivitu enzymů účastnících se anthracyklinové rezistence v nádorové terapii**  
Téma práce anglicky: **The Study Of An Influence Of Tirabrutinib On The Activity Of Enzymes Involved In The Anthracycline Resistance In Oncotherapy**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- Enzymy z nadrodiny AKR a SDR
- Anthracyklinová antibiotika – použití, kardiotoxicita
- Biotransformace xenobiotik – zapojení enzymů, vznik rezistence
- Inhibitory – zaměření na inhibitor tirabrutinib – struktura, použití

### Experimentální část:

- *In vitro* inkubace rekombinantních lidských enzymů z nadrodiny AKR a SDR s inhibitorem tirabrutinibem
- Po základním skríningu výběr enzymu/enzymů s nejvýznamnější inhibicí
- Následně stanovení hodnoty  $IC_{50}$ , inhibiční konstanty a typu inhibice
- Zpracování naměřených dat v programu Graph Pad, sestavení příslušných grafů a vyhodnocení výsledků

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
dle pokynů vedoucího/konzultanta

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Lenka Laštovičková**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Studium vlivu tirabrutinibu na aktivitu enzymů účastnících se anthracyklinové rezistence v nádorové terapii jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5.5. 2022

Bc. Magdaléna Kašparová v.r.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce, Mgr. Kataríně Svrčkové, Ph.D., která mi poskytla možnost spolupracovat s Univerzitou Karlovou a podílet se na probíhajících výzkumných aktivitách. Děkuji za konzultace, trpělivost a cennou zpětnou vazbu při psaní této práce. Děkuji také Mgr. Lence Laštovičkové za poskytnutí podkladů a materiálů k experimentům, za vysvětlení postupů práce v laboratoři, za věnovaný čas, trpělivost a ochotu při řešení problémů.

## **ANOTACE**

Přeměna aktivního cytostatika na jeho méně aktivní metabolit – sekundární alkohol, je jedním z důvodů vzniku anthracyklinové rezistence v nádorové terapii. Tohoto procesu se nejčastěji účastní karbonylredukující enzymy, hlavně z nadrodiny aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem. Proto je aktuální tematikou inhibice těchto enzymů, a tím zvýšení účinnosti anthracyklinů v protinádorové terapii. V této diplomové práci byl zkoumán vliv inhibitoru tirabrutinibu na vybrané lidské karbonylredukující enzymy *in vitro* ve spojení s cytostatikem daunorubicinem.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

anthracyklinová antibiotika; karbonylredukující enzymy; daunorubicin; tirabrutinib; rezistence; kardiotoxicita

## **TITLE**

The Study Of An Influence Of Tirabrutinib On The Activity Of Enzymes Involved In The Anthracycline Resistance In Oncotherapy

## **ANNOTATION**

The conversion of active cytostatic drug to less active metabolite, secondary alcohol, is one of the reasons of development of anthracycline resistance in oncotherapy. Most often carbonyl reducing enzymes are involved in this process, mainly from aldo-ketoreductase and short-chain dehydrogenase/reductase superfamilies. Therefore, the inhibition of above-mentioned enzymes and thereby increase of anthracyclines efficiency in therapy is a very actual topic. In this work the influence of the inhibitor tirabrutinib on human carbonyl reducing enzymes converting daunorubicin *in vitro* was evaluated.

## **KEYWORDS**

anthracycline antibiotics; carbonyl reducing enzymes; daunorubicin; tirabrutinib; resistance; cardiotoxicity

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| ÚVOD .....   | 12 |
| 1 Teoretická část.....   | 13 |
| 1.1 Anthracyklinová antibiotika.....                             | 13 |
| 1.1.1 Chemická struktura anthracyklinů .....                     | 13 |
| 1.1.2 Mechanismus účinku a metabolismus anthracyklinů .....      | 14 |
| 1.1.3 Kardiotoxicita .....                                       | 16 |
| 1.1.4 Rezistence nádorových buněk k anthracyklinům.....          | 18 |
| 1.2 Daunorubicin.....  | 18 |
| 1.3 Karbonylredukující enzymy.....                               | 19 |
| 1.3.1 Aldo-ketoreduktasy .....                                   | 20 |
| 1.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkými řetězci .....           | 23 |
| 1.4 Inhibice karbonyl redukujících enzymů.....                   | 25 |
| 1.4.1 Inhibice kompetitivní .....                                | 25 |
| 1.4.2 Inhibice nekompetitivní .....                              | 26 |
| 1.4.3 Inhibice akompetitivní .....                               | 27 |
| 1.5 Brutonova thyrosinkinasa.....                                | 28 |
| 1.5.1 Tirabrutinib .....   | 28 |
| 2 Cíl práce.....   | 30 |
| 3 Experimentální část .....                                      | 31 |
| 3.1 Materiály .....  | 31 |
| 3.1.1 Chemikálie .....   | 31 |
| 3.1.2 Pomůcky a přístrojové vybavení.....                        | 31 |
| 3.2 Příprava roztoků .....                                       | 32 |
| 3.3 <i>In vitro</i> inkubace .....                               | 34 |
| 3.3.1 Základní screening .....                                   | 34 |
| 3.3.2 Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace .....              | 35 |
| 3.3.3 Stanovení inhibiční konstanty a určení typu inhibice ..... | 35 |
| 3.4 UHPLC analýza .....  | 36 |
| 4 Výsledky a diskuze.....  | 39 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.1 | Základní screening .....                      | 39 |
| 4.2 | Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace ..... | 44 |
| 4.3 | Typ inhibice .....                            | 46 |
| 5   | Závěr.....                                    | 51 |
|     | SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ .....              | 52 |



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

|   |    |
|---|----|
| <b>Obrázek 1</b> Chemická struktura klinicky významných anthracyklinů.....  | 14 |
| <b>Obrázek 2</b> Metabolismus anthracyklinů.....  | 16 |
| <b>Obrázek 3</b> Metabolické determinanty anthracyklinové kardiotoxicity .....  | 17 |
| <b>Obrázek 4</b> NAD(P)H-dependentní redukce daunorubicinu na daunorubicinol .....  | 19 |
| <b>Obrázek 5</b> Schéma struktury enzymu z nadrodiny aldo-ketoreduktas .....  | 21 |
| <b>Obrázek 6</b> Vzájemně se vylučující vazebné události mezi substrátem (S) a inhibitorem (I)..                            | 26 |
| <b>Obrázek 7</b> Příklady nekompetitivní inhibice .....   | 27 |
| <b>Obrázek 8</b> Příklad akompetitivní inhibice, kde se I váže pouze v přítomnosti S.....                                   | 27 |
| <b>Obrázek 9</b> Strukturní vzorec tirabrutinibu.....   | 29 |
| <b>Obrázek 10</b> Záznam chromatogramu, vzorek z in vitro inkubace (DMSO kontrola) .....                                    | 37 |
| <b>Obrázek 11</b> Záznam chromatografické analýzy .....   | 38 |
| <b>Obrázek 12</b> Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1C3.....   | 40 |
| <b>Obrázek 13</b> Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1B1.....   | 41 |
| <b>Obrázek 14</b> Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1B10.....  | 41 |
| <b>Obrázek 15</b> Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1A1 .....  | 42 |
| <b>Obrázek 16</b> Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu CBR1 .....  | 42 |
| <b>Obrázek 17</b> Závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na logaritmické koncentraci TIR .....                         | 45 |
| <b>Obrázek 18</b> Grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN.....            | 48 |
| <b>Obrázek 19</b> Reciproké grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN ..... | 48 |
| <b>Obrázek 20</b> Grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN.....            | 49 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Obrázek 21</b> Reciproké grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN .....       | 49 |
| <b>Tabulka 1</b> Složení regeneračního systému pro 1 reakci .....   | 33 |
| <b>Tabulka 2</b> Složení reakční směsi pro in vitro inkubaci .....  | 34 |
| <b>Tabulka 3</b> Parametry měření UHPLC analýzy .....   | 36 |
| <b>Tabulka 4</b> Parametry automatické integrace na HPLC .....  | 36 |
| <b>Tabulka 5</b> Průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu a průměrné hodnoty inhibiční aktivity tirabrutinibu .....            | 43 |
| <b>Tabulka 6</b> Příklady inhibitorů a jejich hodnota $IC_{50}$ .....   | 45 |
| <b>Tabulka 7</b> Hodnoty Michaelisovy konstanty, maximální rychlosti reakce a inhibiční konstanty pro různé koncentrace TIR ..... | 46 |

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

|                  |  |
|------------------|--|
| AKR              | aldo-ketoreduktasy   |
| ALL              | akutní lymfoblastická leukémie   |
| AML              | akutní myeloblastická leukémie   |
| BCR              | B-celulární receptor   |
| BTK              | Brutonova thyrosinkinasa   |
| CBR              | karbonylreduktasa (z angl. Carbonyl Reductase)   |
| CLL              | chronická lymfoblastická leukémie  |
| CNS              | centrální nervový systém   |
| CRE              | karbonylredukující enzymy (z angl. Carbonyl Reducing Enzymes)                                      |
| DAUN             | daunorubicin   |
| DMSO             | dimethylsulfoxid   |
| DNA              | deoxyribonukleová kyselina   |
| GIT              | gastrointestinální trakt   |
| IC <sub>50</sub> | inhibiční koncentrace (inhibice z 50 %)  |
| K <sub>i</sub>   | inhibiční konstanta  |
| K <sub>m</sub>   | Michaelisova konstanta   |
| KPB              | draselno-fosfátový pufr  |
| MDR              | dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhými řetězci (z angl. Medium-chain Dehydrogenases/Reductas) |
| NADPH            | nikotinamidadenindinukleotidfosfát   |
| NaPB             | sodno-fosfátový pufr   |
| ROS              | reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)  |
| SDR              | dehydrogenasy/reduktasy s krátkými řetězci (z angl. Short-chain Dehydrogenases/Reductases)         |
| TIR              | tirabrutinib   |
| V <sub>max</sub> | maximální rychlost reakce  |

## ÚVOD

V současné době jsou onkologická onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí na světě. Proto je důležitá včasná diagnostika a následná léčba. K léčbě řady nádorových onemocnění se využívají anthracyklinová antibiotika. Doxorubicin, daunorubicin a idarubicin jsou nejčastěji používané anthracykliny, které jsou v lidském těle redukovány pomocí karbonylredukujících enzymů z nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3) a z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (CBR1) na sekundární alkoholy. Tyto sekundární alkoholy mají nižší účinek v nádorových buňkách a mohou být příčinou vzniku kardiotoxicity. Zmíněné enzymy mají často zvýšenou expresi v nádorových buňkách. (Edwardson et al. 2015)

Dalším nežádoucím účinkem v léčbě nádorových onemocnění pomocí anthracyklinů je rozvoj léková rezistence nádorových buněk. Snahou vědeckých výzkumů je najít způsoby nové léčby a odstranění příčin nežádoucích účinků terapie. Možností ovlivnění rezistence je řada. Jedna z možností je kombinace s jinou vhodnou látkou, která doplní účinek. (Marinello a kol. 2018)

V jiném případě se může využít podání anthracyklinových antibiotik spolu s inhibítozem, který slouží k inhibici karbonylredukujících enzymů a ke snížení metabolické přeměny anthracyklinů, a tudíž ke snížení kardiotoxicity. (Burger 2019)

V této diplomové práci byly testovány účinky inhibitoru Brutonovy tyrosinkinasy tirabrutinibu na enzymy z nadrodiny AKR a SDR *in vitro* a zda by tyto účinky byly kladně využitelné při léčbě nádorových onemocnění anthracyklinovým antibiotikem daunorubicinem.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Anthracyklinová antibiotika

Anthracykliny se řadí do podskupiny protinádorových antibiotik. V onkologii jsou anthracykliny využívány k léčbě solidních tumorů a hematologických malignit, jako například karcinomu prsu, endometriosu, rakoviny močového měchýře a také Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu, akutní myeloblastické a lymfoblastické leukémie. První izolace proběhla v 60. letech 20. století z bakterie *Streptomyces*. Jednalo se o doxorubicin a jeho prekurzor daunorubicin. Pro zlepšení protinádorové aktivity a snížení toxicity byly vytvořeny semisyntetické deriváty – idarubicin; jedná se o lipofilnější derivát daunorubicinu a epirubicin, který je stereoisomerem doxorubicinu. (Hortobágyi a kol. 1997, Minotti a kol. 2004)

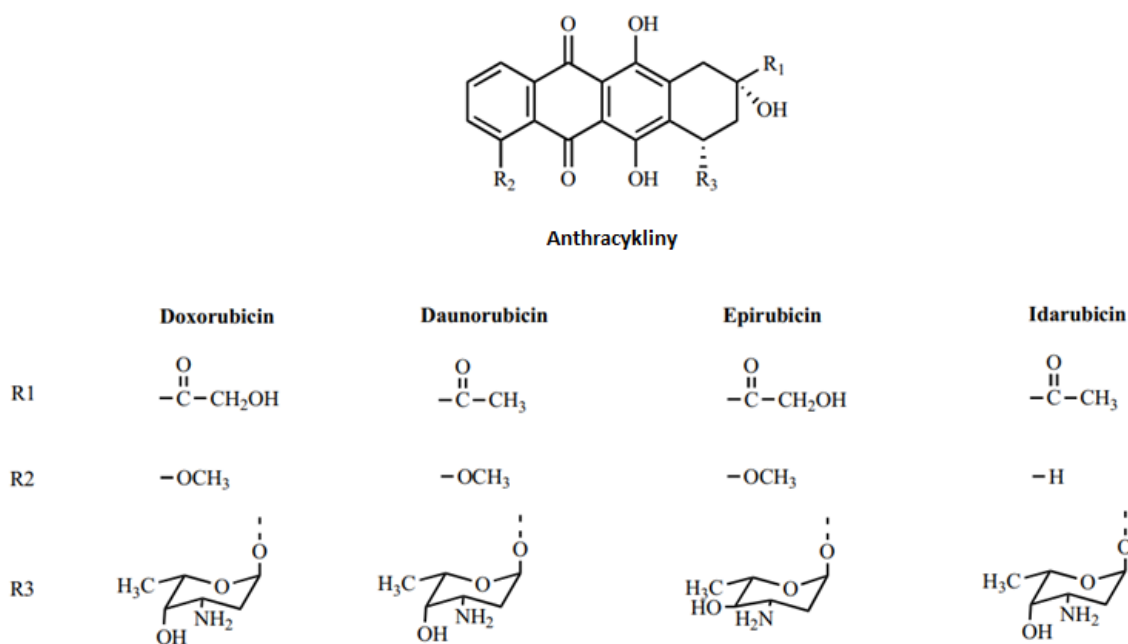
Podávání anthracyklinů probíhá pouze parenterálně až na idarubicin, který lze podávat i perorálně. Idarubicin se od daunorubicinu liší chybějící methoxy skupinou na čtvrtém uhlíku. Tím se zvyšuje lipofilita, dochází k delšímu poločasu přeměny cytostatika, a také dochází ke snadnější kumulaci v buňkách a vyšší cytotoxicitě. Antibiotika jsou metabolizována v játrech a dále vylučována žlučí, částečně i močí. (McGowan a kol. 2017)

Mezi časté nežádoucí účinky anthracyklinů se řadí zvracení, mukositida, alopecie, myelosuprese, nauzea, stomatitida. I když se jedná o účinná cytostatika, hlavním nežádoucím účinkem je kardiotoxicita; nepříznivě působí na srdeční sval. Jde o kumulativní kardiotoxicitu, která je závislá na podané dávce cytostatika. Maximální doporučená kumulativní dávka daunorubicinu je 550 mg/m<sup>2</sup>, u doxorubicinu se jedná o rozmezí 450-550 mg/m<sup>2</sup>. Epirubicin má delší biologický poločas a větší distribuční objem než doxorubicin a je snadněji glukuronován než doxorubicin, díky čemuž je jeho kumulativní dávka 900-1000 mg/m<sup>2</sup>. Také záleží na kardiovaskulární mortalitě a morbiditě. (Edwardson a kol. 2015, Minotti a kol. 2004)

### 1.1.1 Chemická struktura anthracyklinů

Jedná se o planární molekuly skládající se ze stabilního hydrofobního tetracyklinového kruhu s přilehlými chinonovými a hydrochinonovými substitucemi. Na uhlíku sedm je glykosidickou vazbou připojen daunosamin. Daunorubicin a doxorubicin patří mezi nejúčinnější antineoplastická činidla, která se používají při léčbě rakovin. Ačkoli se daunorubicin od doxorubicinu liší jedinou hydroxylovou skupinou na postranním řetězci,

dává tato změna významnou roli v účinnosti léčiva. Doxorubicin se využívá při léčbě solidních tumorů a sarkomů měkkých tkání. Daunorubicin je účinný v léčbě akutní myeloblastické a lymfoblastické leukemii (Edwardson a kol. 2015). Chemická struktura těchto klinicky významných anthracyklinů je znázorněna na Obrázku 1. (McGowan a kol. 2017, Minotti a kol. 2004)



**Obrázek 1** Chemická struktura klinicky významných anthracyklinů (upraveno dle Mordente a kol. 2009)

### 1.1.2 Mechanismus účinku a metabolismus anthracyklinů

Mechanismus, kterým vstupují anthracykliny do buněk, stále není zcela znám, ale předpokládá se, že zahrnuje jejich pasivní difúzi plazmatickou membránou, po které následuje jejich selektivní transport do jádra vazbou na proteazomy. Jakmile jsou anthracykliny v jádře, disociují se z proteazomů a vážou se na DNA díky své vyšší afinitě k druhé makromolekule. Anthracykliny inhibují proliferaci rychle se dělících buněk díky mnoha mechanismům. Mají schopnost interkalovat a zesítovat řetězce DNA a inhibovat topoisomerasu II. Tím mohou i blokovat replikaci a transkripci DNA. Dále schopnost anthracyklinů generovat vysoce reaktivní volné radikály může vést k rozsáhlému poškození DNA a plazmatické membrány oxidací lipidů. Na druhou stranu se anthracykliny hromadí i v jiných tkáních (játra, srdce, kostní dřeň), což přispívá k jejich systémovým toxickým vedlejším účinkům. Přibližně 50 %

anthracyklinů je vyloučeno z těla bez změny jeho struktury, zatímco zbytek léčiva je zpracován různými metabolickými drahami. (Edwardson a kol. 2015)

Anthracykliny patří mezi interkalační látky a díky své planární struktuře se vmezeří mezi sousední páry bází v DNA. Významnou roli během interkalace hraje volná aminoskupina na daunosaminu. Aminoskupina se naváže na cytosin v DNA vodíkovými vazbami a vytvoří stabilní komplex. To způsobuje deformaci DNA a inhibuje replikaci i transkripci. (Gewirtz 1999)

Anthracykliny se řadí mezi inhibitory topoisomerasy II. Topoisomerasa je enzym, který je důležitý při replikaci DNA. Jeho funkcí je rozštěpovat a následně správně spojit jednotlivá vlákna DNA tak, aby nedocházelo k chybnému spojení. U lidí se vyskytují dva druhy topoisomerasy II – topoisomerasa II $\alpha$  a topoisomerasa II $\beta$ . Zatímco se topoisomerasa II $\beta$  vyskytuje u všech buněk, topoisomerasa II $\alpha$  se převážně vyskytuje u proliferujících buněk. Inhibicí topoisomerasy II pomocí anthracyklinů dochází k tvorbě zlomů u DNA, a tím se zabrání další replikaci buněk. (Vejpangsa a kol. 2014)

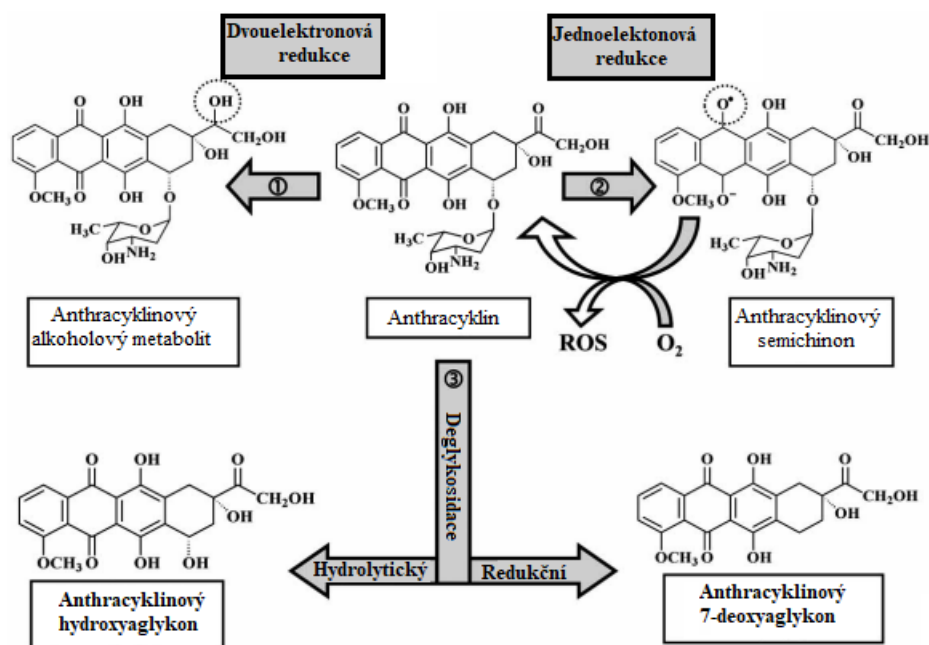
Anthracykliny se metabolizují na více různých metabolitů. Hlavní metabolickou přeměnou anthracyklinů je dvouelektronová redukce. Jedná se o redukci karbonylové skupiny C-13 a vede k tvorbě sekundárních alkoholů. Dochází k ní pomocí NAPDH-dependentních karbonyl redukujících enzymů, především nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci (SDR) (viz kapitola 1.3). K hydroxylaci dochází ve všech buňkách. Kvůli své akumulaci v srdeční tkáni jsou toxické pro srdce. (Bains a kol. 2010, Megias-Vericat a kol. 2018)

Další možná metabolizace anthracyklinů je jendoelektronová redukce. Chinonová skupina obsažená ve struktuře anthracyklinů je redukována na semichinon prostřednictvím cytosolických enzymů (oxidoreduktasy – cytochrom P450-reduktasa, NADH-dehydrogenasa, xantinoxidasa). Semichinon se stává donorem elektronu pro kyslík, a tím dále vzniká vysoce reaktivní superoxidový aniont, který může být dále přeměněn na vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS), kterými může být peroxid vodíku nebo hydroxylový radikál. Působením nadměrného množství ROS je vyvolán oxidační stres. Reakce ROS s nukleovými kyselinami, lipidy a proteiny způsobuje poškození DNA a peroxidaci lipidů, které tvoří buněčné membrány. Toto může vést až k apoptóze buněk. (Megias-Vericat a kol. 2018, Minotti a kol. 2004)

Tvorba ROS je také zajištěna intracelulárním železem, které je schopné vytvářet s chinonovým aglykonem komplex. Anthracyklin-železnatý komplex je za přítomnosti kyslíku oxidován a vzniká peroxid vodíku nebo superoxidový radikál a dále i hydroxylový radikál. Dochází k poškození membrány buněk. (Minotti a kol. 2004)

Dalšími metabolity mohou být neaktivní deoxyaglykony, které vznikají deglykosidací za anaerobních podmínek (Mordente a kol. 2019).

Tři hlavní metabolické dráhy anthracyklinů jsou znázorněny na Obrázku 2.



**Obrázek 2** Metabolismus anthracyklinů (upraveno dle Mordente a kol. 2009)

### 1.1.3 Kardiotoxicita

Kardiotoxicita je obávaný vedlejší účinek, který může omezit klinické využití anthracyklinů. Kardiotoxicita vyvolaná anthracykliny je pravděpodobně kontinuální jev, který začíná poškozením myokardiálních buněk, následuje ejekční frakce levé komory a může vést až k srdečnímu selhání. Riziko srdečního selhání vyvolaného anthracykliny se zvyšuje s rostoucí podanou kumulativní dávkou. (Cardinale a kol. 2020, Henriksen a kol. 2017)

Kardiotoxicita se může dělit do několika kategorií; akutní, subakutní a chronická. Akutní kardiotoxicita může být reverzibilní, nastane po podání jedné dávky a projeví se do 14 dnů od ukončení léčby. Subakutní kardiotoxicita je irreverzibilní a vyskytuje se do jednoho roku od ukončení léčby. Poslední, chronická, se vyvíjí roky po ukončení léčby a může vést k selhání srdce. (Cardinale a kol. 2020)

Specifické mechanismy anthracyklinové kardiotoxicity zůstávají stále nejasné. Potenciálním mechanismem je tvorba ROS (Cardinale a kol. 2020). Mnoho tkání obsahuje enzymy pohlcující volné radikály, a tím zabraňují nebo omezují poškození tkání. Tkáň

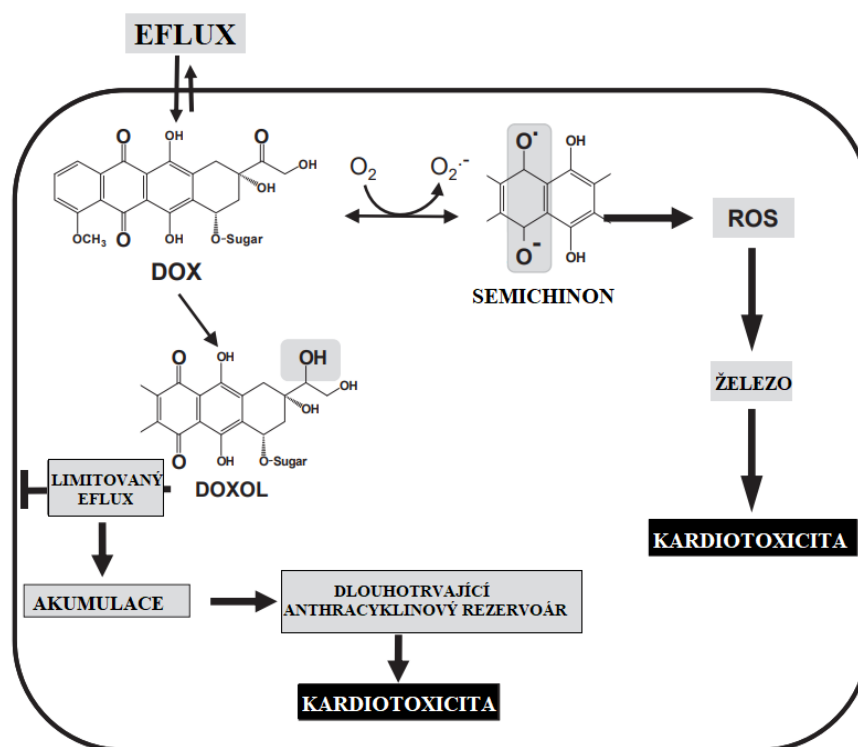


myokardu obsahuje nízkou koncentraci ochranných antioxidačních enzymů (např. glutathionperoxidasa), a proto je náchylná k poškození volnými radikály. Avšak většina studií prokázala, že vliv volných kyslíkových radikálů má za následek supraterapeutické dávky anthracyklinů. (DeGraff a kol. 1994, Hortobágyi a kol. 1997, Menna & Salvatorelli 2017)

Na kardiotoxicitě se pravděpodobně podílí i inhibice topoisomerasy II  $\beta$  anthracykliny, jelikož dochází ke dvojitým zlomům u DNA a k poškození kardiomyocytů (Vejpongsa a kol. 2014).

Další příčinou vzniku kardiotoxicity je biotransformace daunorubicinu nebo doxorubicinu na sekundární alkohol daunorubicinol (resp. doxorubicinol), který se kumuluje převážně v srdeční tkáni (Zhang a kol. 2016).

Na Obrázku 3 jsou znázorněny metabolické determinanty anthracyklinové kardiotoxicity. Jednoelektronové redoxní cyklické chinonové skupiny vytváří semichinon, který přeměňuje kyslík na ROS. Další reakce ROS se železem se podílejí na vývoji kardiotoxicity. Dvouelektronová redukce karbonylové skupiny postranního řetězce vytváří sekundární alkoholový metabolit. Narozdíl od původních anthracyklinů vykazuje velmi omezený buněčný eflux a akumuluje se za vzniku dlouhotrvajícího anthracyklinového rezervoáru, který se také podílí na kardiotoxicitě. (Menna & Salvatorelli 2017)



**Obrázek 3** Metabolické determinanty anthracyklinové kardiotoxicity (upraveno dle Menna a kol. 2017)

Dále mohou hrát roli i další faktory, a to například věk pacienta, předchozí či současné ozáření hrudníku, či již existující srdeční onemocnění. Tyto faktory vedou ke zvýšenému riziku kardiotoxicity. Riziko kardiotoxicity se může zvýšit také požitím dalšího chemoterapeutika, zejména trastuzumabu, který je velmi účinný při léčbě rakoviny prsu. (Cardinale a kol. 2020)

#### **1.1.4 Rezistence nádorových buněk k anthracyklinům**

Častou příčinou neúspěšné léčby je zvýšená schopnost nádorových buněk odolat účinkům cytotoxických látek. Léková rezistence stojí až za 90 % úmrtí pacientů podrobujících se léčbě. Maligní buněčné populace mohou mít přirozenou rezistenci nebo mohou získat rezistenci v průběhu léčby. V případě přirozené rezistence jsou nádorové buňky již odolné vůči cytostatiku ještě před jejich podáním. Získaná rezistence nastává až v průběhu léčby, kdy se stává z původně citlivé buňky rezistentní a účinnost cytostatika se prudce snižuje. Rezistence u nádorových buněk na anthracyklinová antibiotika je multifaktoriální. Může nastat i křížová rezistence, když dojde ke ztrátě citlivosti k jednomu přípravku a současně dojde k rezistenci strukturně podobnému cytostatiku. A pokud se cytostatika liší nejen strukturně, ale i mechanicky, jedná se o mnohočetnou rezistenci. Příčinou vzniku multirezistence může být například zvýšená exprese fosfoproteinu v buněčné membráně. Jedná se o glykoprotein P patřící do rodiny ABC transportérů (ATP-Binding Casette). ABC transportéry jsou proteiny, které transportují léčiva ven z buňky, a tím snižují jejich intracelulární koncentraci a snižují tak jejich terapeutickou koncentraci. (Dönmez a Gündüz 2011)

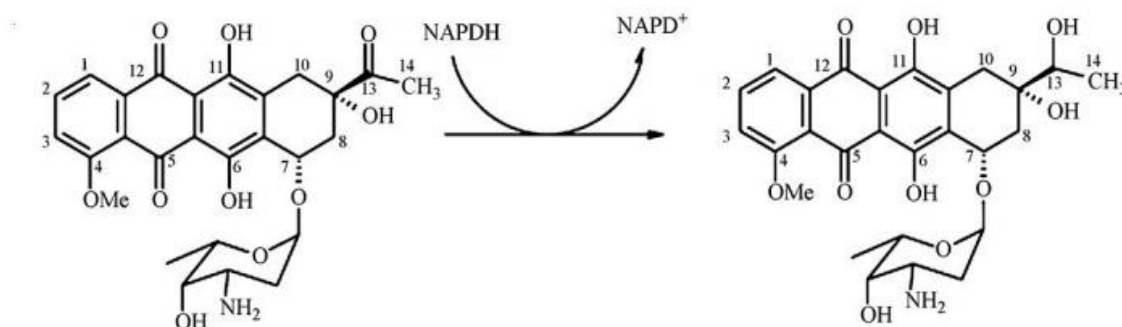
Snížení účinku léčby pomocí anthracyklinů může být dále způsobeno zvýšenou metabolickou přeměnou. U mnoha typů nádorových onemocnění byla prokázána vyšší exprese karbonyl redukujících enzymů, které katalyzují redukci anthracyklinů na jejich sekundární alkoholy. Anthracyklinreduktasy jsou často ve větší míře exprimovány u pacientů se špatnou prognózou nebo s pokročilým stádiem rakoviny. (Matsunaga a kol. 2012)

## **1.2 Daunorubicin**

Daunorubicin je první identifikované antineoplastické činidlo ze skupiny anthracyklinů využívané především k léčbě různých rakovin, zejména leukémií. Lze jej použít k léčbě akutních myeloidních, promyelocytárních a erytroidních leukémií u dospělých a akutních lymfocytárních leukémií u dětí a dospělých. Daunorubicin se také využívá jako lék první volby k léčbě Kaposiho sarkomu u pacientů trpících pokročilým syndromem viru lidské

imunodeficiencie (HIV). Jedná se o červenooranžový krystalický prášek, který je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu a téměř nerozpustný v acetonu. Molekulová hmotnost daunorubicinu činí 563,99 g/mol. Do těla je vpraven intravenózně. Vedlejšími účinky tohoto cytostatika jsou útlum kostní dřeně a kardiotoxicita. Kardiotoxicita je závislá na kumulativní dávce, která se pohybuje okolo 400–550 mg/m<sup>2</sup>. Dalšími nežádoucími účinky mohou být mukositida, nevolnost, zvracení, alopecie a nekróza kůže v místě vpichu. (Hofman a kol. 2014)

Daunorubicin se po intravenózním podání pomocí cytosolických reduktas redukuje na daunorubicinol. Dochází k redukcí ketonové skupiny na C-13 a její přeměně na sekundární alkoholovou skupinu. Reakce probíhá za účasti kofaktoru NADPH+H<sup>+</sup>. Daunorubicinol je méně cytotoxicky aktivní a je u něj pozorováno vyšší riziko rozvoje kardiotoxicity. Reakce je znázorněna na Obrázku 4. (Carlquist a kol. 2008)



**Obrázek 4** NAD(P)H-dependentní redukce daunorubicinu na daunorubicinol (Carlquist a kol. 2008)

### 1.3 Karbonylredukcující enzymy

Jedná se o NAD(P)H-dependentní cytosolické nebo membránově vázané enzymy podílející se na redukcí karbonylové skupiny (C=O). Existují 3 nadrodiny – aldoketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkými řetězci (SDR) a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhými řetězci (MDR). (Hoffmann & Maser 2007)

Mezi karbonylové sloučeniny se řadí ketony, aldehydy a chinony. Díky dobrým elektrofilním vlastnostem jsou aldehydy reaktivní a schopné interagovat s nukleofilními centry proteinů a nukleových kyselin. Karbonylová skupina aldehydů se buď může oxidovat na karboxylovou skupinu, anebo redukovat na primární alkoholy. Oproti aldehydům jsou ketony méně reaktivní. Biotransformace ketonů probíhá redukcí na sekundární alkoholy.

Chinony jsou cyklické diketony s konjugovanými vazbami. Meziproduktem jednoelektronové redukce chinonů je semichinon, který může podléhat redukci na hydrochinon, a přitom vznikají reaktivní kyslíkaté sloučeniny, které zapříčiní poškození buněk. (Oppermann a kol. 2000)

Metabolická redukce prostřednictvím karbonylredukujících enzymů (CRE) probíhá u endogenních látek např. glukóza, žlučové kyseliny, kyselina arachidonová či steroidní hormony a také u xenobiotik, kam spadají anthracykliny, warfarin, haloperidol, oracin nebo fenofibrát. (Maser 1995)

Vyšší koncentrace a aktivita CRE se nachází v orgánech vystavených potenciálně škodlivým látkám (játra, epidermis, GIT, ledviny, placenta, CNS). Tyto enzymy jsou součástí I. fáze metabolismu a zabraňují toxickým účinkům xenobiotik tím, že je převádějí na polárnější metabolity obsahující hydroxy skupinu. Polárnější metabolity se snadno konjugují v II. fázi metabolismu, kde reagují s konjugačními enzymy a stávají se ve vodě rozpustnější a polárnější, a proto jsou snadněji vylučovány z těla ven. (Rosemond a kol. 2004)

### 1.3.1 Aldo-ketoreduktasy

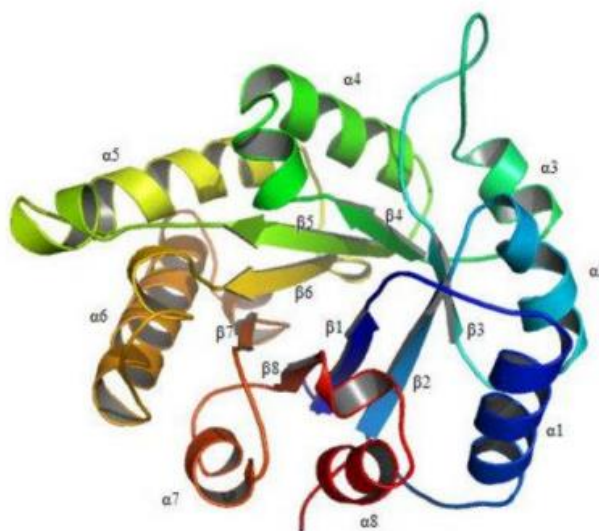
Aldo-ketoreduktasy jsou nadrodina oxidoreduktas. Jsou lokalizovány v cytosolu buněk a jedná se převážně o monomerní proteiny. V řetězci obsahují přibližně 320 aminokyselin. Řadí se mezi enzymy biotransformace I. fáze a metabolizují aldehydové a ketonové skupiny na primární a sekundární alkoholy. Patří mezi NAD(P)H-dependentní enzymy, jelikož pro katalýzu využívají kofaktor NAD(P)H. Je známo 16 rodin (sekvenční podobnost je 40 %), které se dále dělí do podrodin (sekvenční podobnost je 60 %). (Hoffmann & Maser 2007)

U člověka je popsáno 15 aldo-ketoreduktas:

- AKR1A1 (aldehydreduktasa)
- AKR1B1, 1B10, 1B15 (aldosareduktasy)
- AKR1C1, 1C2, 1C3, 1C4 (hydroxysteroiddehydrogenasy)
- AKR1D1
- AKR1E2
- AKR6A3, 6A5, 6A9
- AKR7A2, 7A3

Název enzymu se skládá ze zkratky AKR (AldoKetoReduktasa), dále z arabské číslice značící rodinu, poté následuje písmeno, které značí podrodinu a zakončen je arabskou číslicí

označující jednotlivé isoenzymy. Mají nízkou substrátovou aktivitu, a tudíž redukuje širokou škálu xenobiotik i eobiotik (např. glukosa, steroidní hormony). Aldo-ketoreduktasy mají sekundární strukturu  $(\alpha/\beta)_8$  soudkový motiv. Jedná se o proteinový záhyb, kde se střídají  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -skládané listy. Tato struktura je nutná pro vazbu s karbonylovým substrátem. Struktura aldo-ketoreduktas je znázorněna na Obrázku 5. (Barski a kol. 2008)



**Obrázek 5** Schéma struktury enzymu z nadrodiny aldo-ketoreduktas (Si a kol. 2009)

Substrátovou aktivitu aldo-ketoreduktas určuje aktivní místo, které se nachází na C-konci proteinu. V aktivním místě se nacházejí 4 aminokyseliny: tyrosin, aspartát, histidin a lysin. Zde probíhá samotná analýza ve dvou krocích. Nejprve dojde k přenosu hydridového iontu z NADPH na karbonylovou skupinu substrátu a poté je z přidaného rozpouštědla využit proton za účelem redukce karbonylu na alkohol. (Hoffmann & Maser 2007)

### 1.3.1.1 Aldehydreduktasa AKR1A1

Jedná se o jednu z prvních objevených AKR. Tento enzym je rozšířen ve všech tkáních v těle, ale v proximálních tubulech ledvin vykazuje nejvyšší expresi. Má nízkou substrátovou selektivitu a preferuje negativně nabitě molekuly obsahující např. karboxylovou skupinu. Katalyzuje redukci alifatických a aromatických aldehydů nebo steroidních aldehydů. Podílí se na biosyntéze kyseliny askorbové u myši. Nedostatek kyseliny askorbové způsobuje snížení hustoty kostní hmoty a dochází k rozvoji osteoporózy. U lidí se AKR1A1 podílí na biosyntetických drahách triacylglycerolů a cholesterolu, tím že přeměňuje glyceraldehyd

na glycerol a mevalonát na kyselinu mevalonovou. Účastní se také redukce daunorubicinu. Zvýšená exprese AKR1A1 byla zaznamenána u radiorezistentních nádorových buněk. Jedná se o vyšší odolnost buněk po ozáření. Non-Hodgkinův lymfom je spojován s mutací v genu pro AKR1A1. (Hofman a kol. 2014, Penning 2015)

### **1.3.1.2 Aldosareduktasa AKR1B1**

Aldo-ketoreduktasa AKR1B1 hraje významnou roli při onemocnění *diabetes mellitus*. Katalyzuje přeměnu glukosy na sorbitol za účasti kofaktoru NADPH v polyolové metabolické dráze. Může dojít až k přeměně na fruktosu. Při hyperglykémii se vzniklý sorbitol hromadí a mění osmolalitu buněk v ledvinách, tím dochází ke zvýšené produkci ROS (je spojován se sekundárními diabetickými problémy jako je diabetická neuropatie, retinopatie, nefropatie). Mezi substráty reagující s AKR1B1 se řadí kortikosteroidy, lipoperoxidy a konjugáty GSH. Ve zvýšeném množství se v těle AKR1B1 vyskytuje u karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu, u rakoviny pankreatu a hepatocelulárního karcinomu. (Penning 2015)

### **1.3.1.3 Aldosareduktasa AKR1B10**

Jedná se o aldoketoreduktasu tenkého střeva, jelikož má vysokou expresi v tenkém i tlustém střevě. Dále je exprimována v mnoha jiných tkáních, například v nadledvinách či játrech. AKR1B10 má 71% shodu v aminokyselinové sekvenci s AKR1B1. Zvýšenou expresi tohoto enzymu je možné pozorovat u nádorů plic, prsu, jater, prostaty a u hepatocelulárních tumorů. Reguluje syntézu mastných kyselin a metabolismus lipidů, a tím podporuje tvorbu a rozvoj nádorů. AKR1B10 napomáhá v rakovinných buňkách redukcii toxických karbonylových sloučenin, které jsou produkovány nádory. Tím napomáhá proliferaci a růstu nádoru. Blokuje přeměnu retinalu na kyselinu retinovou, jelikož pomáhá přeměně *all-trans*-retinalu na retinol. Snížené množství kyseliny retinové způsobuje nižší schopnost buněk se diferencovat, a tím urychluje rozvoj nádoru. AKR1B10 přeměňuje volné karbonylové sloučeniny. Dalšími substráty pro tento enzym jsou daunorubicin a dolasetron. Nadměrná exprese AKR1B10 byla zaznamenána u kuřáků, kdy se AKR1B10 podílí na metabolismu látek s aldehydickou skupinou (akrolein, krotonaldehyd) v cigaretovém kouři. (Wang a kol. 2010, Zhong a kol. 2011)

#### 1.3.1.4 Hydroxysteroiddehydrogenasa AKR1C3

Jedná se o monomerní NADPH-dependentní oxidoreduktasu, která katalyzuje alifatické a aromatické aldehydy a ketony na primární či sekundární alkoholy. AKR1C3 se řadí mezi nejaktivnější reduktasy v metabolismu anthracyklinů, to však může vést k jejich snížené účinnosti. (Bains a kol. 2010; Bains a kol. 2013)

Expres tohoto enzymu byla dokázána v játrech, v mléčné žláze, v nadledvinách, v mozku, v tenkém a tlustém střevě nebo ve slezině. U žen byl AKR1C3 exprimován v prsní žláze a ve žlutém tělísku a u mužů v prostatě a Leydigových buňkách (Khanna a kol. 1995). V játrech se AKR1C3 podílí na metabolismu a syntéze steroidních hormonů (Zeng a kol. 2017). Endogenními substráty pro tento enzym jsou androgeny a estrogeny. Katalyzují například transformaci androstendionu na testosteron nebo také redukci progesteronu na hydroxyprogesteron. Významně se podílí i na metabolismu jiných xenobiotik např. oracin, dolasetron, naloxon. (Matsunaga a kol. 2006)

Tento enzym se také nazývá prostaglandin-F-synthasa, která katalyzuje tvorbu prostaglandinu F<sub>2α</sub> a napomáhá proliferaci myeloblastů a myelocytů. Při onemocnění AML a ALL je AKR1C3 nadměrně exprimována v leukemických buňkách. Inhibicí exprese AKR1A3 lze zabránit proliferaci lidské myeloidní leukémii. (Birtwhistle a kol. 2009)

Zvýšená exprese AKR1C3 byla zaznamenána také u rakoviny prostaty a rakoviny prsu (Penning 2015).

#### 1.3.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkými řetězci

Jedná se o NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy se strukturou dimeru nebo homotetrameru. SDR jsou nejrozsáhlejší skupinou enzymů. Zahrnují širokou škálu eukaryotických a prokaryotických enzymů vyskytující se jako cytosolické nebo membránově vázané proteiny. Hrají významnou roli v metabolismu lipidů, steroidních hormonů, sacharidů, aminokyselin, hormonů, kofaktorů a xenobiotik (warfarin, daunorubicin, doxorubicin). Vypsána xenobiotika podléhají pomocí SDR biotransformaci.

U lidí klasifikujeme 48 rodin, které se dělí do šesti různých typů podle typu primární struktury:

- classical – klasický (C)
- extended – prodloužený (E)
- intermediate – středně pokročilý (I)
- divergent – divergentní (D)

- complex – komplexní (X)
- atypical – atypický (A)

Sekundární struktura se skládá z centrálního  $\beta$ -skládaného listu, který je obklopený třemi nebo čtyřmi  $\alpha$  helixy. Jedná se o Rossmannův záhyb a nachází se na *N*-konci vazebné domény. V tomto vazebném místě, které má charakteristické specifické sekvence podle výše uvedených typů, se váže kofaktor. Substrát se váže na vazebné místo na *C*-konci a je tvořeno tetradou aminokyselin – serin, tyrosin, asparagin a lysin. (Hoffmann & Maser 2007)

Nejvýznamnější rodina se nazývá karbonylreduktasa 1 a značí se SDR21C1. Další rodinou je karbonylreduktasa 3 (SDR21C2) a má vyšší substrátovou aktivitu než SDR21C1 (Hoffmann & Maser 2007).

### 1.3.2.1 Karbonylreduktasa CBR1

Jedná se především o NAD(P)H-dependentní enzym vyskytující se v cytosolu. Exprimuje se ve všech tkáních a ve zvýšené míře v játrech, ledvinách, placentě a CNS. Chrání před degradací mozku vyvolanou oxidačním stresem tím, že odstraňuje z těla sloučeniny obsahující aldehydovou skupinu. V souvislosti s ochranou proti ROS má inhibice CBR1 vliv na zvýšení radiosenzitivity nádorových buněk (karcinom hlavy a krku). Katalyzuje *o*-chinony (odvozené od polycyklických aromatických uhlovodíků), které se podílejí na znečištění životního prostředí a *p*-chinony. Jedná se o endogenní chinony, mezi které spadá vitamin K3 (menadion) nebo antioxidant vitamin E ( tokoferolchinon). CBR1 dále katalyzuje redukci anthracyklinů, warfarin a haloperidol. Zatímco ve zvýšeném množství CBR1 v nádorových buňkách snižuje proliferaci a růst nádoru, ve sníženém množství je spojován s podporou růstu nádoru. Zvýšená hladina CBR1 se nachází u nádorových buněk karcinomu plic, tlustého střeva, zatímco snížená hladina CBR1 se vyskytuje u rakovin vaječníků, děložního hrdla. (Persson & Kallberg 2013)

Karbonylredukuující enzym CBR1 se řadí mezi anthracyklinreduktasy a významně se podílí na rezistenci nádorových buněk vůči anthracyklinům. Je jedním z faktorů pro vznik kardiotoxicity způsobenou anthracykliny. Zvýšená exprese CBR1 ovlivňuje snížení cytotoxického působení DAUN při akutní myeloidní leukémii. Také je zodpovědný za rezistenci gastrointestinálních nádorových buněk proti doxorubicinu. (Oppermann a kol. 2003, Varatharajana a kol. 2012)



## 1.4 Inhibice karbonyl redukujících enzymů

Kvůli nežádoucí tvorbě toxického metabolitu redukcí daunorubicinu katalyzované CRE, je z klinického hlediska důležité se zaměřit na inhibici těchto enzymů. Inhibitory umožňují poskytnout informace o struktuře enzymu, o umístění aktivního místa, a tím hrají důležitou roli v diagnostice. Inhibitory by měly vykazovat specifickou k danému enzymu. Specifita inhibitorů vychází z přítomnosti kapes, které jsou identifikovány krystalickou strukturou enzymu. (Byrns a kol. 2011, Penning a kol. 2006)

Enzym AKR1B1, který způsobuje například diabetické komplikace, může být inhibován sorbinilem, epalrestatem, tolrestatem (Penning 2015). Enzym AKR1B10, který je exprimovaný u mnoha typů rakovin, je inhibován oleanolovou kyselinou (Takemura a kol. 2011).

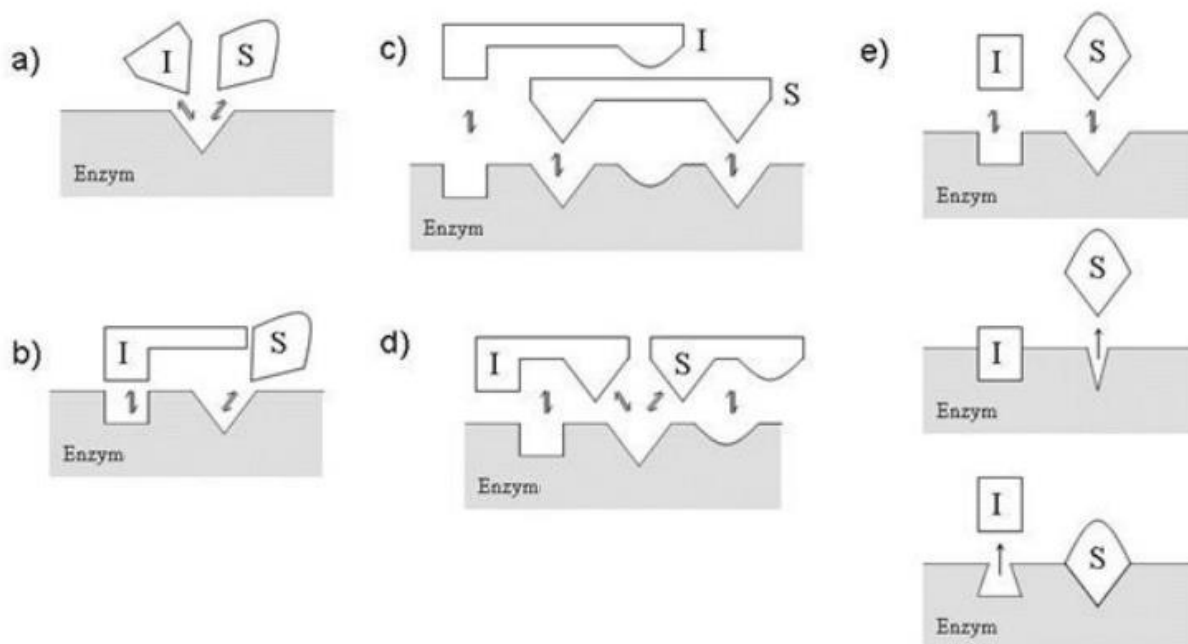
Látkami inhibující enzym AKR1C3 mohou být nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID), flavonoidy, cyklopentany, kyselina benzoová, kyselina skořicová, steroidní hormonální analogy. Nevýhoda u těchto látek spočívá v tom, že se jedná o karboxylové kyseliny, které musí ke svému transportu do buněk využívat nosiče. (Byrns a kol. 2011, Zeng a kol. 2017)

Inhibice se dělí na reversibilní a ireversibilní. Pokud je inhibitor na enzym navázán pevnou kovalentní vazbou, nelze jej odstranit a jedná se o ireverzibilní inhibici. Při reverzibilní inhibici lze inhibitor z molekuly enzymu odstranit a nedochází k trvalé změně. Existují tři typy reverzibilní inhibice enzymu: kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. (McIlwain 1986)

### 1.4.1 Inhibice kompetitivní

Inhibitor je chemickou strukturou podobný substrátu, a tudíž dochází k soutěži o vazebné místo enzymu. Vazba kompetitivního inhibitoru a vazba substrátu jsou vzájemně se vylučující děje. Inhibitor se váže pouze na volný enzym. Kvůli navázanému inhibitoru se funkce enzymu blokuje. Výsledná inhibice je podmíněna afinitě inhibitoru a substrátu k enzymu a také závisí na koncentraci substrátu. Kompetitivní inhibici lze překonat při vyšších koncentracích substrátu. Vysokou koncentrací substrátu lze vytěsnit inhibitor z vazby na enzym. Tudíž změnou koncentrace substrátu lze korigovat účinek inhibitoru. Toto bude mít vliv na účinnost léčiv. Kompetitivní inhibitor zvýší hodnotu Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) beze změny hodnoty maximální rychlosti ( $V_{max}$ ). Na Obrázku 6 jsou znázorněny možné vzájemně se vylučující vazebné události mezi substrátem (S) a inhibitorem (I). a) S soutěží s I o stejnou oblast aktivního místa, b) I se neváže na aktivní místo, ale stericky brání vazbě S, c) vazebná místa

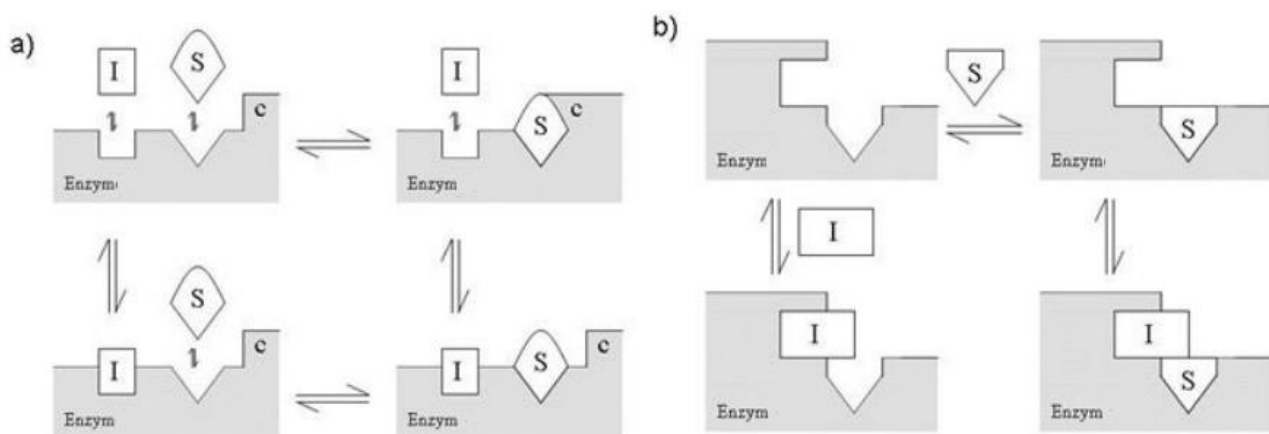
S a I se překrývají, d) S a I sdílejí společnou vazebnou kapsu na enzymu, e) vazba I (S) může vést ke konformační změně, která brání vazbě S (I). (Strelow a kol. 2012)



**Obrázek 6** Příklady kompetitivní inhibice (upraveno dle Strelow a kol. 2012)

#### 1.4.2 Inhibice nekompetitivní

U nekompetitivní inhibice má inhibitor jinou chemickou strukturu než substrát, a tudíž nesoutěží o aktivní místo enzymu. Nekompetitivní inhibitor se váže buď na volný enzym nebo na komplex enzym-substrát. Inhibitor se naváže na odlišné místo, než je aktivní místo obsazené substrátem. Tato vazba způsobí allosterickou změnu konformace enzymu a substrát se nepřemění na produkt. Na rozdíl od kompetitivního inhibitoru nekompetitivní inhibitor sníží hodnotu  $V_{max}$ , ale neovlivní hodnotu  $K_m$ . Za určitých okolností nemusí mít sloučenina stejnou afinitu jak pro volný enzym, tak pro komplex enzym-substrát. Tato směs kompetitivních a nekompetitivních fenotypů se nazývá smíšená inhibice. Na Obrázku 7 jsou znázorněny příklady nekompetitivní inhibice, kde k vazbě inhibitoru (I) dochází v odlišném místě od vazebného místa substrátu (S) a katalytického centra (c) aktivního centra; a) Vazba S indukuje konformační změnu zarovnání c blízko S pro katalýzu. Pokud se však I naváže na samostatné místo, konformační změna nenastane a aktivita enzymu je inhibována. b) I stericky brání vazbě a uvolnění S. Avšak může být případ, že se I a S navážou současně. (Strelow a kol. 2012)



**Obrázek 7** Příklady nekompetitivní inhibice (upraveno dle Strelow a kol. 2012)

### 1.4.3 Inhibice akompetitivní

Nekompetitivní inhibitor se výhradně váže na komplex enzym-substrát, čímž vzniká neaktivní komplex enzym-substrát-inhibitor. Po vzniku tohoto komplexu se jak hodnota  $V_{max}$ , tak hodnota  $K_m$  sníží. Vazbou inhibitoru dojde ke konformaci enzymu a je přerušena schopnost enzymu přeměňovat substrát, a tudíž nedojde ke vzniku produktu. Tím že inhibitor snižuje aktivitu enzymu, dochází ke zvýšení lokální koncentrace substrátu. Bez mechanismu k odstranění nahromaděného substrátu se účinnost nekompetitivního inhibitoru zvyšuje. Na Obrázku 8 je zobrazena vazba inhibitoru, který se váže pouze v přítomnosti substrátu. (Strelow a kol. 2012)



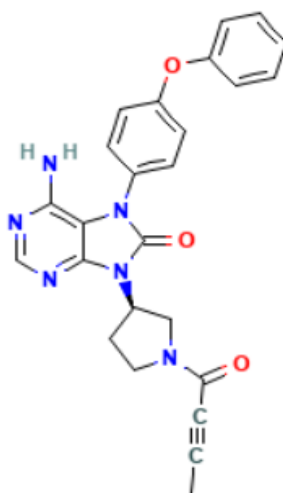
**Obrázek 8** Příklad akompetitivní inhibice (upraveno dle Strelow a kol. 2012)

## 1.5 Brutonova thyrosinkinasa

Jedná se o tyrosinové kinasy, které jsou exprimovány v B-lymfocytech, krevních destičkách a myeloidních buňkách. Nízké nebo nedetekovatelné hladiny Brutonových tyrosin kinas (BTK) jsou v T-lymfocytech a plazmatických buňkách. BTK se účastní proliferace a diferenciaci B-lymfocytů a vrozené i získané imunitní odpovědi. Umožňuje signalizaci B-celulárních receptorů (BCR) a jiných receptorů na povrchu maligních či zdravích buněk. V granulocytech a monocycitech obstarávají fagocytózu a produkci cytokinů a další prozánětlivé buňky. Receptory, které mohou aktivovat BTK, zahrnují antigenní receptory, zejména receptor BCR, poté receptory pro růstové hormony a cytokiny, receptory spjaté s G proteinem (integriny a chemokiny). Po aktivaci BTK se rozběhnou signální kaskády, a tím dochází k proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. V nepřítomnosti BTK je signalizace BCR nedostatečná k proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. Toto vede ke změněnému vývoji B-lymfocytů a k defektům ve funkčních odpovědích. Při nadměrné aktivaci BTK dochází k rozvoji autoimunitních chorob. Vzniklé autoimunitní choroby jsou reverzibilní při podání BTK inhibitorů. Inhibitory BTK indukují autoimunitní choroby a malignity B-lymfocytů. První schválený BTK inhibitor je ibrutinib. Byly vytvořeny BTK inhibitory druhé generace, které mají vyšší cílovou selektivitu, mezi ně patří akalabrutinib, zanubrutinib, evobrutinib a tirabrutinib. (Burger 2019)

### 1.5.1 Tirabrutinib

Tirabrutinib (TIR) je nový vysoce selektivní kovalentní inhibitor BTK, který je podáváný perorálně. Jedná se o BTK inhibitor druhé generace. Strukturální vzorec TIR je na Obrázku 9. TIR se váže na BTK v B buňkách, čímž brání signalizaci a rozvoji B lymfocytů. TIR je selektivnější než ibrutinib a využívá se hlavně při léčbě chronické lymfoblastické leukémie (CLL). (Goldmann a kol. 2019)



**Obrázek 9** Strukturní vzorec tirabrutinibu (PubChem)

## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo zjistit účinek inhibitoru BTK tirabrutinibu na vybrané enzymy z nadrodiny AKR a SDR, které se podílejí na metabolismu daunorubicinu.

Jednotlivé dílčí cíle zahrnovaly:

- Základní screening vybraných enzymů – AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, CBR1, zahrnující inhibiční aktivitu TIR na jednotlivé enzymy.
- Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) pro nejvíce inhibované enzymy.
- Určení inhibiční konstanty ( $K_i$ ) a typu inhibice u nejvíce inhibovaného enzymu.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Chemikálie

- Acetonitril (VWR, USA)
- Daunorubicin (Selleckchem, Velká Británie)
- Destilovaná voda
- Enzym
  - AKR1C3 (1,5 mg/ml)
  - AKR1B10 (1,5 mg/ml)
  - AKR1B1 (1,5 mg/ml)
  - AKR1A1 (0,494 mg/ml)
  - CBR1 (1,74 mg/ml)
- Kyselina mravenčí (85–87%, Lachema, Česká Republika)
- Methanol (VWR, USA)
- Regenerační systém
  - NADP<sup>+</sup> (Roche, Švýcarsko)
  - Glc-6-P (Roche, Švýcarsko)
  - 0,1 mol/l sodno-fosfátový pufr (NaPB)
  - 0,1 mol/l MgCl<sub>2</sub>
  - Glc-6-P-dehydrogenasa (Roche, Švýcarsko)
- Tirabrutinib (MedChemExpress, USA)

#### 3.1.2 Pomůcky a přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, Německo)
- automatické pipety se špičkami (Biohit, Finsko)
- filtr s membránou (0,2 μm PTFE, Whatman, Velká Británie)
- mikrozkuhavky (Eppendorf, Německo)
- sterilní injekční stříkačka a sterilní jehla do injekční stříkačky (Terumo, Japonsko)
- vialky s inzerty, septy a víčky na vialky (Agilent, USA)

- kádinky, led a nádoba na led, lžička, stojan na zkumavky, stopky, rukavice
- kolona (Agilent, ZorbaxEclipse Plus C18, RRHD 2,1x50 mm i.d., 1,8 µm) opatřená fritou pro 1290 Inline Filter, 0,3 µm (Agilent, USA)
- třepačka (Vortex Genius 3, IKA, Německo)
- centrifuga (Mini Spin plus, Eppendorf, Německo)
- termostat (Thermomixercompact, Eppendorf, Německo)
- ultrazvuk (Ultrasoniccleaner 120T, GT Sonic, Čína)

Kapalinový chromatograf pro UHPLC (Agilent 1290 Series, Agilent Technologies, USA)

- autosampler (1260 Vialsampler)
- pumpa (1260 Flexible Pump)
- fluorescenční detektor (1260 FLD)
- UV detektor (1260 VWD)
- diodové pole (DAD)

Kapalinový chromatograf pro UHPLC (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, USA)

- autosampler (1290 Sampler)
- termostat kolony (1290 TCC)
- pumpa (1290 Bin Pump VL)
- fluorescenční detektor (1260 FLD)
- diodové pole (1260 DAD)

## 3.2 Příprava roztoků

### Příprava enzymů

Enzymy byly připraveny na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. K rekombinantní expresi byl použitý systém *E. coli*, kmen BL21(DE3). Purifikované enzymy byly rozpuštěny ve směsi 20% glycerolu a draselno-fosfátovém pufru (KPB) a byly uchovávány při -80 °C. Tímto způsobem byly připraveny všechny rekombinantní lidské CRE (AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1A3 a CBR1).



### Příprava substrátu

Substrát byl připraven rozpuštěním 14 mg daunorubicin hydrochloridu ( $M = 563,98 \text{ g/mol}$ ) v 5 ml destilované vody. Výsledná koncentrace byla 5 mmol/l. Roztok substrátu byl uchováván v lednici a před inkubací vložen na 4 minuty do ultrazvuku.

### Příprava inhibitoru

Zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l byl připraven rozpuštěním 5 mg TIR v 1,1 ml DMSO. Zásobní roztok byl uchováván při  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  maximálně po dobu 6 měsíců, případně při  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , maximálně po dobu 1 měsíce. Ze zásobního roztoku byly připraveny pracovní roztoky o požadovaných koncentracích ředěním v DMSO.

### Příprava regeneračního systému

Složení regeneračního systému pro 1 reakci viz Tabulka 1. Navážka  $\text{NADP}^+$  a Glc-6-P byla rozpuštěna v 0,1mol/l sodno-fosfátovém pufru (NaPB). Po důkladném promíchání byl přidán 0,1mol/l  $\text{MgCl}_2$  a směs byla opět zvortexována. Směs byla připravena vždy čerstvá dle počtu reakcí. Těsně před pipetováním regeneračního systému do *in vitro* reakcí byla k směsi přidána Glc-6-P-dehydrogenasa a roztok byl opět promíchán.

**Tabulka 1** Složení regeneračního systému pro 1 reakci

|                       |                   |
|-----------------------|-------------------|
| NADP                  | 0,2 mg            |
| Glc-6-P               | 0,6 mg            |
| NaPB                  | 10 $\mu\text{l}$  |
| $\text{MgCl}_2$       | 10 $\mu\text{l}$  |
| Glc-6-P-dehydrogenasa | 0,5 $\mu\text{l}$ |

### Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla směsí 0,1% kyseliny mravenčí smíchané s acetonitrilem v poměru 74:26. Do odměrného válce byl naměřen acetonitril v množství 260 ml a druhý odměrný válec byl naplněn 740 ml ultračisté destilované vody. Oba odměrné válce byly slity do nádoby a byla přidána kyselina mravenčí o objemu 740  $\mu\text{l}$ . Připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes 0,45  $\mu\text{m}$  nylonovou membránu za použití vakuové pumpy a filtrační aparatury Supelco.

### 3.3 *In vitro* inkubace

Do řádně označených mikrozkušavek byl dle Tabulky 2 pipetován nejprve NaPB, pak inhibitor, respektive DMSO, regenerační systém a na závěr enzym. Po řádném promíchání reakční směsi, byly zkumavky ponechány 10 minut v termostatu při 37 °C a 300 rpm (tzv. preinkubace). Za zachování těchto podmínek byla následně enzymatická reakce spuštěna přidávkem 10 µl substrátu. Přesně po 30 minutách byla reakce ukončena přidávkem 300 µl methanolu, promícháním a uložením mikrozkušavky na led. Po ukončení všech reakcí byly mikrozkušavky přesunuty na -20 °C, kde probíhala po dobu 30 minut precipitace. Následně byly vzorky centrifugovány (9050 x g, 10 min). Supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm PTFE membránu přímo do insertů chromatografických vialek. Takto připravené vzorky byly potom analyzovány metodou UHPLC s fluorescenční detekcí.

**Tabulka 2** Složení reakční směsi pro *in vitro* inkubaci

|                                      | NaPB(µl) | Enzym<br>(µl) | Regenerační<br>systém (µl) | Inhibitor<br>(µl) | Substrát<br>(µl) | Počet<br>reakcí |
|--------------------------------------|----------|---------------|----------------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Neinhibovaná reakce                  | 60       | 10            | 20                         | 0                 | 10               | 3               |
| Kontrola DMSO                        | 58       | 10            | 20                         | 2                 | 10               | 3               |
|                                      |          |               |                            | (DMSO)            |                  |                 |
| Inhibitor o koncentraci<br>10 µmol/l | 58       | 10            | 20                         | 2                 | 10               | 3               |
| Inhibitor o koncentraci<br>50 µmol/l | 58       | 10            | 20                         | 2                 | 10               | 3               |
| Kontrola bez enzymu                  | 70       | 0             | 20                         | 0                 | 10               | 2               |
| Kontrola bez substrátu               | 60       | 10            | 20                         | 0                 | 0                | 2               |
| Celkem                               |          |               |                            |                   |                  | 16              |

#### 3.3.1 Základní screening

Základní screening probíhal obdobným způsobem jako inkubace popsaná v podkapitole 2.3. Inhibitor byl použit pro celé spektrum enzymů ve dvou koncentracích; 50 µmol/l a 10 µmol/l. Koncentrace inhibitoru byly připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mmol/l. Nejprve bylo ze zásobního roztoku odpipetováno 5,5 µl a doplněno 16,5 µl DMSO, tím byla získána

koncentrace inhibitoru 2500  $\mu\text{mol/l}$ , a to po přidavku do reakce znamenalo výslednou koncentraci inhibitoru 50  $\mu\text{mol/l}$ . Pro získání koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  v reakci, se odpipetovalo ze zásobního roztoku 2  $\mu\text{l}$ , které byly doplněny 38  $\mu\text{l}$  DMSO.

Základní screening sloužil k vyselektování enzymů, které byly nejvíce inhibovány tirabrutinibem.

Inhibitor je rozpuštěn v DMSO, který má sám o sobě inhibiční účinek na enzym. Aby byl tedy odlišený účinek inhibitoru od účinku rozpouštědla, ve kterém je inhibitor rozpuštěný, používá se v experimentu tzv. DMSO kontrola. K ní se vztahuje 100% aktivita enzymu při vyhodnocování výsledků. Kontrola bez enzymu slouží k ověření stability substrátu. Ve výsledcích se očekává viditelný pík substrátu bez píku produktu. U kontroly bez substrátu se předpokládá nepřítomnost píku jak substrátu, tak produktu. Tato kontrola může sloužit k ověření kontaminace.

### **3.3.2 Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace**

Pro stanovení hodnoty inhibiční koncentrace byly připraveny pracovní roztoky inhibitoru o koncentracích 5  $\mu\text{mol/l}$ , 25  $\mu\text{mol/l}$ , 50  $\mu\text{mol/l}$ , 250  $\mu\text{mol/l}$ , 500  $\mu\text{mol/l}$ , 2 500  $\mu\text{mol/l}$ , 5 000  $\mu\text{mol/l}$ . Z pracovních roztoků byly odpipetovány 2  $\mu\text{l}$  a výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi (100  $\mu\text{l}$ ) byla tedy 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 50  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$ . Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 10  $\text{mmol/l}$  a doplněny DMSO.

### **3.3.3 Stanovení inhibiční konstanty a určení typu inhibice**

Pro stanovení hodnoty  $K_i$  byly měněny koncentrace inhibitoru i substrátu. Z připravených pracovních roztoků inhibitorů o koncentracích 125  $\mu\text{mol/l}$ , 250  $\mu\text{mol/l}$ , 500  $\mu\text{mol/l}$  byly odpipetovány do reakční směsi (100  $\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$ . Výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi byla tedy 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ . Dále byly připraveny pracovní roztoky substrátu o koncentracích 200  $\mu\text{mol/l}$ , 400  $\mu\text{mol/l}$ , 600  $\mu\text{mol/l}$ , 800  $\mu\text{mol/l}$ , 1 000  $\mu\text{mol/l}$ , 2 000  $\mu\text{mol/l}$ . Z těchto pracovních roztoků bylo do reakční směsi odpipetováno 10  $\mu\text{l}$ . Konečná koncentrace substrátu byla 2  $\text{mmol/l}$ , 4  $\text{mmol/l}$ , 6  $\text{mmol/l}$ , 8  $\text{mmol/l}$ , 10  $\text{mmol/l}$ , 20  $\text{mmol/l}$ .

### 3.4 UHPLC analýza

Vyhodnocení reakcí probíhalo měřením množství vzniklého produktu metodou UHPLC s fluorescenční detekcí (parametry viz Tabulka 3).

**Tabulka 3** Parametry měření UHPLC analýzy

|                      |   |
|----------------------|---|
| složení mobilní fáze | 0,1% kyselina mravenčí/acetonitril (74:26)                    |
| kolona               | Zorbax Eclipse Plus C18 (RRHD; 2,1 x 50 mm; 1,8 µm)           |
| eluce                | izokratická   |
| průtok mobilní fáze  | 0,7 ml/min  |
| nástřík vzorku       | 5 µl  |
| čas analýzy          | 5 min   |
| detektor             | fluorescenční (FLDA)<br>excitační λ 480 nm<br>emisní λ 560 nm |

Výsledky byly vyhodnocené v programu OpenLAB automatickou integrací dle přednastavených parametrů uvedených v Tabulce 4. Po provedeném měření bylo zapotřebí zkontrolovat automaticky přednastavené píky daunorubicinolu podle jeho retenčního času. Pokud došlo k posunu, bylo potřeba píky integrovat ručně. Množství daunorubicinolu ve vzorcích bylo kvantifikováno metodou kalibrační přímky ( $R^2 > 0,999$ ). Kalibrační přímka byla 8-bodová v rozsahu 0,5–50 µg/ml. S každou analýzou byly spuštěny dvě kontroly kvality (na vysoké a nízké hladině).

**Tabulka 4** Parametry automatické integrace na HPLC

|                                     |               |
|-------------------------------------|---------------|
| citlivost na sklon křivky           | 0,001         |
| šířka píku                          | 0,001         |
| plocha zamítnutí                    | 0,250         |
| výška zamítnutí                     | 0,050         |
| <b>identifikace daunorubicinolu</b> |               |
| očekávaný retenční čas              | 1,073 min     |
| relativní retenční okno             | 20 %          |
| shoda píku                          | nejbližší pík |

Metodou UHPLC analýzy bylo získáno množství metabolitu daunorubicinolu ve vzorku na 5 µl nástřiku vzorku. Z této hodnoty se dále vypočítala specifická aktivita enzymu, která byla vypočtena pomocí vzorce v programu Microsoft Excel.

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

a – specifická aktivita (nmol/mg/min)

m – množství daunorubicinolu na nástřik (ng)

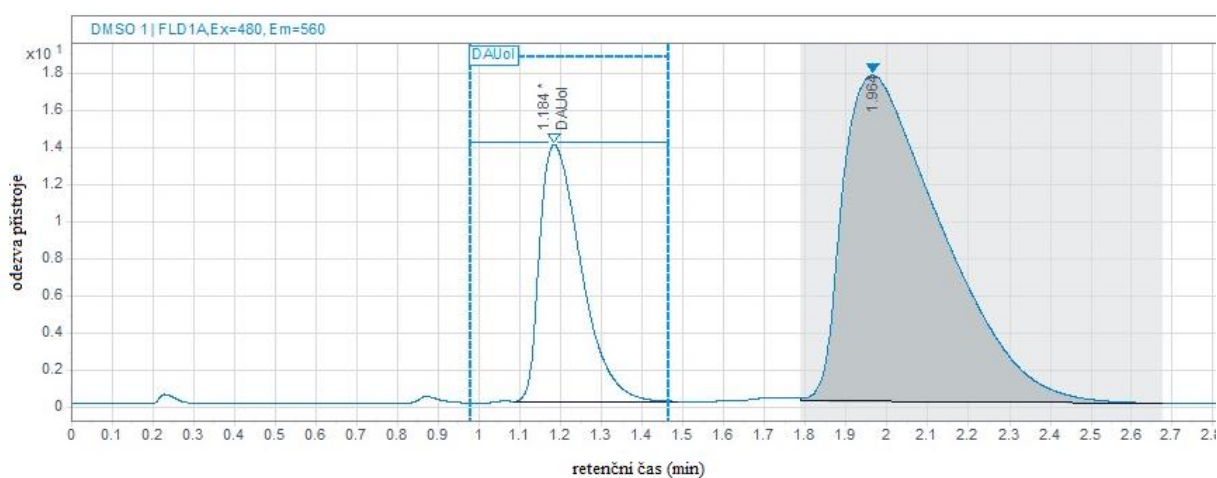
K – koeficient zředění (podíl nástřiku a celého objemu vzorku; 400 µl/5 µl = 80)

t – čas inkubace (30 minut)

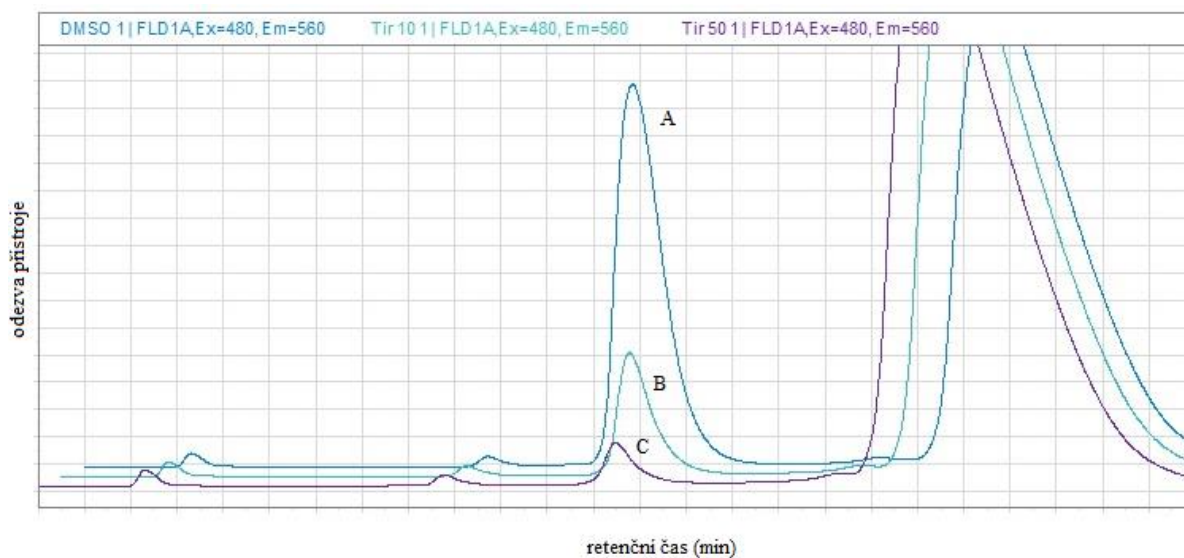
c – množství enzymu na jednu reakci (µg)

Mr – molární hmotnost daunorubicinolu (529,54 g/mol)

Grafické vyhodnocení specifické aktivity vybraných enzymů, IC<sub>50</sub>, inhibiční konstanty K<sub>i</sub>, typu inhibice bylo provedeno v programu GraphPadPrism (verze 9.3.1).



**Obrázek 10** Záznam chromatogramu, vzorek z *in vitro* inkubace (DMSO kontrola), zobrazen pík daunorubicinu (Rt = 1,964 min.) a daunorubicinolu (Rt = 1,184 min), podmínky analýzy viz Tabulka 2



**Obrázek 11** Záznam chromatografické analýzy; pík A kontrola DMSO, pík B koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , pík C koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$ , podmínky analýzy viz Tabulka 2

## 4 Výsledky a diskuze

Až 90 % úmrtí pacientů s rakovinou je spojených s lékovou rezistencí, tedy se schopností nádorových buněk odolávat cytotoxickým účinkům anthracyklinových antibiotik. Jak už několik studií naznačilo, u mnoha typů nádorových onemocnění byla pozorována vyšší exprese karbonylredukujících enzymů (například zvýšená exprese AKR1B1 u karcinomu prsu, kolorektálního a hepatocelulárního karcinomu; AKR1B10 u nádorů plic, prsu, jater a prostaty; AKR1C3 u rakoviny prostaty a rakoviny prsu; CBR1 u nádorových buněk karcinomu plic a tlustého střeva). Anthracyklinreduktasy jsou často ve větší míře exprimovány u pacientů se špatnou prognózou nebo s pokročilým stádiem rakoviny (Matsunaga a kol. 2012). CRE katalyzují redukci anthracyklinů (daunorubicin, doxorubicin) na jejich sekundární alkoholy (daunorubicinol, doxorubicinol). Tyto alkoholy se pravděpodobně dále podílejí také na vzniku kardiotoxicity, což je dalším nežádoucím účinkem používání anthracyklinů. Léková rezistence snižuje terapeutický účinek a společně s kardiotoxicitou může omezit využívání anthracyklinů v klinické praxi. (Shen a kol. 2011, Zhang a kol. 2016)

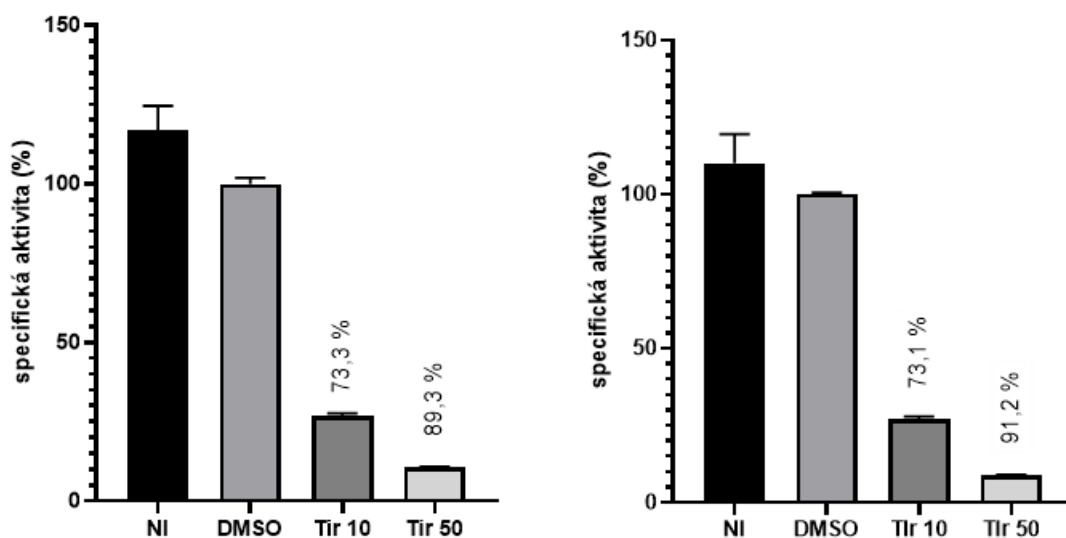
Proto je téma možností inhibice výše zmiňovaných enzymů velice aktuální. U těchto enzymů byl již sledován vliv jiných inhibitorů, mezi ně například patří olaparib (Tavares a kol. 2020), buparlisib (Büküm a kol. 2019), acalabrutinib, ibrutinib (Morell a kol. 2020), evobrutinib (Zenkerová 2021) a další.

V této diplomové práci se pracovalo s inhibitorem BTK tirabrutinibem a zjišťoval se jeho účinek na CRE z nadrodiny AKR (1C3, 1A1, 1B1, 1B10) a z nadrodiny SDR (CBR1). Jedná se o vysoce selektivní inhibitor BTK, který se váže na BTK v B buňkách. Využívá se hlavně při léčbě (CLL). (Goldmann a kol. 2019)

### 4.1 Základní screening

Při základním screeningu byla testována inhibiční aktivita TIR pro všechny zmíněné enzymy. Probíhala dvě na sobě nezávislá měření pro každý enzym. Měření probíhala v triplikátech. Je žádoucí, aby testovaný inhibitor vykazoval vysokou inhibiční aktivitu alespoň vůči jednomu z testovaných enzymů. Samozřejmě, pokud by vykazoval inhibiční aktivitu vůči vícero z testovaných enzymů, bylo by to pro uplatnění v praxi ještě výhodnější. Z dosavadních zkušeností pracoviště je ale zřejmé, že inhibitory vykazují významnou aktivitu většinou jenom vůči jednomu, maximálně dvěma enzymům současně. Nejčastěji se jedná o enzymy AKR1C3 a AKR1B10. (Büküm a kol. 2021, Morell a kol. 2020, Tavares a kol. 2020, Zenkerová 2021)

V této práci byl významný vliv inhibice TIR pozorován pouze u enzymu AKR1C3, viz Obrázek 12. Při koncentraci TIR 10  $\mu\text{mol/l}$  byl enzym inhibován ze 73,2 % a při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  z 90,25 %. Jedná se o průměrné hodnoty. Jak je z Obrázků 13–16 zřejmé, vliv TIR na ostatní enzymy nebyl významný, inhibice probíhala minimálně, anebo neprobíhala vůbec, a proto se dále s těmito enzymy v dalších krocích nepokračovalo.

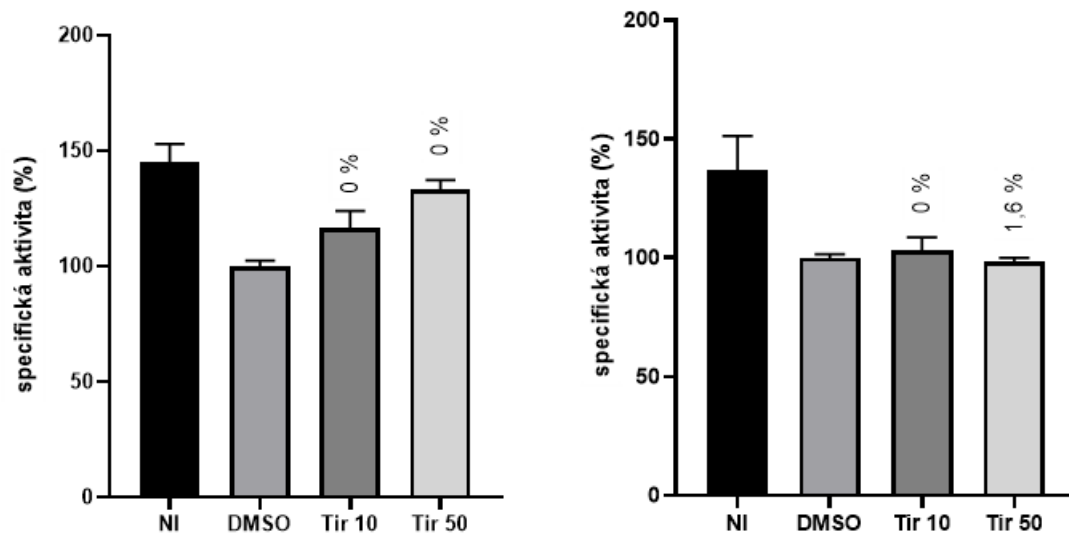


**Obrázek 12** Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1C3

NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s dimethylsulfoxidem, Tir10 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , Tir50 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$ ,

% značí inhibici reakce,  $n = 3$

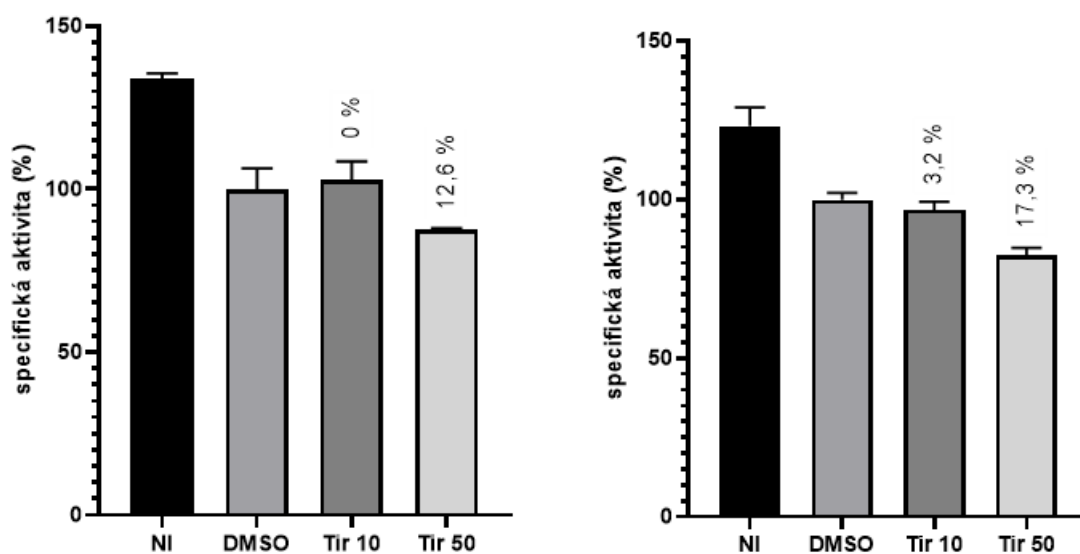




**Obrázek 13** Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1B1

NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s dimethylsulfoxidem, Tir10 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , Tir50 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$

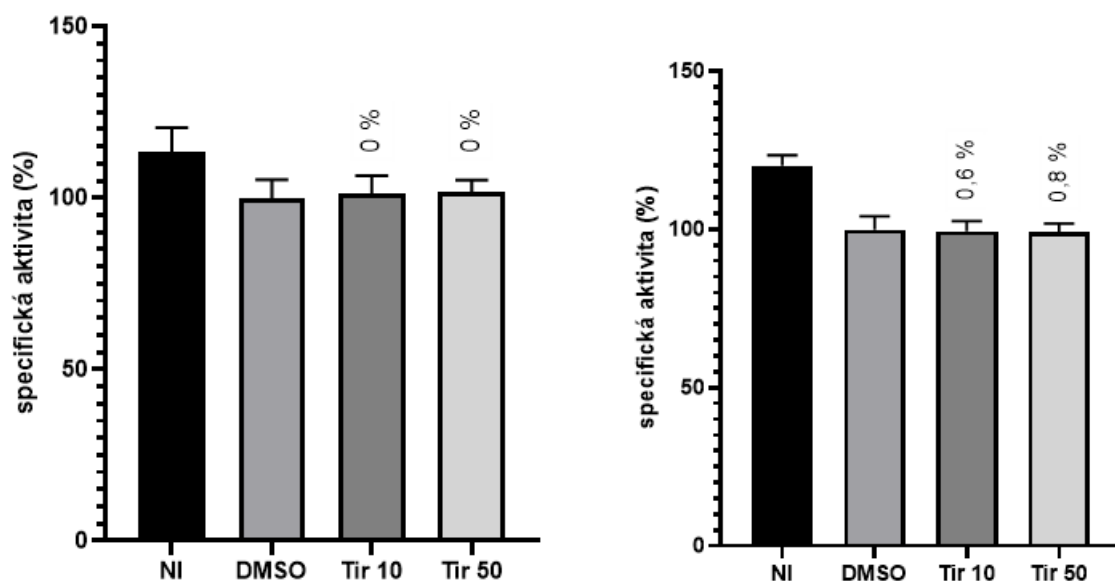
% značí inhibici reakce, n = 3



**Obrázek 14** Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1B10

NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s dimethylsulfoxidem, Tir10 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , Tir50 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$ ,

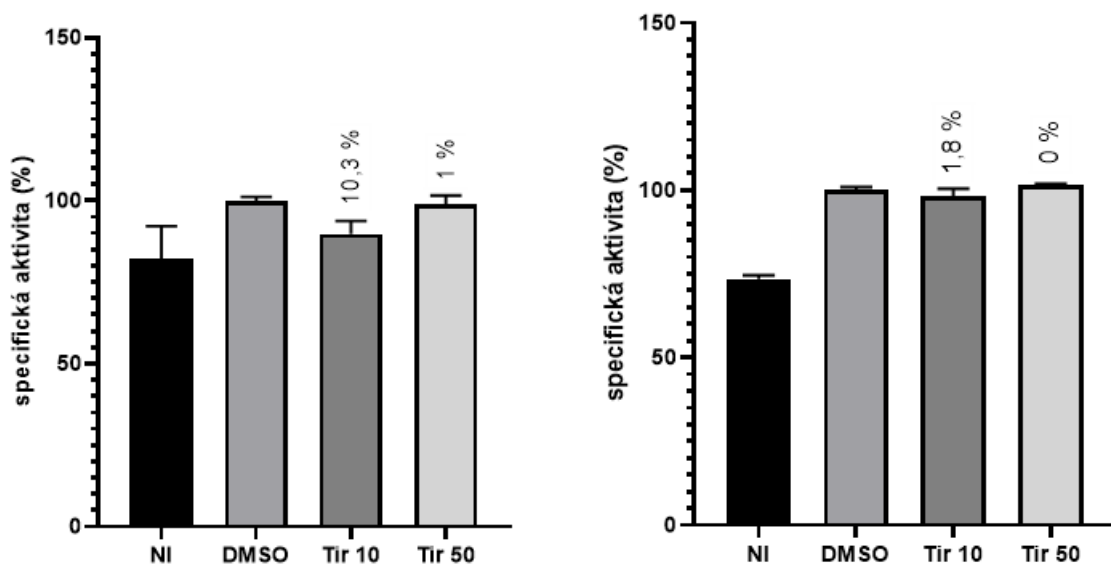
% značí inhibici reakce, n = 3



**Obrázek 15** Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu AKR1A1

NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s dimethylsulfoxidem, Tir10 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , Tir50 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$ ,

% značí inhibici reakce, n = 3



**Obrázek 16** Vliv tirabrutinibu na aktivitu enzymu CBR1

NI – neinhibovaná reakce, DMSO – kontrola s dimethylsulfoxidem, Tir10 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 10  $\mu\text{mol/l}$ , Tir50 – koncentrace tirabrutinibu v reakci – 50  $\mu\text{mol/l}$

% značí inhibici reakce, n = 3

Celkové shrnutí průměrných inhibičních aktivit TIR a průměrných specifických aktivit enzymů je znázorněno v Tabulce 4. Inhibiční aktivita TIR byla srovnávána s DMSO kontrolou. Ta reprezentuje standardní hodnotu s nulovou aktivitou inhibitoru, a proto se využívá jako porovnávací hodnota pro vzorky s inhibitory.

**Tabulka 5** Průměrné hodnoty specifické aktivity enzymu a průměrné hodnoty inhibiční aktivity tirabrutinibu

| koncentrace TIR<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | specifická aktivita<br>enzymu<br>( $\text{nmol/mg/min}$ ) | specifická aktivita<br>enzymu (%) | inhibiční aktivita<br>TIR (%) |
|--|---|-----------------------------------|-------------------------------|
| <b>AKR1C3</b>                            |   |                                   |                               |
| 0  | $187,8 \pm 2,9$   | 100                               | 0                             |
| 10                                       | $50,1 \pm 1,4$  | $26,8 \pm 0,8$                    | $73,2 \pm 0,8$                |
| 50                                       | $20,0 \pm 0,3$  | $9,8 \pm 0,9$                     | $90,3 \pm 0,9$                |
| <b>AKR1B1</b>                            |   |                                   |                               |
| 0  | $13,1 \pm 0,2$  | 100                               | 0                             |
| 10                                       | $13,4 \pm 0,6$  | 0                                 | 0                             |
| 50                                       | $12,9 \pm 0,2$  | $99,2 \pm 8,7$                    | $0,8 \pm 8,7$                 |
| <b>AKR1B10</b>                           |   |                                   |                               |
| 0  | $70,0 \pm 1,2$  | 100                               | 0                             |
| 10                                       | $67,8 \pm 1,5$  | $98,4 \pm 4,7$                    | $1,6 \pm 4,7$                 |
| 50                                       | $57,8 \pm 1,2$  | $85,0 \pm 2,7$                    | $15,0 \pm 2,7$                |
| <b>AKR1A1</b>                            |   |                                   |                               |
| 0  | $310,9 \pm 10,4$  | 100                               | 0                             |
| 10                                       | $309,0 \pm 11,0$  | $99,7 \pm 3,7$                    | $0,3 \pm 3,7$                 |
| 50                                       | $309,3 \pm 8,1$   | $99,6 \pm 2,9$                    | $0,4 \pm 2,9$                 |
| <b>CBR1</b>                              |   |                                   |                               |
| 0  | $3412,4 \pm 26,4$   | 100                               | 0                             |
| 10                                       | $3405,9 \pm 114,2$  | $93,9 \pm 5,0$                    | $6,1 \pm 5,0$                 |
| 50                                       | $3639,3 \pm 188,2$  | $99,5 \pm 2,0$                    | $0,5 \pm 2,0$                 |

Zvýšená exprese AKR1C3 souvisí s agresivitou různých onemocnění, jak hormonálně dependentních, tak hormonálně independentních karcinomů, jako například karcinomu prsu a prostaty. Významnou roli hraje AKR1C3 i u rakovin krve, plic, dělohy, mozku a ledvin. Dále je AKR1C3 vysoce exprimován při AML. (Birtwistle a kol. 2009, Hofman a kol. 2014, Zeng a kol. 2017)

V porovnání s ostatními inhibitory byla inhibiční aktivita TIR vůči AKR1C3 výraznější. Například buparlisib inhiboval při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  z 48,7 % a při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  inhiboval z 80,6 % (Büküm a kol. 2019). Velmi podobnou inhibiční aktivitu jako TIR vykazuje olaparib, který při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  inhibuje AKR1C3 ze 76,0 % a při 50  $\mu\text{mol/l}$  inhibuje z 91,4 % (Tavares a kol. 2020). Ve srovnání s ostatními BTK inhibitory (acalabrutinib a

ibrutinib) má TIR nižší inhibiční aktivitu. Acalabrutinib inhiboval enzym AKR1C3 při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  a 50  $\mu\text{mol/l}$  z 89,6 % a 96,3 %. Ibrutinib měl inhibiční aktivitu při 10  $\mu\text{mol/l}$  a 50  $\mu\text{mol/l}$  92,2 % a 96,4 % (Morell a kol. 2020). Dalším inhibitorem BTK je evobrutinib, který měl inhibiční aktivitu také lepší než TIR, ale lehce nižší než zbylé dva BTK inhibitory. Při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byla inhibice 82,66 % a při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  byla inhibiční aktivita 93,56 % (Zenkerová 2021).

## 4.2 Stanovení hodnoty inhibiční koncentrace

Z celkového množství pěti testovaných CRE, vykazoval TIR výraznou inhibiční aktivitu pouze vůči AKR1C3. Proto byly další experimenty prováděny jenom s tímto enzymem. V dalším kroku byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ . Hodnota  $IC_{50}$  určuje koncentraci inhibitoru, který inhibuje reakci z 50 %, tedy dojde k poklesu aktivity enzymu na polovinu. Je podstatné, aby hodnota  $IC_{50}$  byla co nejnižší. Při nízké hodnotě  $IC_{50}$  je možné zvýšit koncentraci inhibitoru pro jeho vyšší účinnost. Je důležité, aby se při podání inhibitoru nesnížila koncentrace pod hodnotu  $IC_{50}$ , jelikož je tento inhibitor v průběhu času odbouráván. Pro získání hodnoty  $IC_{50}$  byly výsledné koncentrace inhibitoru v reakční směsi (100  $\mu\text{l}$ ) následovně 0,1  $\mu\text{mol/l}$ , 0,5  $\mu\text{mol/l}$ , 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 50  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$ . Měření  $IC_{50}$  probíhalo stejnou metodou inkubace a pomocí UHPLC jako při základním screeningu. Pro nejlepší výsledky byl experiment pro určení hodnoty  $IC_{50}$  proveden třikrát v triplicátu.

V prvním experimentu vyšla hodnota  $IC_{50}$  4,406  $\mu\text{mol/l}$ , 95% konfidenční interval 4,084 – 4,753  $\mu\text{mol/l}$ .

V druhém experimentu byla hodnota  $IC_{50}$  3,035  $\mu\text{mol/l}$  a 2,695 – 3,418  $\mu\text{mol/l}$ .

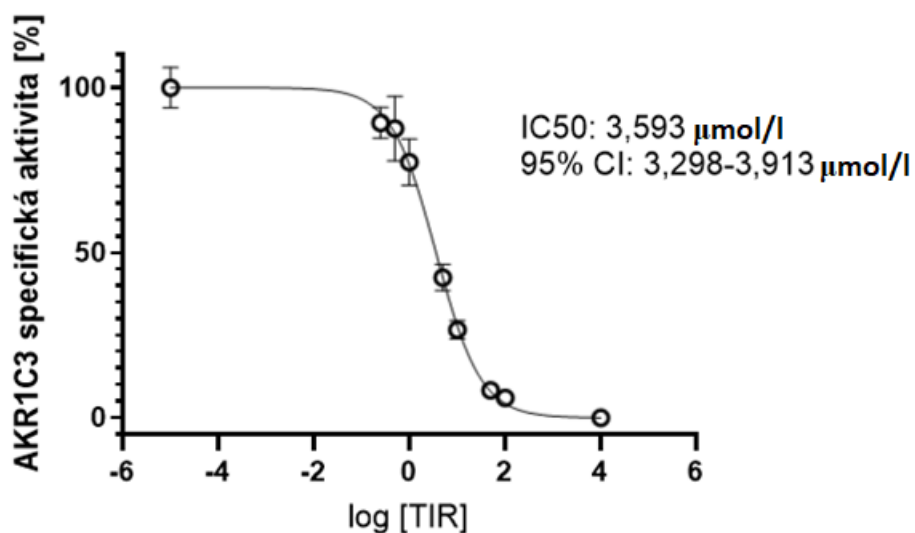
V posledním experimentu byly hodnoty  $IC_{50}$  velmi podobné, a to konkrétně 3,282  $\mu\text{mol/l}$  a 3,018 – 3,569  $\mu\text{mol/l}$ .

Výsledky všech tří experimentů byly následně zprůměrovány, znázorněno na Obrázku 7, takže výsledné průměrné hodnoty  $IC_{50}$  pro TIR a enzym AKR1C3 byly 3,59  $\mu\text{mol/l}$  a 3,30 – 3,91  $\mu\text{mol/l}$ .

**Tabulka 6** Příklady inhibitorů a jejich hodnota IC<sub>50</sub>

| inhibitor   | hodnota IC <sub>50</sub> (μmol/l) | publikace           |
|-------------|-----------------------------------|---------------------|
| buparlisib  | 9,51                              | Büküm a kol. 2019   |
| olaparib    | 2,48                              | Tavares a kol 2020  |
| evobrutinib | 1,72                              | Zenkerová 2021      |
| indometacin | 0,10                              | Liedtke a kol. 2013 |
| dinaciklib  | 0,23                              | Novotná a kol. 2018 |

Z Tabulky 6 je zřejmé že inhibitor buparlisib měl oproti TIR vysokou hodnotu IC<sub>50</sub>. Olaparib si vůči TIR vedl o něco lépe, jelikož jeho hodnota byla nižší. Nižší hodnoty, než u TIR byly také zaznamenány např. u indometacinu a dinaciklibu. U inhibitoru, který se také řadí do druhé generace Brutonových tyrosin kinas, evobrutinibu byla hodnota IC<sub>50</sub> zdatelně lepší než u TIR. Inhibitory BTK ibrutinib a acalabrutinib byly již testovány na buněčných liniích HCT116. U ibrutinibu byla hodnota IC<sub>50</sub> 0,30 μmol/l a u acalabrutinibu vyšla hodnota IC<sub>50</sub> 0,29 μmol/l. (Morell a kol. 2020)



**Obrázek 17** Závislost specifické aktivity enzymu AKR1C3 na logaritmicke koncentraci TIR

IC<sub>50</sub> – koncentrace inhibitoru, při kterém je aktivita enzymu snížena na 50 %, CI – konfidenční interval s konfidenční hladinou 95 %. Graf byl vytvořen z průměrů výsledků jednotlivých triplikátů

### 4.3 Typ inhibice

Posledním krokem bylo stanovení typu inhibice a inhibiční konstanty TIR vůči enzymu AKR1C3. Určení typu inhibice a hodnoty  $K_i$  bylo provedeno pomocí závislosti hodnot specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci inhibitoru a substrátu a pomocí dvojité reciprokého grafického zobrazení dle Lineweavera-Burka. Grafické závislosti byly sestaveny pomocí GraphPadu. Typ inhibice je znázorněn na grafu prostřednictvím protnutí přímek buď na ose x nebo na ose y. Pokud dojde k protnutí přímek na ose x, jedná se o nekompetitivní inhibici. Dojde-li k protnutí přímek na ose y, inhibice je kompetitivní. U kompetitivní inhibice inhibitor soutěží se substrátem o aktivní místo enzymu. Tento typ inhibice není vhodný, jelikož by vyšší koncentrace substrátu mohla z vazebného místa vytěsňovat inhibitor a muselo by dojít ke zvýšení terapeutických dávek inhibitoru. Vyšší terapeutické dávky inhibitoru by mohly mít negativní vliv na pacienta. Vhodnější variantou je inhibice nekompetitivní. U nekompetitivní inhibice nedochází ke vzájemnému soupeření o aktivní místo. Substrát se naváže na vazebné místo a inhibitor se váže na enzym jinde. Svou vazbou upraví strukturu enzymu tak, že zpomalí přeměnu substrátu na produkt. Vyšší koncentrace substrátu neovlivní inhibici inhibitoru. Přímkami znázorňují různé koncentrace inhibitoru a také je zde přímka charakterizující nulovou aktivitu TIR, jedná se o DMSO kontrolu. Dalším způsobem, jak lze zjistit typ inhibice, je pomocí hodnot  $V_{max}$  a  $K_m$ . Snižující se hodnota  $V_{max}$  a konstantní  $K_m$  charakterizuje nekompetitivní reakci a zvyšující se  $K_m$  a konstantní  $V_{max}$  znázorňuje inhibici kompetitivní (McIlwain 1986, Strelow a kol. 2012). Hodnoty Michaelisovy konstanty, maximální rychlosti reakce a inhibiční konstanty pro různé koncentrace TIR jsou vypsány v Tabulce 5.

**Tabulka 7** Hodnoty Michaelisovy konstanty, maximální rychlosti reakce a inhibiční konstanty pro různé koncentrace TIR

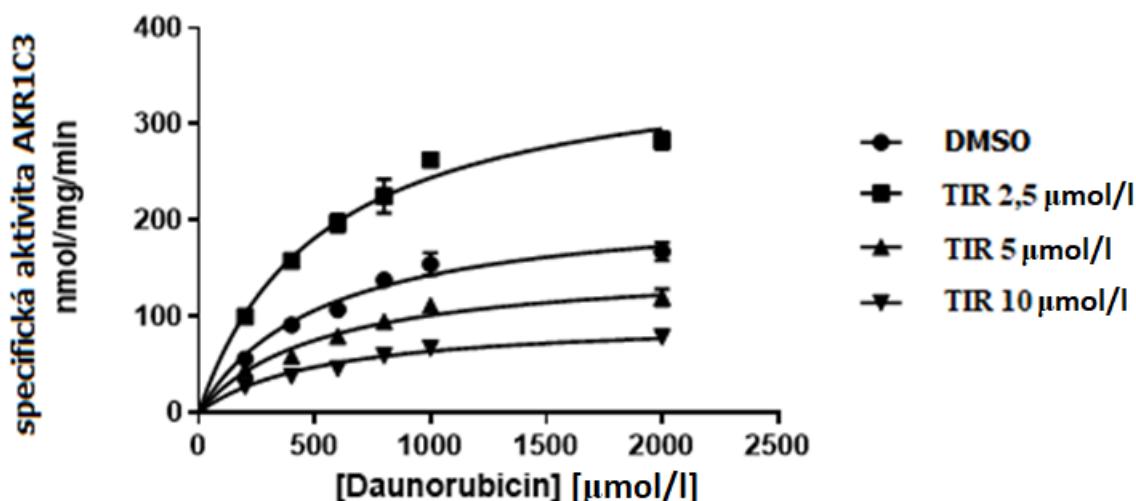
| Tirabrutinib ( $\mu\text{mol/l}$ ) | $V_{max}$ (nmol/min/mg) | $K_m$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) | $K_i$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>experiment 1</b>                |                         |                             |                             |
| 0 (DMSO kontrola)                  | $221,2 \pm 10,9$        | $221,6 \pm 43,1$            |                             |
| 2,5                                | $155,7 \pm 6,1$         | $349,2 \pm 42,4$            | $3,5 \pm 0,1$               |
| 5                                  | $108,4 \pm 3,1$         | $326,4 \pm 30,3$            |                             |
| 10                                 | $77,7 \pm 4,8$          | $496,0 \pm 80,1$            |                             |
| <b>experiment 2</b>                |                         |                             |                             |
| 0 (DMSO kontrola)                  | $366,4 \pm 14,5$        | $502,9 \pm 52,2$            |                             |
| 2,5                                | $223,4 \pm 12,1$        | $561,8 \pm 75,8$            | $3,9 \pm 0,2$               |

**Tabulka 7** – pokračování – Hodnoty Michaelisovy konstanty, maximální rychlosti reakce a inhibiční konstanty pro různé koncentrace TIR

|    |             |              |
|----|-------------|--------------|
| 5  | 160,2 ± 8,8 | 573,4 ± 77,7 |
| 10 | 106,2 ± 5,3 | 675,2 ± 77,8 |

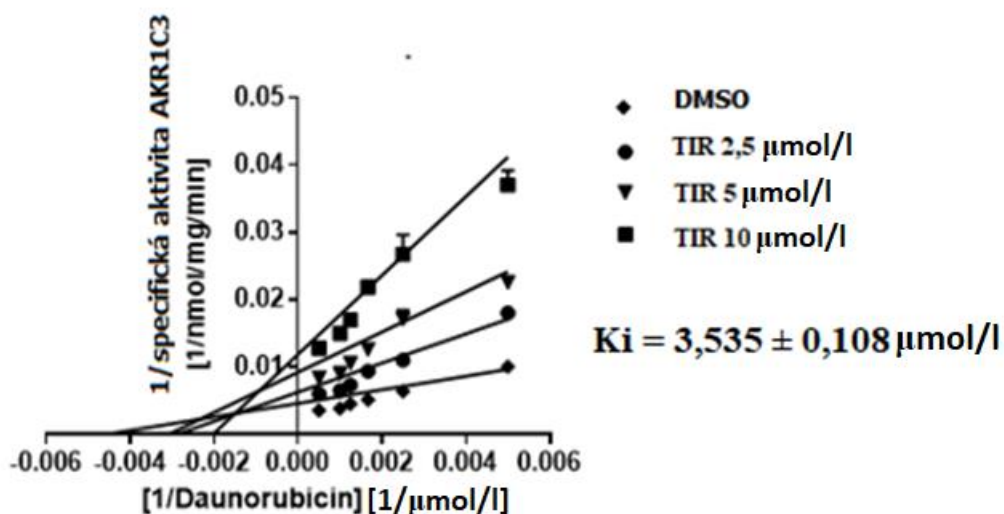
Při experimentu byly využity tři různé koncentrace TIR (2,5 µmol/l, 5 µmol/l, 10 µmol/l) a šest různých koncentrací DAUN (200 µmol/l, 400 µmol/l, 600 µmol/l, 800 µmol/l, 1 000 µmol/l, 2 000 µmol/l). Probíhaly 2 na sobě nezávislé experimenty v triplicátu viz Obrázek 18–21. V obou případech se jednalo o smíšenou inhibici, jelikož nedošlo k protnutí ani na ose x ani na ose y. Avšak z grafického zobrazení je zřejmé, že protnutí je blíže k ose x, proto se dá říct, že se jednalo o smíšenou inhibici se sklonem k inhibici nekompetitivní. Tento výsledek je terapeuticky výhodný, jelikož v případě nutnosti zvýšit dávky DAUN, nebude zapotřebí zvýšit dávky TIR, jelikož zvýšením koncentrace substrátu nelze ovlivnit inhibici.

Z grafů byla dále zjištěna inhibiční konstanta, která charakterizuje vztah mezi enzymem a inhibitorem. Čím menší je hodnota inhibiční konstanty, tím silnější je inhibitor. Inhibiční konstanta TIR nabývala hodnot 3,535 a 3,996 µmol/l. U buparlisibu, který se řadí mezi nekompetitivní inhibitory, vyšla inhibiční konstanta 14 µmol/l (Büküm a kol. 2019). Byla tedy vyšší než u TIR. V porovnání s TIR měl inhibitor evobrutinib hodnotu  $K_i$  o polovinu nižší. Hodnota byla 1,81 µmol/l a tudíž se dá říci, že se jedná o potenciálně klinicky významnou hodnotu. Evobrutinib vykazoval jednoznačnou nekompetitivní inhibici. (Zenkerová 2021) Podle studie Morell a kol. 2020 se u acarabrutinibu a ibrutinibu jednalo o nekompetitivní/smíšenou inhibici. Z hodnot  $K_i$  TIR se dá říct, že se jedná o silný inhibitor.



**Obrázek 18** Grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN

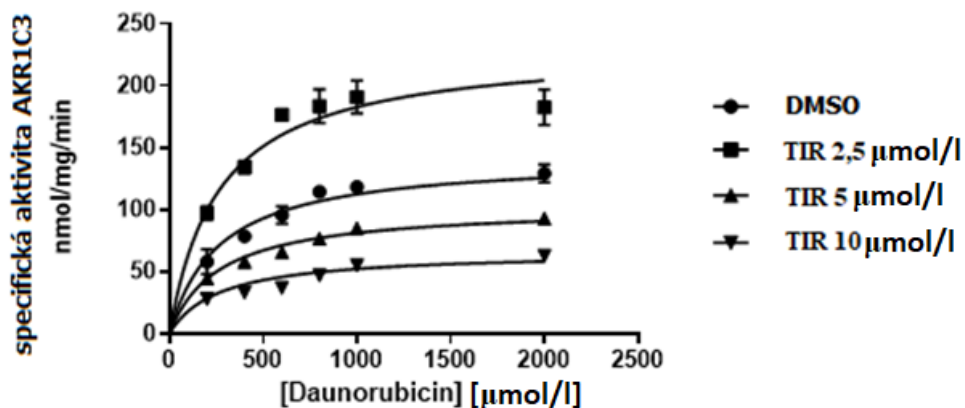
DMSO – nulová koncentrace TIR; nahrazení inhibitoru DMSO, TIR 2,5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 10  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .



**Obrázek 19** Reciproké grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN

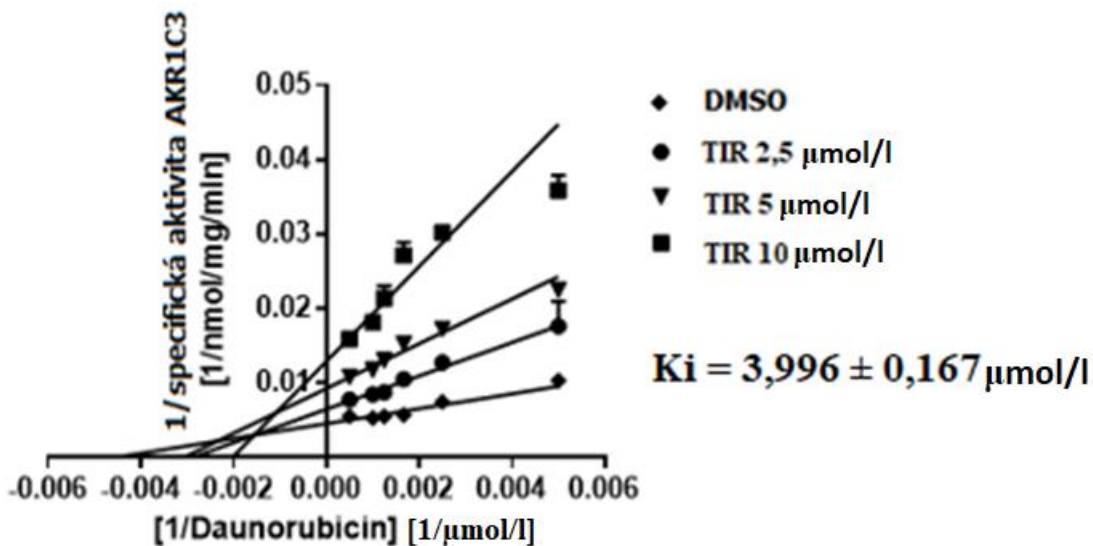
DMSO – nulová koncentrace TIR; nahrazení inhibitoru DMSO, TIR 2,5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 10  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ ,  $K_i$  – inhibiční konstanta.





**Obrázek 20** Grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN

DMSO – nulová koncentrace TIR; nahrazení inhibitoru DMSO, TIR 2,5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 10  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ .



**Obrázek 21** Reciproké grafické zobrazení závislosti specifické aktivity enzymu AKR1C3 na koncentraci TIR a DAUN

DMSO – nulová koncentrace TIR; nahrazení inhibitoru DMSO, TIR 2,5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 5  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 5  $\mu\text{mol/l}$ , TIR 10  $\mu\text{mol/l}$  – reakce s TIR o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$ ,  $K_i$  – inhibiční konstanta.

Táto práce byla první částí rozsáhlé studie a na její výsledky budou navazovat další experimenty. Podobně jako v již publikovaných člancích bude po otestování vztahu enzym-inhibitor v podmínkách *in vitro* navazovat výzkum na buněčných liniích. V první řadě to budou linie HCT116, které přirozeně tyto enzymy neexprimují. Následně linie izolované od pacienta s nádorovým onemocněním (KG1 $\alpha$ ), kde už je přirozená zvýšená exprese těchto enzymů (Tavares a kol. 2020).

## 5 Závěr

Byl testován vliv Brutonovy tyrosin kinasy inhibitoru tirabrutinibu na aktivitu karbonylredukujících enzymů. Jejich zvýšená exprese u nádorových onemocnění může být příčinou vzniku rezistence nádorových buněk na podávané terapeutikum, nejčastěji na anthracyklinová antibiotika (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin a idarubicin). V této práci byly testované enzymy z nadrodiny AKR (1A1, 1B1, 1B10, 1C3) a z nadrodiny SDR (CBR1) při redukci daunorubicinu na daunorubicinol *in vitro*. Nejvíce byl TIR inhibován enzym AKR1C3 (při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byla inhibice 73,2 %). U ostatních enzymů byla inhibiční aktivita TIR minimální až nulová.

U enzymu AKR1C3 byla následně stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$ . Průměrná naměřená hodnota byla 3,593  $\mu\text{mol/l}$  a 95% konfidenční interval vyšel 3,298 – 3,913  $\mu\text{mol/l}$ .

Průměrná hodnota inhibiční konstanty TIR byla 3,766  $\mu\text{mol/l}$ . Grafickým znázorněním závislosti specifické aktivity enzymu na měnící se koncentraci inhibitoru a substrátu byl zjištěn smíšený typ inhibice se sklonem k nekompetitivní inhibici. TIR se tak ukazuje být slibným inhibitorem při léčbě rezistence nádorových buněk na terapii anthracykliny. K potvrzení tohoto předpokladu je však potřebný další výzkum. Proto výsledky této studie budou použité při plánování dalších experimentů, a to při testování vlivu TIR na aktivitu AKR1C3 na úrovni buněčných linií.

## SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. Bains, O. S., Grigliatti, T. A., Reid, R. E., & Riggs, K. W. (2010). Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335(3), 533–545. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173179>
2. Bains, O. S., Szeitz, A., Lubieniecka, J. M., Cragg, G. E., Grigliatti, T. A., Riggs, K. W., & Reid, R. E. (2013). A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 347(2), 375–387. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.206805>
3. Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews*, 40(4), 553–624. <https://doi.org/10.1080/03602530802431439>
4. Birtwistle, J., Hayden, R. E., Khanim, F. L., Green, R. M., Pearce, C., Davies, N. J., Wake, N., Schrewe, H., Ride, J. P., Chipman, J. K., & Bunce, C. M. (2009). The aldo-keto reductase AKR1C3 contributes to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-3,4-dihydrodiol mediated oxidative DNA damage in myeloid cells: implications for leukemogenesis. *Mutation research*, 662(1-2), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.12.010>
5. Büküm, N., Novotná, E., Morell, A., Hofman, J., & Wsol, V. (2019). Buparlisib is a novel inhibitor of daunorubicin reduction mediated by aldo-keto reductase 1C3. *Chemico-biological interactions*, 302, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.026>
6. Büküm, N., Novotná, E., Morell, A., Želazková, J., Laštovičková, L., Čermáková, L., Portillo, R., Solich, P., & Wsól, V. (2021). Inhibition of AKR1B10-mediated metabolism of daunorubicin as a novel off-target effect for the Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor dasatinib. *Biochemical pharmacology*, 192, 114710. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114710>

7. Burger J. A. (2019). Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors: Present and Future. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 25(6), 386–393.  
<https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000412>
8. Byrns, M. C., Jin, Y., & Penning, T. M. (2011). Inhibitors of type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 125(1-2), 95–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.004>
9. Cardinale, D., Iacopo, F., & Cipolla, C. M. (2020). Cardiotoxicity of Anthracyclines. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 7, 1–26.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00026>
10. Carlquist, M., Frejd, T., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2008). Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1. *Chemico-biological interactions*, 174(2), 98–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.021>
11. DeGraff, W., Hahn, S. M., Mitchell, J. B., & Krishna, M. C. (1994). Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochemical pharmacology*, 48(7), 1427–1435. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90567-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90567-3)
12. Dönmez, Y., & Gündüz, U. (2011). Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 65(2), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.12.007>
13. Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P., & Parissenti, A. M. (2015). Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current drug metabolism*, 16(6), 412–426.  
<https://doi.org/10.2174/1389200216888150915112039>

14. Gewirtz D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 727–741. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4)
15. Goldmann, L., Duan, R., Kragh, T., Wittmann, G., Weber, C., Lorenz, R., von Hundelshausen, P., Spannagl, M., & Siess, W. (2019). Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors block activation of the platelet Fc receptor CD32a (FcγRIIA): a new option in HIT? *Blood advances*, 3(23), 4021–4033. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000617>
16. Henriksen P. A. (2018). Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart (British Cardiac Society)*, 104(12), 971–977. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-312103>
17. Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metabolism reviews*, 39(1), 87–144. <https://doi.org/10.1080/03602530600969440>
18. Hofman, J., Malcekova, B., Skarka, A., Novotna, E., & Wsol, V. (2014). Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and applied pharmacology*, 278(3), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.027>
19. Hortobágyi G. N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, 54 Suppl 4, 1–7. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700544-00003>
20. Lee, J. H., & Berger, J. M. (2019). Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *genes*, 10(11), 1–31. <https://doi.org/10.3390/genes10110859>

21. Liedtke, A. J., Adeniji, A. O., Chen, M., Byrns, M. C., Jin, Y., Christianson, D. W., Marnett, L. J., & Penning, T. M. (2013). Development of potent and selective indomethacin analogues for the inhibition of AKR1C3 (Type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase) in castrate-resistant prostate cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 56(6), 2429–2446. <https://doi.org/10.1021/jm3017656>
22. Marinello, J., Delcuratolo, M., & Capranico, G. (2018). Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to new perspectives. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 34-80. <https://doi.org/10.3390/ijms19113480>
23. Maser E. (1995). Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. *Biochemical pharmacology*, 49(4), 421–440. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)00330-o](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)00330-o)
24. Matsunaga, T., Shintani, S., & Hara, A. (2006). Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21(1), 1–18. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.1>
25. Matsunaga, T., Yamaguchi, A., Morikawa, Y., Kezuka, C., Takazawa, H., Endo, S., El-Kabbani, O., Tajima, K., Ikari, A., & Hara, A. (2014). Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anti-cancer drugs*, 25(8), 868–877. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000112>
26. McGowan, J. V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J. M., & Yellon, D. M. (2017). Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular drugs and therapy*, 31(1), 63–75. <https://doi.org/10.1007/s10557-016-6711-0>
27. McIlwain H. (1986). The origin and use of the terms competitive and non-competitive in interactions among chemical substances in biological systems. *Essays in biochemistry*, 22, 158–186.

28. Menna, P., & Salvatorelli, E. (2017). Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. *Chemotherapy*, *62*(3), 159–168. <https://doi.org/10.1159/000455823>
29. Megias-Vericat, J. E., Martinez-Cuadron, D., Herrero, M. J., Alino, S. F., Poveda, J. L., Sanz, M. A., & Montesinos, P. (2018). Pharmacogenetics of Metabolic Genes of Anthracyclines in Acute Myeloid Leukemia. *Current drug metabolism*, *19*(1), 55–74. <https://doi.org/10.2174/1389200218666171101124931>
30. Mordente, A., Meucci, E., Silvestrini, A., Martorana, G. E., & Giardina, B. (2009). New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Current medicinal chemistry*, *16*(13), 1656–1672. <https://doi.org/10.2174/092986709788186228>
31. Morell, A., Čermáková, L., Novotná, E., Laštovičková, L., Haddad, M., Haddad, A., Portillo, R., & Wsól, V. (2020). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3. *Cancers*, *12*(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers12123731>
32. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, *56*(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
33. Novotná, E., Büküm, N., Hofman, J., Flaxová, M., Kouklíková, E., Louvarová, D., & Wsól, V. (2018). Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile. *Archives of toxicology*, *92*(9), 2845–2857. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2258-0>
34. Novotná, E., Morell, A., Büküm, N., Hofman, J., Danielisová, P., & Wsól, V. (2020). Interactions of antileukemic drugs with daunorubicin reductases: could reductases affect the clinical efficacy of daunorubicin chemoregimens? *Archives of toxicology*, *94*(9), 3059–3068. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02818-y>



35. Penning, T. M., Steckelbroeck, S., Bauman, D. R., Miller, M. W., Jin, Y., Peehl, D. M., Fung, K. M., & Lin, H. K. (2006). Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors. *Molecular and cellular endocrinology*, 248(1-2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.009>
36. Penning T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*, 234, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>
37. Persson, B., & Kallberg, Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-biological interactions*, 202(1-3), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.11.009>
38. PubChem: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 54755438, Tirabrutinib. Retrieved April 14, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tirabrutinib>
39. Oppermann, U. C., & Maser, E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144(1-3), 71–81. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00192-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00192-4)
40. Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., & Jörnvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions*, 143-144, 247–253. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00164-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00164-3)
41. Rosemond, M. J., & Walsh, J. S. (2004). Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug metabolism reviews*, 36(2), 335–361. <https://doi.org/10.1081/dmr-120034154>
42. Saleem T, Kasi A. Daunorubicin. [Updated 2021 Sep 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559073/>

43. Si, J. N., Yan, R. X., Wang, C., Zhang, Z., & Su, X. D. (2009). TIM-Finder: a new method for identifying TIM-barrel proteins. *BMC structural biology*, *9*, 1–73. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-73>
44. Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J., & Weidner, J. (2012). Mechanism of Action Assays for Enzymes. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
45. Takemura, M., Endo, S., Matsunaga, T., Soda, M., Zhao, H. T., El-Kabbani, O., Tajima, K., Inuma, M., & Hara, A. (2011). Selective inhibition of the tumor marker aldo-keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *Journal of natural products*, *74*(5), 1201–1206. <https://doi.org/10.1021/np200118q>
46. Tavares, T. S., Hofman, J., Lekešová, A., Želazková, J., & Wsól, V. (2020). Olaparib Synergizes the Anticancer Activity of Daunorubicin via Interaction with AKR1C3. *Cancers*, *12*(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers12113127>
47. Varatharajan, S., Abraham, A., Zhang, W., Shaji, R. V., Ahmed, R., Abraham, A., George, B., Srivastava, A., Chandy, M., Mathews, V., & Balasubramanian, P. (2012). Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *European journal of clinical pharmacology*, *68*(12), 1577–1586. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1291-9>
48. Vejpongsa, P., & Yeh, E. T. (2014). Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, *64*(9), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>
49. Wang, R., Wang, G., Ricard, M. J., Ferris, B., Strulovici-Barel, Y., Salit, J., Hackett, N. R., Gudas, L. J., & Crystal, R. G. (2010). Smoking-induced upregulation of AKR1B10 expression in the airway epithelium of healthy individuals. *Chest*, *138*(6), 1402–1410. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2634>

50. Zeng, C. M., Chang, L. L., Ying, M. D., Cao, J., He, Q. J., Zhu, H., & Yang, B. (2017). Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, 8, 119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00119>
51. Zenkerová, Katharina. Vliv evobrutinibu na rezistenci nádorových buněk k daunorubicinu způsobenou enzymy redukujícími karbonylové skupiny [online]. Hradec Králové 2021 [cit. 2022-04-27]. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D. Dostupné z: [150054324.pdf\(cuni.cz\)](https://150054324.pdf(cuni.cz))
52. Zhang, J., Cui, X., Yan, Y., Li, M., Yang, Y., Wang, J., & Zhang, J. (2016). Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *American journal of translational research*, 8(7), 2862–2875.
53. Zhong, L., Shen, H., Huang, C., Jing, H., & Cao, D. (2011). AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicology and applied pharmacology*, 255(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.014>