UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

INTERAKCE PŘÍRODNÍCH LÁTEK S LIDSKOU ALDO-KETOREDUKTASOU 7A2 A DALŠÍMI VÝZNAMNÝMI KARBONYLREDUKUJÍCÍMI ENZYMY

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Andrea Homerová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Andrea Homerová

Hradec Králové 2019

.....

Ďakujem vedúcej práce RNDr. Eve Novotnej, PhD. za odborné vedenie, hodnotné poskytnuté rady a pomoc pri vypracovaní tejto diplomovej práce a vyhodnocovaní výsledkov.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Andrea Homerová
Školitel: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.
Název diplomové práce: Interakce přírodních látek s lidskou aldo-ketoreduktasou 7A2 a dalšími významnými karbonylredukujícími enzymy

Redukcia karbonylovej skupiny patrí medzi základné reakcie prvej fáze metabolizmu, ktorá spôsobuje zvýšenie hydrofility, umožňuje konjugáciu molekuly v procese metabolizmu, exkréciu zlúčeniny z organizmu, dochádza k zníženiu reaktivity a biologickej aktivity molekuly. Tejto reakcii podliehajú zlúčeniny endogénneho aj exogénneho pôvodu a zabezpečujú ju karbonylredukujúce enzýmy. Tieto enzýmy delíme na základe štruktúry do skupín dehydrogenáz/reduktáz s krátky reťazcom, dehydrogenáz/reduktáz so stredne dlhým reťazcom, aldo-ketoreduktáz alebo chinónreduktáz. Inhibícia karbonylredukujúcich enzýmov sa javí ako sľubný cieľ pre výskum. Je dôležité si uvedomiť, že inhibíciou karbonylredukujúcich enzýmov je možné znížiť produkciu menej účinných metabolitov substrátov, ako je tomu napríklad u antracyklínových chemoterapeutík daunorubicínu a doxorubicínu, čo by mohlo zmeniť terapiu nádorových ochorení.

Táto práca bola zameraná na zistenie inhibičnej aktivity prírodných látok zo skupiny flavonoidov a alkaloidov. Na porovnanie inhibície bola využitá redukčná reakcia protinádorového liečiva daunorubicínu na jeho metabolit daunorubicinol, ktorý je podozrelý z vyššej kardiotoxicity. Na vyhodnotenie výsledkov bola využitá UHPLC analýza a u najvýznamnejšieho inhibítoru bola stanovená hodnota IC_{50}.

ABSTRACT

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

Candidate: Andrea Homerová
Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.
Title of diploma thesis: Interaction of natural substances with human aldo-keto reductase 7A2 and other important carbonyl reducing enzymes

Reduction of carbonyl group is one of the phase I metabolism reactions, which is responsible for production of more polar metabolites, enables conjugation in process of biotransformation, excretion of the molecule and it also causes decrease in reactivity and biological activity of the molecule. Endogenous as well as exogenous compounds undergo this reaction and carbonyl reducing enzymes are the ones which possess this reducing activity. Based on the structure, we can divide the enzymes into several groups: short-chain dehydrogenases/reductases, medium-chain dehydrogenases/reductases, aldo-keto reductases and quinone reductases. Inhibition of carbonyl reducing enzymes appears to be a promising aim of research. It is important to take into consideration that by inhibiting carbonyl reducing enzymes it is possible to reduce production of less active, but more toxic metabolites, for example in anthracycline chemoteraputics daunorubicin and doxorubicin and that can lead to change in therapy of cancer.

This study focused on determination of inhibition activity of natural compounds from flavonoid and alkaloid structural groups. The reducing reaction of anticancer drug daunorubicin to its more toxic metabolite daunorubicinol was used to compare the inhibiting activity. To analyse the results, UHPLC analysis was performed and the IC_{50} was established for the most significant inhibitor.

Obsah

1. ÚVOD

Hneď po kardiovaskulárnych ochoreniach sa na druhom mieste v príčinách úmrtia s podielom 20–25 % umiestňujú nádorové ochorenia (Ondrušová 2007).

Medzi liečivá s najširším pôsobením voči týmto ochoreniam patria antracyklínové chemoterapeutiká, u ktorých sa však stretávame s obmedzeniami ako sú toxicita metabolitov (hlavne kardiotoxicita) a rozvoj rezistencie počas liečby. Jedným z možných prístupov ako ovplyvniť tieto nežiaduce účinky je inhibícia redukcie týchto liečiv na ich menej účinné metabolity. Práve z tohto dôvodu je vhodné skúmať látky s inhibičným potenciálom voči karbonylredukujúcim enzýmom, ktoré sa v organizme podieľajú na metabolizme endogénnych látok ale aj xenobiotík.

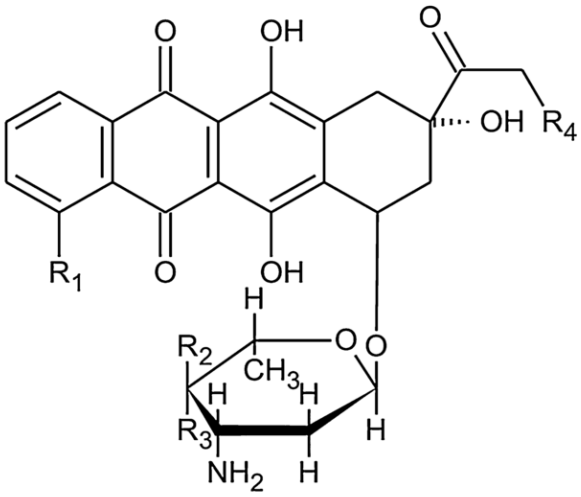
Táto práca bola zameraná na skúmanie potenciálnych inhibítorov z prírodných zdrojov. Aj keď tieto prírodné látky nepreukážu ideálne inhibičné vlastnosti, je možné, že povedú k odhaleniu nového štrukturálneho typu liečiv, ktoré povedú k syntéze derivátov s optimálnymi vlastnosťami.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. ANTRACYKLÍNY

Antracyklíny sú skupinou protinádorových liečiv s najširším spektrom pôsobenia proti nádorom v ľudskom tele. Iba niektoré druhy (ako napríklad nádor hrubého čreva) nie sú responzívne na ich pôsobenie (Weiss 1992).

Pomenovanie antracyklíny je odvodený od štruktúry, ktorá je tvorená antrachinónovým chromofórom blízkym tetracyklínom (Obr. 1) (Minotti a kol. 2004).



Doxorubicin:	R_1= -OCH_3	R_2= -H	R_3= -OH	R_4= -OH
Daunorubicin:	R_1= -OCH_3	R_2= -H	R_3= -OH	R_4= -H
Epirubicin:	R_1= -OCH_3	R_2= -OH	R_3= -H	R_4= -OH
Idarubicin:	R_1= -H	R_2= -H	R_3= -OH	R_4= -H

Obr. 1 Obecná štruktúra antracyklínov a štruktúra základných zlúčenín tejto skupiny (prevzaté z Crotti a kol. 2015)

Prvé dva antracyklíny boli objavené v šesťdesiatych rokoch 20. storočia. Daunorubicín (DAU) sa od doxorubicínu (DOX) líši iba jednou hydroxylovou skupinou (Weiss 1992).

Doxorubicín je využívaný na liečbu solídnych tumorov, ako napríklad tých, ktoré vznikajú v prsnom tkanive, žlčovodoch, tkanive maternice, pažeráku a pečene, ďalej pri boji s osteosarkómom, sarkómom mäkkého tkaniva alebo non-Hodgkinovým lymfómom.

Na rozdiel od toho, daunorubicín je primárne využívaný v terapii akútnej myeloidnej leukémie (Gewirtz 1999).

Počas nasledujúcich rokov bola celosvetová snaha vedcov objaviť analógy s menšou akútnou toxicitou, hlavne nižším výskytom kardiomyopatie, analógy, ktoré môžu byť podané perorálne a/alebo analógy, ktoré majú väčší alebo rozdielny protinádorový efekt. Žiaden z týchto analógov nepreukázal vyššiu účinnosť, avšak vykazujú rozdielnu toxicitu (Weiss 1992). Medzi tieto analógy patrí napríklad idarubicín, odvodený od štruktúry daunorubicínu, u ktorého je možná perorálna aplikácia. Idarubicín vykazuje vyššiu aktivitu voči akútnej myeloidnej leukémii. Tiež sa využíva v terapii prsných nádorov či non-Hodgkinovho lymfómu (Minotti a kol. 2004). Zaujímavé je, že zvýšenú kardiotoxicitu vykazujú redukčné metabolity v porovnaní s parentnými látkami. Avšak výsledky zaoberajúce sa toxicitou antracyklínov nie sú konzistentné (Forrest a kol. 2000).

V súčasnosti je za hlavný mechanizmus účinku považovaná inhibícia topoizomerázy II (Deweese a Osheroff 2008). Účinok antracyklínových antibiotík je tiež pripisovaný ich interkalácii do štruktúry DNA. Mnoho autorov popisuje koreláciu medzi aktivitou (terapeutickou a biologickou) a afinitou látky k DNA alebo určitej sekvencii DNA (Aubel-Sadron a Londos-Gagliardi 1984).

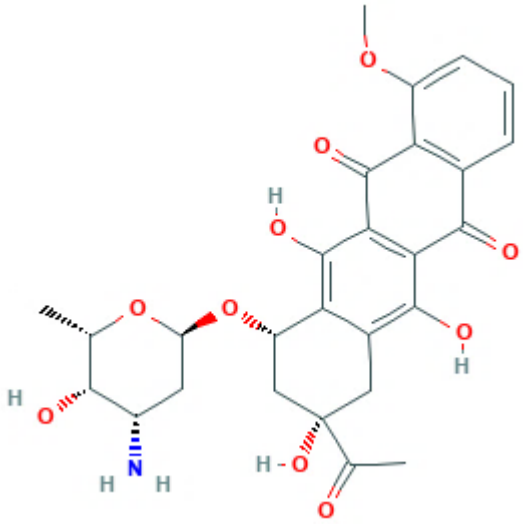
2.1.1. DAUNORUBICÍN

Pomenovanie daunorubicín vzniklo kombináciou názvov daunomycín a rubidomycín, ktoré popisujú rovnakú chemickú štruktúru, (7*S*,9*S*)-9-acetyl-7-[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-4-methoxy-8,10-dihydro-7*H*-tetracene-5,12-dion (Obr. 2). Daunomycín bol izolovaný v roku 1963 zo *Streptomyces paeucetius* výskumnou skupinou z Talianska. Názov rubidomycín pochádza od francúzskej výskumnej skupiny, ktorá izolovala tú istú zlúčeninu (Tan a kol. 1967).

Jedná sa o tradičné chemoterapeutikum, ktoré inhibuje nádorové bunky, zástavou ich proliferácie a/alebo indukciou apoptózy, čím zohráva kľúčovú úlohu v terapii leukémie (Zhou a kol. 2018).

Nanešťastie toxicita, ktorá súvisí s dávkou (pričom sa jedná hlavne o kardiotoxicitu) obmedzuje použitie daunorubicínu v klinickej praxi a komplikuje jeho praktické využitie (Valcovici a kol. 2016).

Počiatočné klinické štúdie daunorubicínu poskytli impulz pre ďalšie štúdium antracyklínových zlúčenín: bola zaznamenaná výrazná aktivita voči akútnej leukémii a detským solídnym tumorom, nanešťastie však bolo zaznamenané aj rozsiahle pole toxických účinkov zahŕňajúce napríklad hypopláziu kostnej drene, alopéciu a ireverzibilnú kardiomyopatiu (Muggia a Green 1991). Medzi vedľajšie nežiaduce účinky s nižším výskytom, ktoré stoja za zmienku sú napríklad nauzea a zvracanie. Vzhľadom k dlhému pretrvávaniu antracyklínov v pokožke dochádza k extravazácii, čo môže spôsobovať nekrózu tkaniva (Sonneveld a kol. 1984, Tan a kol. 1967).



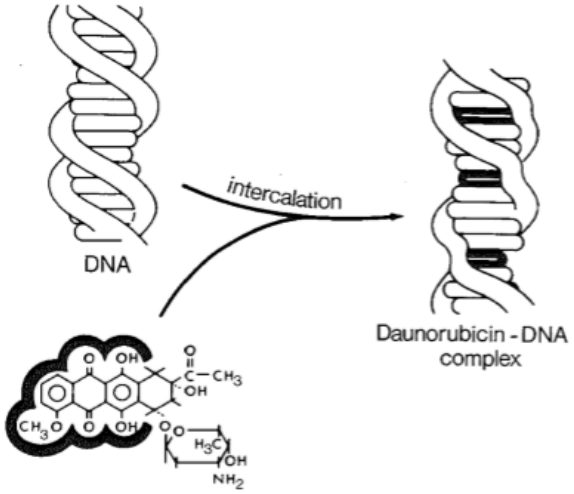
Obr. 2 Štruktúra daunorubicínu (prevzaté z *Internet 1)*

2.1.1.1. MECHANIZMUS ÚČINKU DAUNORUBICÍNU

Doposiaľ bolo popísaných niekoľko mechanizmov, ktorými daunorubicín eliminuje nádorové bunky a zároveň spôsobuje charakteristické toxické účinky.

1. Interakcia so syntézou DNA a RNA

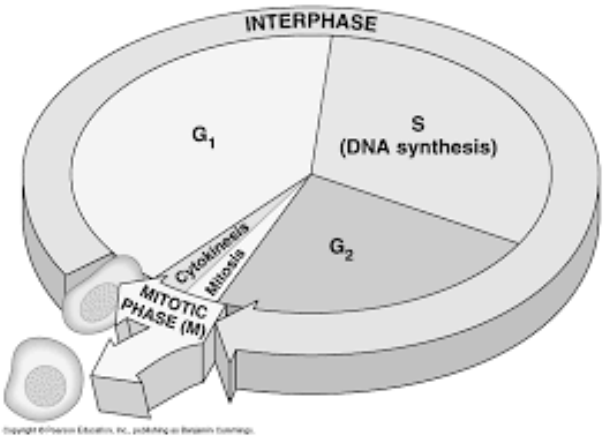
DNA ja považovaná za primárny cieľ pôsobenia daunorubicínu. Tak ako u všetkých antracyklínov dochádza k interkalácii molekuly do štruktúry DNA (Obr. 3) (Gewirtz 1999).



Obr. 3 Interkalácia molekuly daunorubicínu do molekuly DNA (prevzaté z Kokenberg 1991)

2. Interakcia s topoizomerázou II

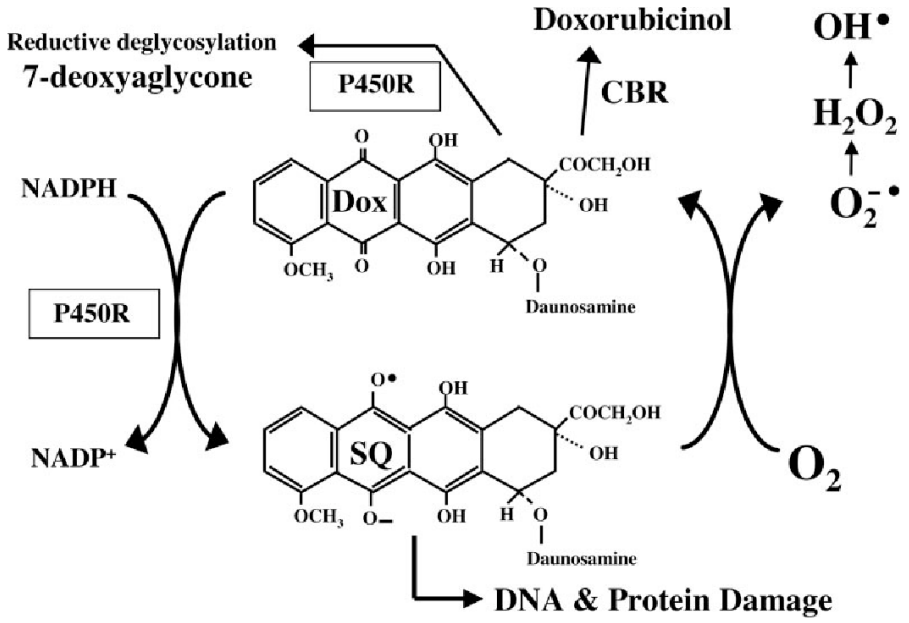
Zároveň daunorubicín, spolu s doxorubicínom a teniposidom, patrí medzi tri základné inhibítory topoizomerázy II (Hande 2008). Inhibíciou dochádza k zabráneniu opätovného spájania dvojvláknových zlomov v DNA a tým k akumulácii poškodenej DNA v bunke (Deweese a Osheroff 2009). Následne je poškodená DNA rozpoznaná ATM proteinkinázou (ataxia telangiectasia mutated protein kinase) v jadre, čo spôsobí zástavu bunečného cyklu vo fáze G2/M (Obr. 4) (Imai H. a kol. 2018).



Obr. 4 Schéma bunečného cyklu (prevzaté z *Internet 2*)

3. Tvorba voľných radikálov

Daunorubicín môže byť enzymaticky premenený na semichinónové voľné radikály, ktoré môžu ďalej dávať za vznik reaktívnym kyslíkovým radikálom ako sú napríklad superoxid, peroxid vodíku alebo hydroxylový radikál (Obr. 5). Tieto formy kyslíku môžu spôsobovať rozštiepenie vláken DNA a peroxidáciu lipidov, čo v konečnom dôsledku spôsobuje poškodenie membrán buniek a mitochondií (Halliwell a Gutteridge, 2007).



Obr. 5 Tvorba semichinónového radikálu (prevzaté z *Internet 3*)

4. Tvorba DNA aduktov

Bilardi a kol. (2012) uvádzajú ako ďalší z mechanizmov účinku tvorbu aduktov liečivo-DNA, ktoré sú ďalej stabilizované nekovalentnými vodíkovými väzbami s komplementárnym vlákonom DNA. Vo výsledku tento adukt pôsobí ako spojovací článok medzi vláknami DNA (nejedná sa o cross-linker, keďže nie sú viazané kovalentnými väzbami).

5. Ovplyvnenie apoptózy

V neposlednom rade je skúmaný vplyv antracyklínov na indukciu apoptózy. Skúmané sú mechanizmy súvisiace s ovplyvňovaním molekúl riadiacich bunečný cyklus alebo expresiu rastových faktorov. Ako príklad je možné uviesť súvislosť medzi antracyklínmi a proteínom p53 (Minotti a kol. 2004).

2.1.1.2. BIOTRANSFORMÁCIA DAUNORUBICÍNU

Daunorubicín je v organizme súčasne degradovaný niekoľkými metabolickými cestami. Hlavnými sú dvojelektrónová redukcia (uhlík C13), jednoelektrónová redukcia (uhlík C12) a redukčná deglykosylácia (uhlík C7) (Edwardson a kol. 2015).

- Dvojelektrónová redukcia

Hlavnou metabolickou dráhou je hydroxylácia na sekundárny alkohol, kedy dochádza k redukcii na postrannom karbonylovom reťazci (na uhlíku C13). Táto dvojelektrónová redukcia je katalyzovaná NADPH-dependentnými karbonylredukujúcimi enzýmami (CRE) (Megias-Vericat a kol. 2018).

- Jednoelektrónová redukcia

Pri jednoelektrónovej redukcii antracyklínov dochádza ku vzniku semichinónových radikálov. Tieto radikály môžu byť opäť reoxidované na pôvodnú antrycyklínovú štruktúru, pričom sa tvoria reaktívne formy kyslíka (ROS). Medzi najvýznamnejšie enzýmy účastniace sa tejto reakcie a vzniku semichinónových radikálov patria NDPH-ubichinon-oxidoreduktáza, NADPH-chinóndehydrogenáza (NQO1), xanthindehydrogenáza a NO syntáza 1, 2 a 3 (NOS1, NOS2, NOS3) (Megias-Vericat a kol. 2018).

- Redukčná deglykosilácia

Redukčná deglykosilácia je vedľajšia metabolická cesta, ktorej podiel na premene antracyklínov je približne 1–2 %. Môže prebiehať dvomi spôsobmi: redukcia za vzniku deoxyaglykónu alebo hydrolýza za vzniku hydroxyaglykónu. Na tomto spôsobe metabolizmu sa podieľajú enzýmy P450-oxidoreduktáza. P450-oxidoreduktáza je flavoproteín, ktorý prenáša elektróny z NADPH na cytochróm P450. Ďalšími dôležitými enzýmami sú xanthindehydrogenáza a NQO1 (Megias-Vericat a kol. 2018).

- Ďalšie enzýmy I. a II. fáze biotrasformácie

Na metabolizácii antracyklínov sa podieľajú aj ďalšie enzýmy, ktoré majú však iba minoritný efekt. Medzi enzýmy prvej fáze metabolizmu patria enzýmy z nadrodiny cytochrómu P450, ako príklad možno uviesť CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1. Ďalším enzýmom je aj alkoholdehydrogenáza (Megias-Vericat a kol. 2018).

Medzi enzýmy druhej fáze metabolizmu, ktoré sa účastnia transformácie antracyklínov radíme glutathion S-transferázu. Ďalej sem patria sulfotransferázy a ďalšie antioxidačné enzýmy ako mangán superoxiddismutáza, kataláza alebo gluthation peroxidáza (Megias-Vericat a kol. 2018).

2.1.2. KARDIOTOXICITA

Tak ako tomu býva i u iných cytostatík, antracyklíny vykazujú množstvo nežiaducich účinkov, medzi najčastejšie patria supresia kostnej drene a gastrointestinálne problémy ako nauzea a zvracanie (Muggia a Green 1991, Tan a kol. 1967). Jedným z najzávažnejších problémov však ostáva kardiotoxicita zapríčinená liečbou antracyklínmi. Metaanalýza randomizovaných klinických štúdií pre nádory pŕs, vaječníkov, lymfómov a osteosarkómov ukazuje, že antracyklíny v porovnaní s inými terapeutickými postupmi zvyšujú riziko klinickej kardiotoxicity 5,43-násobne, subklinickej kardiotoxicity 6,25-násobne a riziko srdečnej smrti 4,94-násobne (Smith a kol. 2010). Rizikové faktory pre rozvoj antracyklínmi indukovanej kardiotoxicity zahŕňajú kumulatívnu dávku, nižší vek, radiačnú terapiu v hrudnej oblasti a ženské pohlavie. Klinické štúdie tiež poukazujú na súvislosť medzi diagnózou Downov syndróm a kardiotoxicitou vyvolanou antracyklínmi v terapii leukémie (Krischer a kol. 1997, O'Brien a kol. 2008).

V súčasnosti rozlišujeme niekoľko typov takto zapríčinenej kardiotoxicity. „Akútna“ kardiotoxicita sa objavuje počas alebo okamžite po podaní cytostatika. Dochádza k nej zväčša pri rýchlom podaní infúzie a typicky zahŕňa vazodilatáciu, hypotenziu a poruchy srdečného rytmu (Ferrans a kol. 1997). „Subakútna“ kardiotoxicita sa takmer neobjavuje. Prejavuje sa 1 až 3 dni po podaní liečiva a bola častejšia v minulosti pri podávaní vysokých dávok antracyklínov (Hale a Lewis 1994). „Chronickú“ kardiotoxicitu je možné rozlíšiť na „včasnú,“ ktorá sa prejaví niekoľko týždňov až mesiacov po terapii (Ferrans a kol. 1997), alebo „oneskorenú,“ ktorej prejavy sa môžu

vyskytnúť po desaťročiach (Lipshultz a kol. 1991, Scully a Lipshultz 2007, Steinherz a Steinherz 1991).

Existuje niekoľko hypotéz, ktoré objasňujú mechanizmus toxického pôsobenia anthacyklínov na kardiomyocyty. Najčastejšie sa uvádza vplyv voľných kyslíkových radikálov (ROS), ktorých vznik je katalyzovaný železom. Antracyklíny sú schopné produkovať ROS niekoľkými spôsobmi. Jedným je redukcia na kruhu C, čo vedie k tvorbe semichinónového radikálu, ktorý predáva svoj voľný elektrón najčastejšie kyslíku, pričom vzniká superoxidový radikál. Superoxidový radikál je v bunke zneškodnený dismutáciou na peroxid vodíka, ktorý má nízku toxicitu a z organizmu je eliminovaný. Avšak peroxid vodíka a superoxidový radikál môžu tvoriť veľmi reaktívne a toxické hydroxylové radikály. Táto reakcia za normálnych podmienok prebieha veľmi pomaly, pokiaľ však nie je katalyzovaná iontami prechodných kovov, hlavne železa. Vzniknuté hydroxylové radikály sú reaktívne a toxické a spôsobujú poškodenie makromolekúl - lipidov, proteínov aj nukleových kyselín. Tvorba semichinónu môže byť katalyzovaná vhodnými flavoproteínmi, ktoré prijímajú elektrón z NADH alebo NADPH a presúvajú ho na antracyklíny v sérii reakcií, ktoré sú tiež nazývané „redoxný cyklus“ (Šimůnek a kol. 2009).

Druhý základný mechanizmus, ktorým železo môže podporovať oxidačný stres indukovaný antracyklínmi je prostredníctvom formácie komplexu antracyklín-Fe (ANT-Fe). V prítomnosti redukčného systému je ANT-Fe^{3+} komplex redukovaný na ANT-Fe^{2+}, ktorý môže reagovať s kyslíkom za vzniku superoxidového radikálu. V neprítomnosti redukčného systému dochádza ku vzniku radikálu ·ANT-Fe^{2+}, ktorý je tiež zodpovedný za vznik superoxidového alebo hydroxylového radikálu (Šimůnek a kol. 2009).

Za fyziologických aj patologických podmienok sú najväčším zdroj ROS mitochondrie (Murphy 2009, Turrens 2003). Okrem toho antracyklíny vykazujú vysokú afinitu ku kardiolipínu. Kardiolipín je negatívne nabitý fosfolipid, ktorý môžeme nájsť vo vnútornej membráne mitochondrií (Goormaghtigh a kol. 1990). Kvôli tomu sú antracyklíny zadržiavané v mitochondriách vo vysokých koncentráciách. Vďaka tomu sú mitochondrie považované za jeden z najvýznamnejších mechanizmov kardiotoxicity antracyklínových cytostatík (Berthiaume a Wallace 2007, Wallace 2003).

Tiež bolo pri skúmaní tkanív v pitevných štúdiách zistené, že doxorubicín a jeho metabolit doxorubicinol sa preferenčne akumulujú v tkanivách srdca v porovnaní s inými orgánmi alebo kostrovými svalmi (Stewart a kol. 1993).

2.1.3. REZISTENCIA NÁDOROVÝCH BUNIEK VOČI ANTRACYKLÍNOM

Medzi komplikácie terapie antracyklínmi radíme rozvoj rezistencie, kedy sú bunky nádoru schopné odolávať liečivám. O primárnej (prirodzenej) rezistencii hovoríme v prípade, že nádorové bunky sú schopné odolávať už pri prvom podaní liečiva. V prípade, že sa znižuje účinnosť liečby z dôvodu, že pôvodne responzívne nádorové bunky postupne znižujú citlivosť v priebehu liečby, hovoríme o sekundárnej (získanej) rezistencii. Ak sa stane, že pri strate citlivosti na liečivo dochádza ku rezistencii aj na cytostatiká podobnej štruktúry, hovoríme o skríženej rezistencii. Existujú však aj prípady mnohočetnej liekovej rezistencie (MDR), kedy sa jedná o skríženú rezistenciu medzi látkami s rozdielnou štruktúrou aj mechanizmom účinku. Multirezistencia je vysvetlením necitlivosti nádorových buniek k novým cytostatikám (Nosková a kol. 2000).

Medzi dôvody MDR patria ABC-transportéry, čo sú transportné proteíny so širokou substrátovou špecifitou, ktoré obsahujú ATP-väzbovú kazetu (Nosková a kol. 2000). ABC-transportéry sú hojne exprimnované v nádorových bunkách, kde prenášajú substráty von z bunky. Tento prenos látok cez membrány je vďaka využívaniu hydrolýzy fosfátových väzieb možný aj proti koncentračnému gradientu, čoho dôsledkom je nízka intracelulárna koncentrácia liečiva a následné zlyhávanie terapie. Medzi enzýmy, ktoré najvýznamnejšie prispievajú k mnohočetnej liekovej rezistencii patrí ABCB1 (P-glycoproteín), ABCG2 (breast cancer resistance protein - BCRP) a ABCC1 (multidrug-resistance associated protein-MRP1) (Cihalová a kol. 2015, Dean a kol. 2001, Szakacs a kol. 2008, Wu a kol. 2011).

Metabolická premena antracyklínov karbonylredukujúcimi enzýmami, ktoré sú nadmerne exprimované práve v nádorových tkanivách, je ďalším dôvodom rezistencie a zníženého účinku terapie (Soldan a kol. 1999, Veitch a kol. 2009). Medzi najvýznamnejšie antracyklínredukujúce enzýmy radíme AKR1C3, AKR1A1 či CBR1 (Hofman a kol. 2015). Tiež Bains a kol. (2010a) preukázali význam AKR1C3, AKR1C4 a AKR7A2 v redukcii antracyklínov tým, že polymorfizmy týchto enzýmov výrazne znižujú *in vitro* metabolizmus doxorubicínu i daunorubicínu.

2.2. KARBONYLREDUKUJÚCE ENZÝMY

S chemickými zlúčeninami obsahujúcimi karbonylovú skupinu sa denne stretávame, keďže sa vyskytujú ako súčasť endogénnych i xenobiotických zlúčenín (Opperman 2007).

Zlúčeniny obsahujúce karbonylovú skupinu sú schopné viazať sa na proteíny, lipidy, nukleové kyseliny a týmto spôsobom ovplyvňovať biologické funkcie (Ellis 2007, Shapiro 1998).

Redukcia karbonylu sa vzťahuje na redukciu aldehydov alebo ketónov na skupinu hydroxylovú (Barski a kol. 2008, Rosemond a Walsh 2004). Táto reakcia je typická reakcia prvej fázy metabolizmu, kde dochádza k zvýšeniu hydrofility a umožneniu konjugácie (to znamená umožnenie fázy II metabolizmu) (Barski a kol. 2008, Hoffmann a Maser 2007, Rosemond a Walsh 2004) alebo priamo exkrécie z organizmu (Rosemond a Walsh 2004). Avšak zmena vlastností molekuly môže spôsobiť aj zmenu biologickej aktivity zlúčenín. Zároveň predstavuje aj spôsob detoxifikácie organizmu, keďže redukciou karbonylovej skupiny dochádza k zníženiu chemickej aktivity molekuly (Barski a kol. 2008, Hoffmann a Maser 2007).

Napriek tomu, že redukčné reakcie karbonylovej skupiny patria medzi významné procesy I. fáze metabolizmu, sú tieto reakcie stále málo preskúmané. Hlavným problémom je nedostatok informácií o enzýmoch katalyzujúcich tieto reakcie. Ako príklad je možné uviesť fakt, že úloha CRE v prvej fáze metabolizmu bola odhalená až v osemdesiatych rokoch (na rozdiel od enzýmov katalyzujúcich oxidačné reakcie, ktoré sú skúmané už od rokov šesťdesiatych). Taktiež tieto enzýmy sú ťažko komerčne dostupné (Malátková a Wsól 2014).

Enzýmovej karbonylovej redukcii podliehajú zlúčeniny fyziologické (endogénne), ale i xenobiotické (exogénne) (Opperman 2007). U fyziologických látok je karbonylová redukcia zväčša súčasťou reverzibilných oxidoredukčných reakcií a spôsobuje aktiváciu alebo inaktiváciu dôležitých signálnych molekúl (Hoffmann a Maser 2007). Z toho vyplýva, že fyziologickými substrátmi sú steroidné hormóny, glukokortikoidy, monosacharidy, prostaglandíny a mastné kyseliny (Forrest a Gonzalez 2000, Hyndman a kol. 2003). V organizme sa podieľajú na dôležitých procesoch ako je metabolizmus steroidov, prostagladínov, ďalej stresová odpoveď organizmu,

neurotransmisia, mutagenéza i karcinogenéza (Chang a kol. 2003, Forrest a Gonzalez 2000, Maser 1995, Opperman and Maser 2000, Rosemond a Walsh 2004).

Redukcia karbonylovej skupiny je hlavný proces prebiehajúci v prvej fáze metabolizmu pre mnoho liečiv. Ako príklad môžme uviesť fenofibrát, haloperidol, naltrexon či warfarin. Fenofibrát, je metabolizovaný na kyselinu fenofibrovú, ktorá ďalej podlieha redukcii ketonickej skupiny, pričom produkt tejto redukcie oplýva terapeutickým efektom, ktorým je znižovanie lipidov v organizme. Haloperidol, atipsychotikum, podlieha redukcii aj reoxidácii. 6*β*-Naltrexol je metabolitom naltrexonu a funguje ako farmakologicky účinná forma, ktorá pôsobí ako antagonista opioidného receptoru. Jedným z prvých popísaných substrátov týchto enzýmov je warfarín (Moreland and Hewick 1975, Rosemond a Walsh 2004).

Redukcia karbonylovej skupiny je tiež významná u antracyklínových antibiotík. Redukciou karbonylovej skupiny molekuly doxorubicínu a daunorubicínu dochádza k zníženiu aktivity týchto zlúčenín antracyklínového typu, avšak táto reakcia je zároveň považovaná aspoň z časti za príčinu ich kardiotoxických metabolitov (Licata a kol. 2000, Minotti a kol. 2004, Mordente a kol. 2009). Z toho vyplýva, že inhibícia redukcie karbonylovej skupiny môže zvýšiť terapeutickú účinnosť látky použitej ako liečivo, ale zároveň znížiť množstvo alebo závažnosť nežiaducich účinkov (Malátková a Wsól 2014).

CRE sú väčšinou NAD(P)(H)-dependentné enzýmy, ktoré preferujú NADPH nad NADH (Barski a kol. 2008, Hoffmann a Maser 2007). To znamená, že k svojej činnosti potrebujú naviazanie kofaktoru nikotinamid adenin dinukleotidu a/alebo častejšie využívaného nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu. (Výnimkou je chinónreduktáza NQO2, ktorá využíva kofaktor dihydronikotínamid ribózu) (Rosemond a Walsh 2004).

Tieto enzýmy patria hlavne do nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkym reťazcom (SDR - short-chain dehydrogenases/reductases) a aldo-ketoreduktáz (AKR) (Hoffmann a Maser 2007, Opperman 2007, Pilka a kol. 2009). Rozlišujeme tiež skupiny chinónreduktáz (QR - quinone reductases), ktoré zabezpečujú premenu chinónov na príslušné hydrochinónové zlúčeniny a nadrodinu dehydrogenáz/reduktáz so stredne dlhým reťzcom (MDR - medium-chain dehydrogenases/reductases) (Obr. 6) (Opperman a Maser 2000). Do nadrodiny sú CRE zaradené podľa primárnej štruktúry a štrukturálneho motívu. Štrukturálny motív skupiny SDR je Rossmannov zhyb, kdežto u rodiny AKR sa vyskytuje $(\beta/\alpha)_8$ zoskupenie (Opperman 2007). Ďalšími znakmi, ktorými sa líšia členovia týchto rodín sú génová sekvencia a závislosť na kofaktore (Rosemond a Walsh 2004).

Characteristics of enzyme families involved in carbonyl metabolism

Name	Function	Coenzyme	Size	Structure	Mechanism	Active site
MDR						
Medium-chain dehydrogenases/reductases	Alcohol oxidation, quinone reduction, endogenous dehydrogenases/reductases,	Mainly NAD(H),	About 370 residues	Rossmann-fold nucleotide binding domain, two-domain structure, mostly Zn^{2+} dependent enzymes	Ordered BiBi, proton relay system	(Zn2+), (mainly) His, Ser
ALDH						
Aldehyde dehydrogenase	Oxidation of endogenous and xenobiotic aldehydes	$NAD(P)^+$	About 500 residues	Three-domain enzymes, Rossmann-fold nucleotide binding domain,	Thio-hemiacetal formation; hydrolysis/transfer of acyl-enzyme intermediate	Cys, Glu, Asp
AKR						
Aldo-keto reductases	Oxidoreduction of endogenous and xenobiotic carbonyls, alcohols and C–C double bonds	NADP(H)	About 320 residues	$(\alpha/\beta)_8$ (TIM) Barrel; no Rossmann-fold nucleotide domain;	Acid-base mechanism with Tyr as catalytic acid/base, ordered BiBi	Tyr, Asp, Lys, His, (Glu)
SDR						
Short-chain dehydrogenases/reductases	Oxidoreduction of endogenous and xenobiotic compounds; lyases, epimerases	NAD(P)(H)	About 270 residues	α/β-Fold, one-domain Rossmann-fold nucleotide binding site	Acid-base mechanism with Tyr as catalytic acid/base, ordered BiBi	Tyr, Lys, Ser
QR						
Quinone reductases	Two electron reduction of endogenous and xenobiotic quinones	NAD(P)H; *N*-alkyl, *N*-ribosyl nicotinamides	About 280 residues	Flavodoxin fold FAD	Ping-Pong mechanism, charge relay;	FAD, His, Tyr

Obr. 6 Rozdelenie karbonylredukujúcich enzýmov (prevzaté z Opperman a Maser 2000)

Karbonylredukujúce enzýmy sú exprimované v mnohých tkanivách vrátane pečene, pľúc, mozgu, obličiek, sleziny, semenníkov a krvi. Môžu sa nachádzať rozpustené alebo membránovo viazané (Forrest and Gonzalez 2000, Rosemond a Walsh 2004, Wirth and Wermuth 1992).

Medzi inhibítory karbonylredukujúcich enzýmov patrí mnoho prírodných látok, napríklad kvercetin a jeho deriváty, kvercitrin a rutin (Ahmed a kol. 1978, Atalla a kol. 2000, Forrest and Gonzalez 2000). Ľudské CRE sú tiež citlivé na pôsobenie furosemidu, indometacínu či disulfiramu (Forrest and Gonzalez 2000, Iwata a kol. 1989). Ďalej sa ako inhibítory niektorých enzýmov môže využívať fenolftaleín, menadion alebo nesteroidné antiflogistiká (Atalla a kol. 2000)

2.2.1. SDR ENZÝMY

Nadrodina enzýmov SDR je jedna z najväčších proteínových skupín doteraz (Matsunaga a kol. 2006). Väčšina enzýmov z tejto skupiny má štruktúru dimérov alebo tetramérov a na svoju činnosť využívajú NADPH ale i NADP, ktoré sa viažu na Rossmannov zhyb, ktorý je pre tieto proteíny charakteristický a významný pre väzbu

s kofaktorom. U členov tejto nadrodiny je zachovaná katalytická tetráda Asn-Ser-Tyr-Lys (Barski a kol. 2008, Jornvall a kol. 1995, Opperman a kol. 2003).

SDR enzýmy sú rozdelené do 7 skupín (podrodín) označených písmenami: C = „classical“, E = „extended“, A = „atypical“, I = „intermediate“, D = „divergent“, X = „complex“, U = „unassigned“ (Persson a kol. 2009). Celá skupina enzýmov vykazuje vysokú substrátovú špecificitu. Tieto substráty patria najčastejšie medzi steroidy, alkoholy, sacharidy či aromatické xenobiotiká (Barski a kol. 2008).

Medzi enzýmy patriace do nadrodiny SDR patria napr. karbonylreduktázy (CBRs), 11*β*-hydroxysteroiddehydrogenáza (HSD) typ 1 (HSD11B1), dehydrogenáza/reduktáza SDR rodiny člen 4 (DHRS4) a L-xylulóza reduktáza (Matsunaga a kol. 2006).

2.2.1.1. KARBONYLREDUKTÁZY V ĽUDKOM ORGANIZME

2.2.1.1.1. Karbonylreduktáza 1

Prvýkrát bola karbonylreduktáza 1 izolovaná v roku 1973 z mozgu človeka a bola označená ako aldehydreduktáza 1 (Ris a von Wartburg 1973). Jedná sa o monomérny cytosolický enzým. Nezvyčajnou vlastnosťou je, že *in vivo* existuje v troch formách s rôznym nábojom a mierne odlišnou molekulovou hmotnosťou (Wermuth a kol. 1988). Distribuovaný je takmer vo všetkých ľudských tkanivách (Wirth a Wermuth 1992). Najvyššie koncentrácie však boli zaznamenané v orgánoch, ktoré sú v blízkom kontakte s exogénnymi zlúčeninami, ako sú pečeň, obličky a epitel gastrointestinálneho traktu (Kassner a kol. 2008, Wirth a Wermuth 1992). Bola tiež zistená súvislosť medzi genetickým polymorfizmom CBR1 a pravdepodobnosťou vzniku neurodegeneratívnych ochorení (Maser 2006).

CBR1 katalyzuje NADPH-dependentnú redukciu endogénnych látok ako sú prostaglandíny (9-ketoredukcia PGE_1 a PGE_2), 3-ketosteroidy, 4-oxo-2-nonenal (ONE), a isatin, ku ktorému vykazuje vysokú afinitu (Doorn a kol. 2004, Usami 2001, Wermuth 1981).

CBR1 katalyzuje premenu rôznych exogénnych karbonylových zlúčenín, avšak najvhodnejšími substrátmi sú *para*- a *ortho*-chinóny odvodené z polycyklických aromatických hydrokarbónov. Fenantrénchinón je ďalší dobre známy substrát CBR1. Vyzerá to tak, že CBR1 je významným detoxifikačným enzýmom chinónov, ale zároveň

sa môže podieľať na intoxikácii týmito zlúčeninami (Jarabak a Harvey 1993, Wermuth 1981).

Medzi exogénne substráty patria aj terapeuticky a toxikologicky dôležité zlúčeniny. Substráty z radu liečiv zahŕňajú napríklad antipsychotiká (haloperidol), diagnostiká (metyrapón), protizápalové liečivá (loxoprofen), antagonistov serotonínu (dolasetron) (Breyer-Pfaff a Nill 2000, Breyer-Pfaff a Nill 2004, Forrest a Gonzalez 2000, Kassner a kol. 2008, Lal 2008, Ohara a kol. 1995). Medzi najvýznamnejšie substráty patria antracyklínové zlúčeniny, ktoré sú redukované na uhlíku C13 na sekundárne alkoholy (Minotti a kol. 2004).

Zmeny v expresii CBR1 sú preukázané pri tumorigenéze v rôznych tkanivách, zvýšená aktiva bola zaznamená v nádorových tkanivách pľúc, hrubého čreva a prs, naopak znížená aktivita u nádorov pečene a prostaty (Ismail a kol. 2000, Lal a kol. 2008, López de Cerain 1999, Suto a kol. 1999). Štúdie ukazujú, že aktivita v nádorových tkanivách môže byť zvýšená 2- až 40-násobne (López de Cerain a kol. 1999). Nízka expresia CBR1 zvyšuje invazivitu nádoru endomeria a koreluje s kratšou dobou prežitia pacientov. Tak isto u pacientov s nemalobunečným karcinómom pľúc je znížená expresia CBR1 spájaná s kratšou dobou prežitia (Murakami a kol. 2012, Takenaka a kol. 2005). Taktiež štúdie zaoberajúce sa výskumom na bunkách adenokarcinómu ukazujú, že CBR1 je zapojený v indukcií apoptózy buniek (Tanaka a kol. 2005). CBR1 je diagnostickým a prognostickým biomarkerom rozvoja rezistencie voči doxorubicínu u nádorov gastrointestinálneho traktu. Tiež je preukázané, že práve táto upregulácia CBR1 je jedným z hlavných príčin rezistencie voči antracyklínom (Matsunaga a kol. 2015).

Odhalením účinných a selektívnych inhibítorov CBR1 je možné predĺžiť účinok antracyklínových chemoterapeutík a zároveň obmedziť ich hlavný nežiaduci účinok-kardiotoxicitu. Medzi syntetické inhibítory tohto enzýmu patrí kyselina etakrynová, indometacín, 3-(1-*terc*-butyl-4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-3-yl)fenol a analógy zearalenonu (Tanaka a kol. 2005, Wermuth 1981, Zimmermann a kol. 2009). Medzi prírodné inhibítory CBR1 patrí resveratrol a niektoré flavonoidy (Gonzalez-Covarrubias a kol. 2008, Ito a kol. 2013). Taktiež kurkumín dokáže inhibovať rôzne detoxifikačné enzýmy vrátane CBR1 (Larasati a kol. 2018).

2.2.1.1.2. Karbonylreduktáza 3

Karbonylreduktáza 3 (CBR3) je monomérny cytosolický enzým, narozdiel od enzýmu CBR1 však bol objavený neskôr (jeho gén bol identifikovaný v roku 1998). Gén pre tento enzým sa nachádza v blízkosti génu pre enzým CBR1 na chromozóme 21 a taktiež vykazuje zhodu sekvencie až 71 % (Matsunaga a kol. 2006, Watanabe a kol. 1998). Napriek podobnej sekvencii aminokyselín a štruktúre, enzým CBR3 preukazuje iba obmedzenú karbonylredukujúcu aktivitu (Miura a kol. 2008). Predopkladá sa, že mRNA je exprimovaná v rôznych tkanivách, ale v značne nižšej miere ako pre enzým CBR1. Vysoké hodnoty mRNA enzýmu CBR3 vykazujú vaječníky a pankreas (Miura a kol. 2008).

Je zrejmé, že katalytická aktivita CBR3 je výrazne nižšia ako u enzýmu CBR1 (Miura a kol. 2008). Z endogénnych substrátov CBR3 bol zatiaľ identifikovaný isatin (Pilka a kol. 2009). CBR3 vykazuje oproti CBR1 nízku katalytickú aktivitu voči steroidom, konkrétne vykazuje nízku 3- a 20-ketosteroidreduktázovú aktivitu (Miura a kol. 2008).

Redukčná aktivita exogénnych látok bola taktiež nižšia ako u CBR1 u substrátov ako 4-benzoylpyridín a 4-nitrobenzaldehyd (Miura a kol. 2008). Pri hľadaní substrátov bolo zistené, že najvhodnejším je 1,2-naftochinón. Zaujímavé je tiež, že CBR3 vykazoval aktivitu voči *ortho*-chinónom, avšak nie voči *para*-chinónom. Medzi ďalšie vhodné subtráty tohto enzýmu patria aj oracín, koniferyl aldehyd a acetohexamid (Pilka a kol. 2009).

Na základe štúdií sa predpokladá pro-apoptotická funkcia enzýmu CBR3. Espana a kol. (2005) uvádzajú súvislosť medzi zníženou expresiou CBR3 a rozvojom metastáz pri nádoroch prsníka. Ohkura-Hada a kol. (2008) uvádza úlohu CBR3 ako sprostredkovateľa cytostatického účinku 9-*cis*-retinovej kyseliny v terapii orálneho skvamózneho nádoru. 9-*cis*-retinová kyselina zvýšila expresiu CBR3 v nádorových bunkách, čo znížilo rast a migračný potenciál. Tiež k tomuto tvrdeniu prispieva fakt, že expresia CBR3 bola znažne znížená pri invazívných formách tohto nádoru v porovnaní s menej agresívnymi formami.

Mnohé štúdie sa tiež zaoberajú vzťahom CBR3 a antracyklínových chemoterapeutík. Bolo popísané, že *in vitro* metabolizuje CBR3 daunorubicín i doxorubicín. Zaujímavé je, že podľa Bains a kol. (2010b) je doxorubicín lepším substrátom pre enzým CBR3 (v_{max} = 466 ± 22 nmol/min.mg proteínu) ako CBR1

(319 ± 29 nmol/min.mg proteínu), avšak expresia CBR1 je v tkanivách pečene až 10-krát vyššia. Bains a kol. 2010b taktiež potvrdzujú, že rôzne variácie génu *CBR3* majú vplyv na metabolizmus antracyklínov. Konkrétne varianty V244M, C4Y, V93I a C4Y+V244M haplotyp znižujú účinnosť voči obom skúmaným antracyklínom a M235L znižuje reduktázovú aktivitu voči daunorubicínu. Je teda pravdepodobné, že tieto mutácie môžu znamenať zmenu v riziku antracyklínmi indukovanej kardiotoxicity.

2.2.1.1.3. Karbonylreduktáza 4

CBR4 vykazuje minimálnu zhodu s ostatnými predstaviteľmi skupiny CBR, to znamená menej ako 30 %, čo môže znamenať odlišnosť vo funkcii tohto enzýmu. Odlišná od rodiny CBR je aj tetramérna štruktúra a subcelulárny výskyt, konkrétne v matrix mitochondrií. CBR4 je súčasťou komplexu ľudských mitochondiálnych enzýmov podieľajúcich sa na syntéze mastných kyslelín (FAS – fatty acid synthesis) (Endo a kol. 2008, Chen a kol. 2009). CBR4 je tiež exprimovaný v tkanivách obličiek a pečene v koncentráciách neporovnateľne nižších ako enzým CBR1 (Endo a kol. 2008).

Medzi substráty CBR4 patria *ortho*- aj *para*-chinóny. Najlepším substrátom sa ukazuje byť 9,10-naftochinón a 1,4-benzochinón (Endo a kol. 2008). Na základe ďalších skúmaní bolo dokázané, že CBR4 redukuje výlučne chinónové zlúčeniny a nie je schopný redukovať aromatické či alifatické ketóny, aldehydy, sacharidy alebo ketosteroidy. Kvôli tomu sa predpokladá, že je účasntý detoxofikácie exogénnych chinónov. Ak však koncentrácia chinónov prekračuje v bunke kapacitu detoxifikačných enzýmov superoxiddismutázy a glutationu, môže byť CBR4 zodpovedný za cytotoxickú aktivitu 9,10-naftochinónu in *vivo* (Endo a kol. 2008).

CBR4 neredukuje anthracyklínovú zlúčeninu daunorubicín (Endo a kol. 2008).

Napriek tomu, že CBR4 pôsobí ako reduktáza chinónov, nie je jeho aktivta inhibovaná dikumarolom alebo kvercetínom, ako je tomu u iných chinónreduktáz (Endo a kol. 2008).

2.2.1.1.4. 11β-HSD typ 1 (HSD11B1)

Membránovo viazaný enzým 11β-HSD1 v neporušených bunkách funguje ako NADPH-dependentná reduktáza, ale tento enzým je v mikrozómoch schopný v závislosti na kofaktore (NADPH alebo $NADP^+$) reagovať ako oxidáza aj reduktáza. Tento enzým

je exprimovaný v pečeni (Dzyakanchuk 2009, Yang a kol. 2018). Štúdie tiež poukazujú na zvýšenú expresiu v mukóze faryngu u fajčiarov (Gronau et al. 2002).

Kľúčová úloha enzýmu je premena kortizónu na kortizol, stresový hormón, ktorý sa viaže na glokukortikoidné receptory (Dzyakanchuk 2009, Yang a kol. 2018).

11β-HSD1 je významným enzýmom v redukcii liečiv ako napríklad bupropion, ketoprofen, metyrapón alebo toxínov (napr. NNK) (Hult a kol. 2001, Molnari and Myers 2012, Maser a Oppermann 1997).

Yang a kol. (2018) tiež ako prví poukázali na významnú úlohu 11β-HSD1 v metabolizme doxorubicínu a jeho premene na doxorubicinol. Subtrátom tohto enzýmu je tiež oracin (Wsol a kol. 2004).

Ako selektívny inhibítor bol identifikovaný PF-915275 (Yang a kol. 2018). Selektívne inhibítory 11β-HSD1 sú potenciálne vhodné látky na liečbu diabetu typu 2 a kardiovaskulárnych ochorení (Wang 2006, Anderson and Walker 2013). Neselektívnym inhibítorom je napr. kyseliny glycyrrhetinová, naringenin, žlčové kyseliny, karbenoxolon, dexamethason, furosemid či ethanol (Maser a Oppermann 1997).

2.2.2. ALDO-KETOREDUKTÁZY

Aldo-ketoreduktázy sú štrukturálne príbuzné enzýmy. Ako už bolo zmienené charakteristická je $(\beta/\alpha)_8$ suprasekundárna štruktúra, tiež nazývaná TIM barrel (triosephosphate isomerase) (Hyndman a kol. 2003, Jez a Penning 2001). Táto tvorí kompaktnú, napriek tomu však flexibilnú štruktúru s možnými obmenami potrebnými pre naviazanie chemicky odlišného spektra karbonylových zlúčenín (Jez a kol. 1997a). Väčšina všetkých známych AKR sú monoméry, avšak poznatky poukazujú na multimérne formy v rodine AKR2, AKR6 a AKR7 (Kelly a kol. 2000, Kavanagh a kol. 2002, Kozma a kol. 2002).

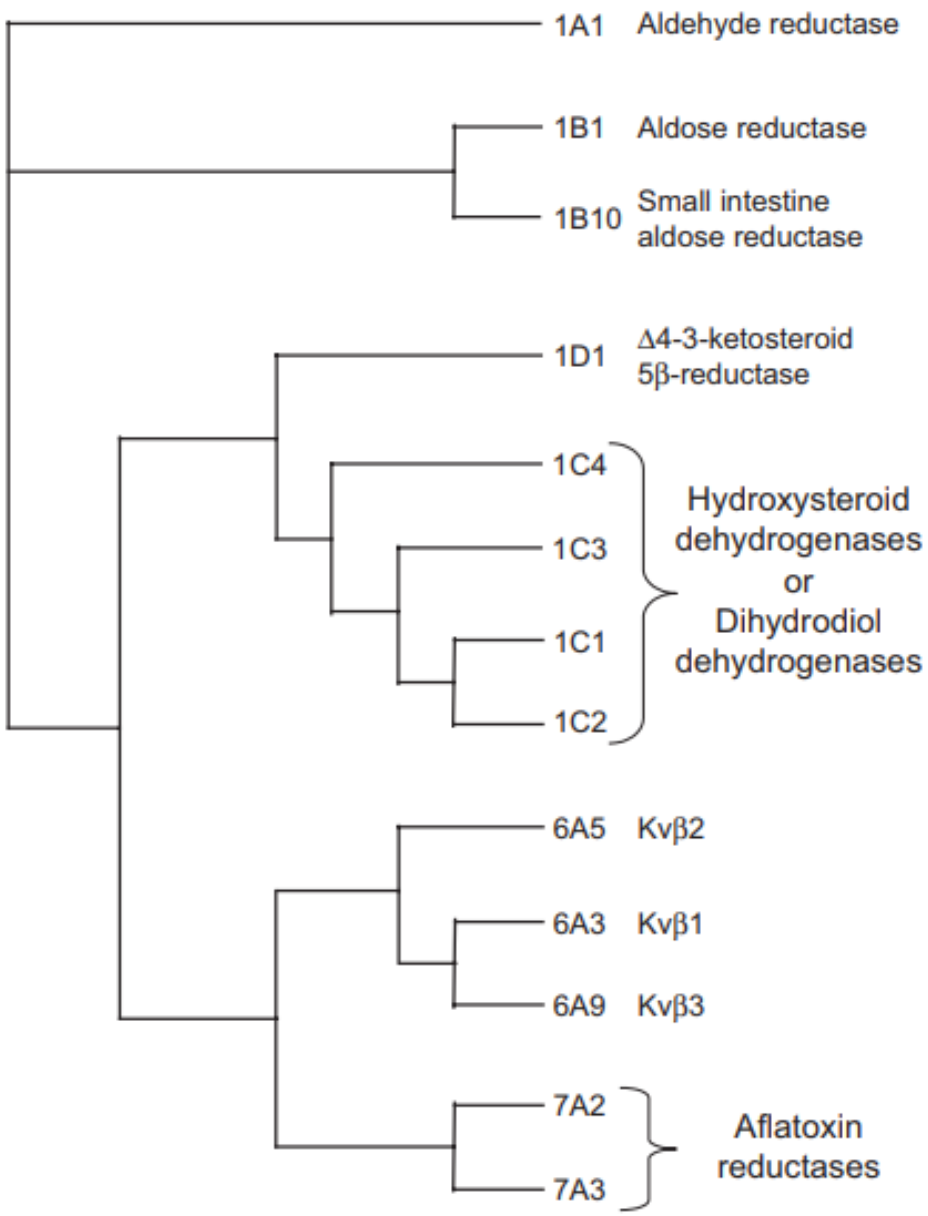
Najväčšia aktivita aldehyd redukujúcich enzýmov bola zaznamenaná v obličkách a v pečeni u cicavcov, vtákov, plazov, obojživelníkov a rýb. Karbonylredukujúca aktivita je tiež merateľná u hmyzu a kvasiniek. Enzýmy u každého druhu vykazovali molekulovú hmotnosť medzi 30 a 40 kDa (Barski a kol. 2008, Davidson a kol. 1978, Jez a kol. 1997a, Jez a kol. 1997b).

Enzýmy AKR katalyzujú rôznorodú skupinu oxidačno-redukčných reakcií metabolizmu, počínajúc redukciou glukózy a glukokortikoidov až po konjugáty

glutathionu a aldehydy fosfolipidov (Barski a kol. 2008, Bohren a kol. 1989). Steroidy, prostaglandíny ale i xenobiotiká patria medzi látky metabolizované enzýmami tejto rodiny (Bohren a kol. 1989, Hyndman a kol. 2003, Jez a kol. 1997b). Keďže neobsahujú kovový alebo flavinový kofaktor, nie sú účinné ako alkoholdehydrogenázy, ich pôsobenie spočíva iba v redukcii aldehydickej a ketonickej skupiny. Keďže v bunkách je zabezpečený prísun NADPH v dostatočnom množstve môže redukcia prostredníctvom AKR prebiehať pri rôznych energetických stavoch v bunke, ktoré sa odvíjajú od stavu respirácie, rastu i hladovania (Barski a kol. 2008).

Mechanizmus účinku týchto enzýmov spočíva v prvom kroku v odštepení hydriodvého iónu z molekuly NADPH na molekulu karbonylu a v druhom kroku dochádza k naviazaniu protónu z rozpúšťadla, aby došlo k redukcii na alkohol (Barski a kol. 2008).

Členovia danej rodiny vykazujú viac ako 40% homológiu navzájoma a zároveň menej ako 40% homológiu s členmi inej rodiny (Barski a kol. 2008). Cicavčie AKR spadajú do troch hlavných rodín – AKR1, AKR6 a AKR7. U ľudí bolo identifikovaných 13 rôznych AKR proteínov, ktoré patria do týchto rodín (Obr. 7) (Hyndman a kol. 2003, Barski a kol. 2008).



Obr. 7 Fylogenetický strom ľuských aldo-ketoreduktáz (prevzaté z Barski a kol. 2008)

2.2.2.1. AKR ENZÝMY V ĽUDSKOM ORGANIZME

Medzi AKR, ktoré boli charakterizované v ľudských tkanivách patria aldehyd reduktáza AKR1A1, aldosareduktázy AKR1B1, AKR1B10, hydroxysteroid dehydrogenázy AKR1C1, AKR1C2, AKRC3, AKRC4; Δ4-3-ketosteroid-5-*β*-reduktáza AKR1D1; Kvβ proteiny AKR6A3, AKR6A5, AKR6A9 a poslednými sú aflatoxín reduktázy AKR7A2 a AKR7A3 (Barski a kol., 2008). Penning (2015) uvádza naviac AKR1B15 a 1,5-anhydro-D-fruktóza reduktázu AKR1E2.

2.2.2.1.1. AKR1A1

Enzým AKR1A1 patrí medzi jeden z prvých identifikovaných enzýmov (Barski a kol. 2008). Tento enzým je prítomný vo všetkých tkanivách, avšak najvyššia koncetrácia bola zaznamenaná v proximálnych tubuloch obličiek (Barski a kol. 2005). Tento cytosolický enzým sa ďalej nachádza v pečeni, kostnej dreni, srdci, kosterných svaloch, pankrease, prostate či pľúcach (Hyndman a kol. 2003).

AKR1A1 je jedným z enzýmov AKR, ktorý sa účastnia syntézy cholesterolu a triacylglycerolov, keďže sa účastnia premeny D-glyceraldehydu na glycerol a tiež metabolizmu kyseliny mevalónovej (Kim a kol. 2012).

Vhodnými exogénnymi substrátmi sú aromatické aldehydy, napr. sukcinát semialdehyd, 4-karboxybenzaldehyd, 4-nitrobenzaldehyd, pyridín-3-aldehyd a pyridín-4-aldehyd (O'Connor a kol. 1999).

AKR1A1 je zvýšene exprimovaný v radiorezistentných nádorových bunkách laryngu HEp-2 (RR-HEp-2) (Kim a kol. 2010). Ďalšími štúdiami Kim a kol. (2012) dokazujú, že znížením expresie AKR1A1 dochádza k inhibícii bunečnej proliferácie aktiváciou p53. Mutácie génu *AKR1A1* sú spájané so zvýšeným výskytom non-Hodgkinovho lymfómu (Lan a kol. 2007).

AKR1A1 patrí ku karbonylredukujúcim enzýmom, ktoré sa podieľajú na premene antracyklínov na kardiotoxické sekundárne alkoholy (Bains a kol. 2008, Plebuch a kol. 2007), čím prispievajú k rozvoju antracyklínovej rezistencie (Plebuch a kol. 2007). Quiñones-Lombraña a kol. (2014) zistili, že rozdiely v expresii AKR1A1 ovplyvňujú mieru redukcie daunorubicínu v srdcovom svale.

2.2.2.1.2. AKR1B1

AKR1B1 sa účastní na poškodzovaní tkanív pri hyperglykemickom stave a sekundárnych komplikáciách diabetu mellitu (Jez a kol. 1997a). Tieto zahŕňajú rozvoj sivého zákalu oka, retinopatie, neuropatie či nefropatie (Jez a kol. 1997a, Makiishi a kol. 2003, Yang a kol. 2003, Zablocki a kol. 2011).

Expresia AKR1B1 je zvýšená, ak je vysoká hladina glukózy v krvi prostredníctvom NFκB, čo môže byť prepojenie medzi diabetom a zvýšeným rizikom niektorých typov nádorov (Yang a kol. 2008). AKR1B1 katalyzuje redukciu PGH_2 na $PGF_{2\alpha}$ v metabolizme arachidonovej kyseliny. Enzýmy podieľajúce sa na metabolizme

arachidonovej kyseliny sa zúčastňujú patofyziologických procesov mnohých ochorení, vrátane nádorových (Wu a kol. 2017). $PGF_{2\alpha}$ ako hlavný metabolit AKR1B1 moduluje bunečnú adhéziu, migráciu a inváziu v nádoroch endometria (Sales a kol. 2008).

Mnohé štúdie spájajú enzým AKR1B1 s rezistenciou nádorov (Dan a kol. 2003, Plebuch a kol. 2007), navyše niektoré výskumy spájajú AKR1B1 s nádormi hrubého čreva (Tammali a kol. 2011a). AKR1B1 sa v bunke účastní procesov, ktoré súvisia s karcinogenézou, ako napr. EMT (epithelial-mesenchymal transition), zápal a angiogenéza (Wu a kol. 2017, Zablocki a kol. 2011). Gén *AKR1B1* je podexprimovaný v nádoroch prostaty a nadmerná expresia súvisí so skrátenou dobou prežitia pacientov s AML a rôznymi typmi myelómov (Laffin a Petrash 2012). AKR1B1 podporuje tumorigénnu a metastázovú aktivitu „basal-like" nádoru pŕs cestou pozitívnej spätnej väzby. Z toho vyplýva, že nadexpresia AKR1B1 koreluje s nízkou prognózou u pacientov s týtmo typom nádoru (Wu a kol. 2017).

Substrátmi AKR1B1 sú isokortikosteroidy, produkty lipidovej peroxidácie ako napr. 4-hydroxy-2-nonenal alebo environmentálne polutanty ako akroleín (Barski a kol. 2008, Wermuth a Monder 1983).

AKR1B1 sa s ďalšími enzýmami SDR a AKR rodiny podieľajú na metabolizme exogénnych látok, vrátane antracyklínových chemoterapeutík (Rosemond a Walsh 2004).

AKR1B1 patrí medzi karbonylreduktázy, ktoré sú spájané s rovojom kardiotoxicity pri liečbe doxorubicínom či daunorubicínom (Plebuch a kol. 2007).

Medzi známe inhibítory AKR1B1 radíme tolrestat, epalrestat, ranirestat a fidarestat. Klinicky však využívanie inhibítorov nie je možné hlave kvôli vedľajším nežiaducim účinkom (Hotta a kol. 2001, Hotta a kol. 2012, Matsumoto a kol. 2008, Sestanj a kol. 1984).

2.2.2.1.3. AKR1B10

AKR1B10 je monomérny cytosolický enzým primárne exprimovaný v tkanivách gastrointestinálneho traktu: hrubom a tenkom čreve, kde zohráva fyziologickú úlohu v metabolizme steroidov a aldehydov zo stravy (Scuric a kol. 1998, Zhong s kol. 2009).

Endogénnymi substrátmi sú *α,β*-nenasýtené karbonyly/lipidové peroxidy (Zhong a kol. 2009) a all-*trans*-retinal (prekurzoru retinovej kyseliny, ktorá reguluje bunečnú proliferáciu a diferenciáciu) (Quinn a kol. 2008, Ruiz a kol. 2009).

Exogénnymi substrátnmi sú dolasetron, pyridín-3-aldehyd a 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanón (Martin a kol. 2006). Redukuje exogénne látky ako isoprenyl aldehydy (farnesal a gerananylgeranial), cytotoxické aldehydy (akrolein a 4-hydroxy-2-nonenal) a polycyklické aromatické hydrokarbóny (enviromentálne prokarcinogény) (Endo a kol. 2009, Ruiz a kol. 2009, Shen a kol. 2011).

Enzým podporuje bunečný rast a prežitie zásahom do syntézy mastných kyselína lipidov a metabolizmu kyseliny retinovej (Ma a kol. 2008). Nadexprimovaný je pri nádoroch pŕs, hepatocelulárnom karcinóme, nemalobunečnom karcinóme pľúc, nádore krčka maternice, endometria a pankreasu (Scuric a kol. 1998, Ma a kol. 2012, Sato a kol. 2016, Yao a kol. 2014, Yoshitake a kol. 2007). Li a kol. (2017) potvrdili nadexpresiu AKR1B10 v nádore pŕs, čo podnecuje migráciu a inváziu MCF-7 a BT-20 bunkami prostredníctvom ERK signalizačnej kaskády. Až v 70 % skúmaných pacientov s adenokarcinómom pankreasu bola zaznamenaná zvýšená expresia AKR1B10 (Chung a kol. 2012). Naopak v 88 % prípadov kolorektálneho karcinómu môžeme pozorovať zníženú expresiu tohto enzýmu (Kropotova a kol. 2010). Podexpresia je tiež zaznamenaná u nádorov hlavy a krku (Laffin a Petrash 2012).

AKR1B10 sa účastní detoxikácie cytotoxických karbonylových zlúčenín z organizmu (Shen a kol. 2011). Premieňa daunorubicín a idarubicín na ich sekundárne alkoholy a s menšou účinnosťou aj doxorubicín a epirubicín (Zhong a kol. 2011), čo podporuje tvrdenie, že zvýšená expresia tohto enzýmu je zodpovedná za rezistenciu na tieto chemoterapeutká (Matsunaga a kol. 2012).

Endogénnymi inhibítormi sú steroidné hormóny, žlčové kyseliny a ich metabolity (Endo a kol. 2009). Pre vývoj terapeuticky vhodných inhibítorov sa javia byť najvhodnejšie zlúčeniny odvodené od oleanolovej kyseliny (Takemura a kol. 2011). Medzi ďalšie látky možné využiť na inhibíciu AKR1B10 patria prostaglandín A_1, buteín (Díez-Dacal a kol. 2011, Song a kol. 2010), kyselina flufenámová, mefenámová, glycyrrhetinová, kvercetín, ibuprofen, indometacín (Endo a kol. 2010).

2.2.2.1.4. AKR1C1

Vlastnosťou, ktorá odlišuje rodinu AKR1C od iných členov rodiny AKR je, že tieto enzýmy sa tiež nazývaju dihydrodioldehydrogenázy, kvôli ich schopnosti katalyzovať $NADP^+$-dependentnú oxidáciu *trans*-dihydrodiolov aromatických hydrokarbónov na korešpondujúce katecholy (Barski a kol. 2008). Je preukázané, že

pomer NADP/NADPH má vplyv na priebeh reakcií katalyzovaných enzýmami AKR1C. Všetky enzýmy tejto skupiny sa nachádzajú v pečeni, líšia sa však výskytom v ostatných častiach tela. Vďaka zásahu do regulácie prostaglandínov, steroidných štruktúr a žlčových kyselín sú enzýmy rodiny AKR1C vnímané ako jeden z možných cieľov pri liečbe nádorov prostaty, prsníkov, endometria alebo v liečbe endometriózy (Henderson a Feigelson 2000, Rižner a Penning 2014).

AKR1C1 je dôležitý cytosolický enzým v metabolizme steroidov, prostaglandínov a pre aktiváciu PAH (Penning 2004, Rižner a Penning 2014).

AKR1C1, ktorá vlastní 20*α*-HSD (hydroxysteroiddehydrogenázové) vlastnosti, je dôležitá na premenu progesteronu na 20*α*-hydroxyprogesterón, pričom touto redukciou dochádza k inaktivácii tohto hormónu (Beranič a kol. 2012, Piekorz a kol. 2005, Rižner a kol. 2006).

Okrem toho preukazuje aj 3*α*- a 3*β*-HSD aktivitu v závislosti na type steroidnej štruktúty: 3-keto-5*β*-dihydrosteroidy redukuje na 3*α*-hydroxyderiváty, kdežto 3*β*-hydroxyprodukty sú produktami redukcie 3-keto-5*α*-dihydrosteroidov. Redukované steroidné štruktúry 5*α*-androstan-3*β*,17*β*-diol a 5*α*,3*β*-tetrahydroxypregnan sú ligandami estrogénového receptoru *β* a antagonistami $GABA_A$ receptoru. Výsledkom redukcie enzýmom AKR1C1 je tiež neuroaktívny 5*α*/*β*-pregnan-3*α*-ol-20-on, ktorý je pozitívnym modulátorom $GABA_A$ receptoru a taktiež 5*α*-dihydrotestosteron (Matsunaga a kol. 2006).

Substrátmi AKR1C1 sú aj xenobiotické karbonylové zlúčeniny. Jeden z rozdielov oproti enzýmom podrodiny AKR7A je jeho schopnosť redukovať aromatické ketóny. Medzi substráty patria napríklad dolasetron, naloxon, naltrexon, oracin, ketotifen, haloperidol ale aj daunorubicín (Breyer-Pfaff a Nill. 2000, Breyer-Pfaff a Nill. 2004, Ohara a kol. 1995, Wsol 2007).

AKR1C1 je nadmerne exprimovaný v nádoroch endometria či nádoroch pľúc (Rižner 2012, Tian a kol. 2016, Wang a kol. 2007). Nadexpresia bola zaznamenaná aj v nádoroch močového mechúra a je závislá na *IL-1β* (Matsumoto a kol. 2016).

Nízka expresia bola zistená v nádorových tkanivách pŕs v porovnaní s normálnym prsným tkanivom (Lewis a kol. 2004). Expresia AKR1C1 je tiež spájaná s rezistenciou na liečbu u nádorov kolorekta pri liečbe cisplatinou a leukemických U937 buniek pri terapii daunorubicínom (Matsunaga a kol. 2013, Matsunaga a kol. 2014). AKR1C1 je podstaný v tvorbe metastáz nemalobunečného nádoru pľúc ovplyvňovaním STAT3

kaskády a spájaný so zlou prognózou (Zhu a kol. 2018). AKR1C1 je v podexprimovaná v nádorových tkanivách pŕs (Lewis a kol. 2014).

AKR1C1 metabolizuje liečivo oracín (Wsol a kol. 2007). Bolo zistené, že zvýšením expresie AKR1C1 dochádza k zníženiu účinkov daunorubicínu u bunečnej leukemickej línie U937 (Matsunaga a kol. 2014).

Selektívnym a veľmi silným ihibítorom je benzbromaron (Higaki a kol. 2003), medzi ďalšie pratria benzodiazepíny napr. diazepam, flunitrazepam alebo nitrazepam (Usami a kol. 2002), z prírodných látok sem patria 7-hydroxyflavanon, 3,7-dihydroxyflavanon a naringenin (Brožič a kol. 2006). Medzi induktory patria napríklad etakrynová kyselina, polycyklické aromatické zlúčeniny, niektoré fenolické antioxidanty, ROS a isothiokyanáty (Bonnensen a kol. 2001, Burczynski a kol. 1999, Burczynski a kol. 2001). El-Kabbani a kol. (2010) uvádza ako významené inhibítory salicyláty a ich deriváty, napríklad 3-brom-5-fenylsalicylát alebo 3-chlor-5-fenylsalicylát.

2.2.2.1.5. AKR1C2

AKR1C2 a 1C3 sa vyskytujú v prostate a v prsnej žľaze (Penning a kol. 2004). Prirodzenými substrátmi sú prostaglandíny a steroidy (Penning a Drury 2007, Penning 2015). AKR1C2 je známy ako proteín viažuci žlčové kyseliny, keďže jednou z funkcií je ich transport zo žlčových kanálikov k okrajovým častiam hepatocytov (Stolz a kol. 1993). Napriek štruktúre podobnej AKR1C1 vlastní tento enzým iba 3α-HSD aktivitu. Práve vďaka tomu sa predpokladá, že zohráva dôležitú úlohu v inaktivácii 5α-dihydrotestosterónu a syntéze neuroaktívneho allopregnanolonu (Penning a Drury 2007, Penning 2015).

Nielenže je preukázaná úloha enzýmu v patogenéze a rozvoji nádoru prostaty (Ji a kol. 2003), ale výskumy poukazujú na možnosť zainetresovania aj v patogenéze glaukómu a obezity u žien (Agapova a kol. 2003, Blouin a kol. 2005).

Substráty týchto enzýmov sú obdobné ako u enzýmu AKR1C1. Zo značnej miery je metabolizovaný ketotifen, keďže substrátom sú *R*- aj *S*-enantiomér (Breyer-Pfaff a Nill. 2000, Matsunaga 2006).

AKR1C2 metabolizuje oracín stereošpecificky na (+)-dihydrooracin (Wsol a kol. 2007).

Inhibítormi sú žlčové kyseliny a nesteroidné protizápalové liečivá ibuprofen, kyselina flufenámová či indometacín (Byrns a kol. 2008, Hara a kol. 1996, Higaki a kol. 2003).

2.2.2.1.6. AKR1C3

AKR1C3 je monomérny cytosolický proteín (Miller a kol. 2012) najviac exprimovaný v prostate a prsnej žľaze (Penning a kol. 2000). Nazýva sa aj PGF syntáza, vzhľadom k tomu, že katalyzuje premenu prostaglandínu H_2 na $PGF_{2\alpha}$ a prostaglandínu D_2 na 11β-$PGF_{2\alpha}$ (Komoto a kol. 2004, Penning a kol. 2015). Tiež je zodpovedný za inaktiváciu 5α-dihydrotestosterónu na menej aktívne formy 3α-androstan-3α,17β-diol, androsteron a androstandion (Miller a kol. 2012) Okrem toho vykazuje aj 3α-HSD, 3β-HSD, 17β-HSD a 11-ketoprostaglandín reduktázovú aktivitu, čo mu umožňuje metabolizovať estrogény, prostaglandíny i progesterón (Lin a kol. 2004).

Xenobiotické substráty AKR1C3 sú napr. fenantrenchinón, nitrobenzaldehyd i nitroacetofenon (Suzuki-Yamamoto a kol. 1999).

Preukázaná je korelácia medzi expresiou AKR1C3 a nádorom prostaty (Pfeiffer 2011) a taktiež adenokarcinómom (Miller a kol. 2012) a metastázami lymfatických uzlín pri kolorektálnom karcinóme (Nakarai a kol. 2015). Je známe, že je nadmerne exprimovaný v tkanive prsných nádorov (Yoda a kol. 2015).

AKR1C3 je tiež spájaný s rozvojom rezistencie voči doxorubicínu pri prsných nádoroch (Zhong a kol. 2015).

Preukázaným inhibítorom je indometacín (Byrn a kol. 2008). Khanim a kol. (2014) odhalili inhibičné vlastnosti 4-methyl(de-dimethylamin)-tetracyklínu, ktorý však nepreukazuje antileukemické účinky ako inhibítor 6-medroxyprogesterón acetát, ktorý sa využíva v terapii akútnej myeloidnej leukémie. Selektívnym inhibítorom je indometacínový analóg, *N*-(4-chlorbenzoyl)-melatonin (Byrns a kol. 2008). Bolo zistené, že inhibítor AKR1C3 s označením ASP9521 inhibuje tumorigenézu *in vivo* aj *in vitro* (Loriot a kol. 2014).

2.2.2.1.7. AKR1C4

AKR1C4 sa nachádza prevažne v pečeni (Bauman a kol. 2004, Penning a kol. 2000). Vykazuje hlave 3α-, ale aj slabú 17α- a 20α-HSD aktivitu (Penning a kol. 2000).

Podieľa sa na katabolizme cirkulujúcich steriodných hormónov a metabolizme žlčových kyselín (Bauman a kol. 2004, Russel 2009).

Substrátmi sú rôzne xenobiotické karbonylové zlúčeniny a liečivá, medzi ktoré patrí naloxon, naltrexon a oxykodón, ale je takmer plne neaktívny voči bufenololu, daunorubicínu, haloperidolu a ketotifénu (Matsunaga a kol. 2006). Tiež je preukázané, že látky ako sulfobromftaleín, deriváty kyseliny klofibrovej a protizápalové látky odvodené od 2-arylpropionvej kyseliny zvyšujú aktivitu tohto enzýmu (Matsuura a kol. 1996, Matsuura a kol. 1998, Yamamoto a kol. 1998).

AKR1C4 je spájaný s výskytom kolorektálneho karcinómu (Gylfe a kol. 2013).

AKR1C4 patrí medzi karbonylredukujúce enzýmy, ktoré redukujú oracin (Wsol a kol. 2007).

Enzým je možné inhibovať fenolftaleínom a steroidnými protizápalovými látkami, napr. medroxyprogesterón acetát pôsobí ako inhibítor všetkých enzýmov AKR1C (Higaki a kol. 2003, Khanim a kol. 2014).

2.2.2.1.8. AKR7A2, A3

Molekuly enzýmov rodiny AKR7 sú narozdiel od ostatných rodín funkčné diméry (Kozma a kol. 2002, Penning 2015) a sú charakteriské svojou schopnosťou redukovať dialdehyd aflatoxínu B1 na menej toxický alkohol (Ellis a kol. 1993, Penning 2015).

AKR7A2 je hojne zastúpený okrem pečene aj v extrahepatálnych tkanivách a je preukázaná jeho asociácia s Golgiho aparátom (Ireland a kol. 1998, Kelly a kol. 2000, Kelly a kol. 2002). Štúdie ukazujú, že AKR7A2 je najviac exprimovaná antracyklínreduktáza v srdečnom svale (Hoefer a kol. 2016).

Má vysokú afinitu a katalytickú účinnosť voči sukcinyl semialdehydu (SSA), z toho vyplýva, že SSA je hlavným prirodzeným substrátom enzýmu AKR7A2, ktorý ju metabolizuje na γ-hydroxybutyrát (Lyon a kol. 2007, Penning 2015).

Ľudský enzým AKR7A2 redukuje rôzne xenobiotické aromatické aldehydy a α-dikarbonylové zlúčeniny, ale je neúčinný voči alifatickým aj aromatickým ketonickým zlúčeninám. Patrí medzi ne 2-nitrobenzaldehyd, pyridín-2-aldehyd, isatín, 1,2-naftochinón a 9,10-fenantrénchinón (O'Connor a kol. 1999).

Keďže AKR7A2 je najviac exprimovanou atracyklínreduktázou v srdci, predpokladá sa jeho významná úloha v kardiotoxicite a rezistencii v nádoroch. Preukázaná je zvýšená expresia u AML, pričom pre ochorenie AML sú viac rizikový

pacienti s Downovým syndrómom (DS). Taktiež pacienti s DS vykazujú vyššie riziko pre antracyklínmi indukovanú kardiotoxicitu. V štúdiách bol zisťovaný vzťah medzi expresiou AKR7A2 v srdci a diagnózou DS, kde bolo zistené, že DNA methylácia u pacientov bez a s DS je na rozdielnych CpG ostrovoch (Hoefer a kol. 2016, Quiñones-Lombraña a kol. 2014, Krischer a kol. 1997)

Jedným z preukázaných substrátov tohto enzýmu sú aj antracyklínové chemoterapeutiká doxorubicín a daunorubicín (Quiñones-Lombraña a kol. 2014).

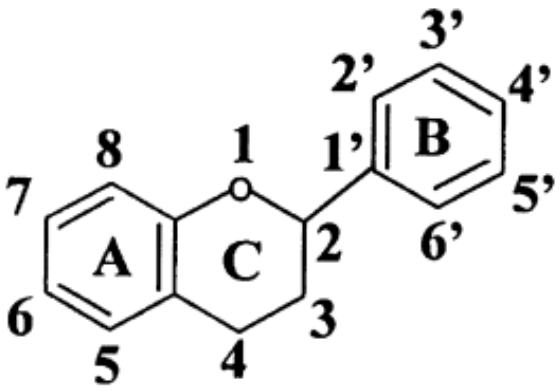
Naopak druhý enzým AKR7A3 má charakteristický výskyt v žalúdku, podžalúdkovej žľaze, pečeni a obličkách a taktiež je podstatne viac účinný v redukcii aflatoxín B_1-dialdehydu (Guengerich a kol. 2001, Knight a kol. 1999).

Okrem toho je však účinný aj v redukcii ďalších látok ako sú 4-nitorbenzaldehyd alebo 9,10-fenantrénchinón (Knight a kol. 1999), vďaka čomu je tomuto eznýmu pripisovaná hlavne detoxifikačná úloha (Barski a kol. 2008).

2.3. PRÍRODNÉ LÁTKY AKO INHIBÍTORY KARBONYLREDUKUJÚCICH ENZÝMOV

2.3.1. FLAVONOIDY

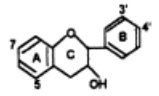
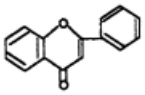
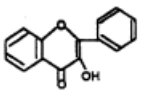
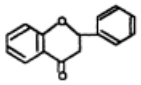
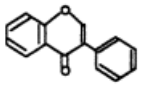
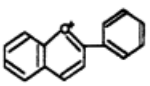
Flavonoidy sú sekundárne rastlinné polyfenoly (Raffa a kol. 2017), ktorých základom je flavanové jadro. Ich chemická štruktúra pozostávajúca z fenylbenzopyranovej kostry je tvorená dvomi fenylovými kruhmi (A a B) spojenými trojuhlíkovým reťazcom tvoriacim kruh C v spojení s kruhom A (Obr. 8) (Aherne a O´Brien 2002, Havsteen 2002, Raffa a kol. 2017, Wang a kol. 2018). Bežne sa vyskytujú v rastlinách (Raffa a kol. 2017), vo veľkom ich môžeme nájsť v listoch, semienkach, kôre či kvetoch (Harborne a Williams 2000).



Obr. 8 Štruktúra flavonoidov (prevzaté z Heim a kol. 2002)

Do dnešnej doby bolo identifikovaných viac ako 9000 flavonoidov a ich denný príjem v strave sa pohybuje v rozmedzí 20 mg až 500 mg, pričom hlavným zdrojom je strava bohatá napríklad na čaj, červené víno, jablká, cibule a paradajky (Wang a kol. 2018).

Klasifikované do tried sú najmä na základe substitúcie a polohe pripojenia kruhu B (Obr. 9) (Wang a kol. 2018). Flavonoidy sa teda líšia usporiadaním hydroxylovej skupiny a naviazaným cukorným zbytkom. V potrave existujú hlavne v podobe 3-*O*-glykosidov a polymérov. Práve polyméry zastávajú významný podiel flavonoidov získaných zo stravy. Z flavanových jednotiek vznikajú komplexné zlúčeniny ako sú taniny a proantokyanidíny (Heim a kol. 2002). Flavóny a flavonoly obsahujú najväčšie množstvo zlúčenín. Napríklad kvercetín, najviac skúmaný flavonoid, radíme práve do triedy flavonolov (Wang a kol. 2018).

Class	General structure	Flavonoid	Substitution Pattern	Dietary Sources
Flavanol		(+)-catechin	3,5,7,3′,4′-OH	Tea (camellia sinensis)[6]
		(-)-epicatechin	3,5,7,3′,4′-OH	Tea[6]
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3′,4′,5′-OH,3-gallate	Tea[6]
Flavone		chrysin	5,7-OH	Fruit skins
		apigenin	5,7,4′-OH	Parsley, celery
		rutin	5,7,3′,4′-OH, 3-rutinose	Red wine[5] , buckwheat[7] citrus, tomato skin[8]
		luteolin	5,7,3′,4′-OH	Red pepper[11]
		luteolin glucosides	5,7,3′-OH, 4′-glucose 5,4′-OH, 4′,7-glucose	
Flavonol		kaempferol	3,5,7,4′-OH	Leek, broccoli, endives grapefruit, black tea
		quercetin	3,5,7,3′,4′-OH	Onion, lettuce, broccoli tomato, tea, red wine berries, olive oil, appleskin
		myricetin	3,5,7,3′,4′,5′-OH	Cranberry grapes, red wine
		tamarixetin	3,5,7,3′-OH,4′-OMe	
Flavanone (dihydroflavon		naringin	5,4′-OH,7-rhamnoglucose	Citrus, grapefruit
		naringenin	5,7,4′-OH	Citrus fruits
		taxifolin	3,5,7,3′,4′-OH	Citrus fruits
		eriodictyol	5,7,3′,4′-OH	Lemons[64]
		hesperidin	3,5,3′-OH,4′-OMe, 7-rutinose	Oranges[9]
Isoflavone		genistin	5,4′-OH, 7-glucose	Soybean[10]
		genistein	5,7,4′-OH	Soybean[10]
		daidzin	4′-OH, 7-glucose	Soybean[10]
		daidzein	7,4′-OH	Soybean[10]
Anthocyanidin		apigenidin	5,7,4′-OH	Colored fruits
		cyanidin	3,5,7,4′-OH,3,5-OMe	Cherry, raspberry, strawberry

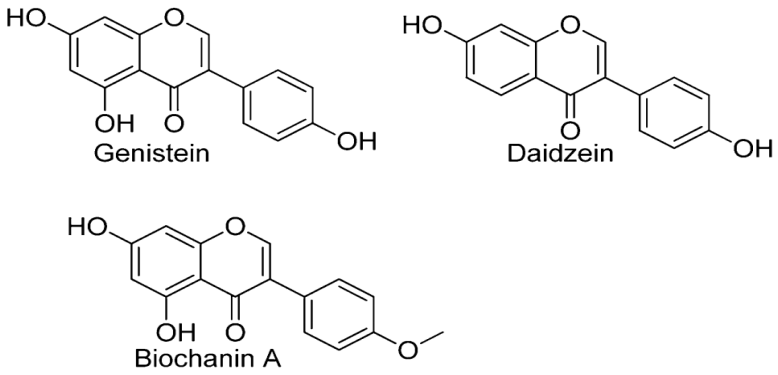
Obr. 9 Základné rozdelenie flavonoidov (prevzaté z Heim a kol. 2002)

Ako už bolo uvedené vyššie, najčastejšie sa flavonoidy vyskytujú vo forme *O*-glykosidov (Heim a kol. 2002). Z toho vyplýva, že ich molekulu je možné rozdeliť na cukornú a necukornú časť, ktorá sa nazýva aglykón (Laštovková 2011). Najčastejšie je sacharidová jednotka glukóza, ale ďalšími bežnými príkladmi sú napríklad galaktóza, arabinóza alebo rhamnóza (Cook a Samman 1996).

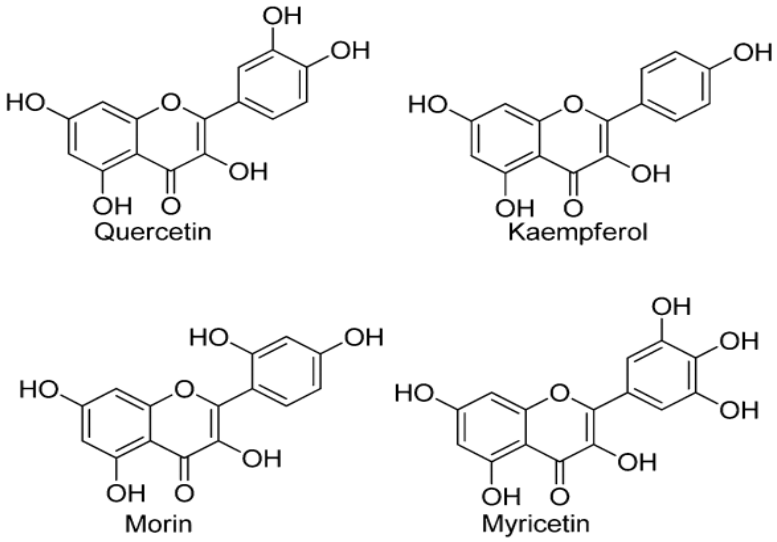
Tieto zlúčeniny vykazujú terapeutický potenciál. Medzi terapeuticky využiteľné účinky patrí ich antioxidačná aktivita, protizápalová aktivita, prevencia neurodegeneratívneho poškodenia, antibakteriálne a antivírové účinky (Raffa a kol. 2017). Za významné účinky flavonoidov sa považujú tiež protinádorové a kardioprotektívne účinky. Tieto účinky by mohli byť významné pre redukciu rizík rôznych chronických ochorení (Haytowitz a kol. 2013; Mazur a kol. 1999, Raffa a kol. 2017)

Bruynzeel a kol. (2006) uvádza, že flavonoidy predstavujú potenciálne atraktívnu skupinu zlúčenín z hľadiska zníženia kardiotoxicity antracyklínov vďaka ich schopnosti chelatovať ionty železa, ale i antioxidačnej aktivite a inhibičnému efektu na karbonylredukujúce enzýmy. Boli predložené dôkazy, že práve flavonoidy môžu byť schopné znížiť doxorubicínom spôsobené kardiálne vedľajšie účinky. Doposiaľ nie je plne objasnené, ktorý z mechanizmov účinkov flavonoidov je zodpovedný za tento efekt. Flavonoidy ako napríklad kvercetín alebo luteolín sú známe inhibítory karbonylredukujúcich enzýmov a niektoré flavonoidy môžu byť schopné týmto mechanizmom fungovať ako farmakologické inhibítory tvorby C13-dihydroantracyklínov, ktoré sú podozrivé, že majú vyšší kardiotoxický efekt ako ich parentné zlúčeniny (Psotová a kol. 2004).

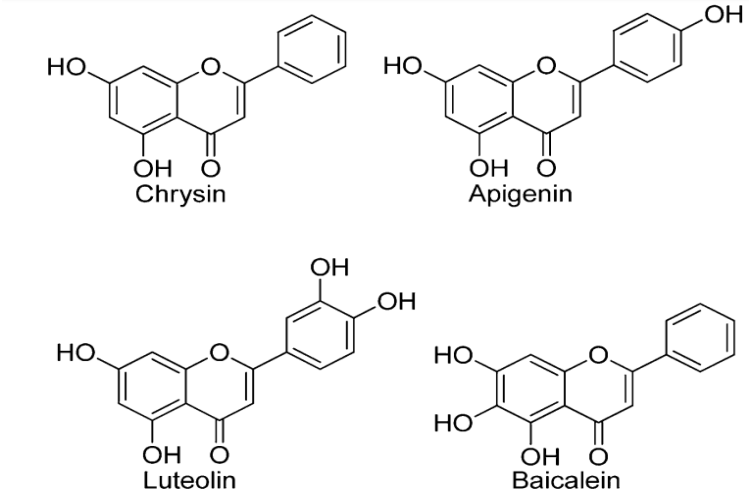
Bolo ďalej preukázané, že flavonoidné zlúčeniny ovplyvňujú procesy a enzýmy súvisiace s proliferáciou, diferenciáciou, apoptózou, zápalom, angiogenézou a taktiež ovplyvňujú mnoholiekovú rezistenciu. Bolo zistené, že flavonoidy sú schopné modulovať eflux látok z buniek spôsobený P-glykoproteínom, čo môže byť jeden z mechanizmov ovplyvňovania rezistencie na chemoterapeutiká pri terapii nádorov (Ravishankar a kol. 2013). Príklady flavonoidných zlúčenín sú zobrazené na Obr. 10–14.



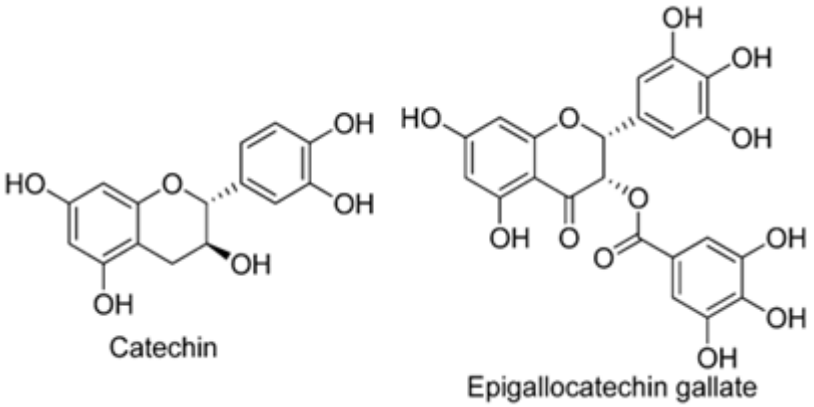
Obr. 10 Príklady chemickej štruktúry isoflavónov (prevzaté z Ravishankar a kol. 2013, upravené)



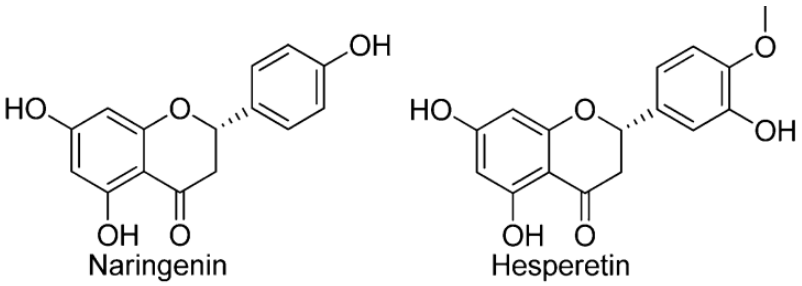
Obr. 11 Príklady chemickej štruktúry flavonolov (prevzaté z Ravishankar a kol. 2013, upravené)



Obr. 12 Príklady chemickej štruktúry flavónov (prevzaté z Ravishankar a kol. 2013, upravené)



Obr. 13 Príklady chemickej štruktúry flavanolov (prevzaté z Ravikashar a kol. 2013, upravené)



Obr. 14 Príklady chemickej štruktúry flavanonov (prevzaté z Ravishankar a kol. 2013, upravené)

Mnoho výskumov sa sústreďuje na skúmanie enzýmu CBR1, pretože je považovaný za jeden z najdôležitejších enzýmov prvej fáze metabolizácie karbonylových zlúčenín. Bolo zistené, že flavóny sa na tento enzým viažu pevnejšie ako na iné štrukturálne typy flavonoidov a najdôležitejšie pre naviazanie sú 5- a 7-hydroxyskupina a 4-karbonylová skupina. Zároveň sa predpokladá, že pre inhibíciu je potrebná 7-hydroxyskupina (Arai a kol. 2015). Ako významný inhibítor tohto enzýmu sa javí monoHER (7-monohydroxyethylrutosid), polosyntetický flavonoid, ktorý je v súčasnosti už vo fáze II klinických štúdií. Štúdie však ukazujú, že inhibičný efekt závisí na konkrétnej štruktúre antracyklínu (daunorubicín alebo doxorubicín) aj na isoforme enzýmu. Tiež bolo preukázané, že sa jedná o inhibičnú reakciu závislú na koncentrácii inhibítoru - flavonoidu (Gonzalez-Covarrubias a kol. 2008).

Ďalším skúmaným enzýmom v súvislosti s inhibičným efektom flavonoidov je AKR1C3, kde Škarydová a kol. (2009) stanovovali inhibíciu enzýmu pri premene oracínu na dihydrooracín. Najvýraznejšie inhibičné vlastnosti boli preukázané u látky 2´-hydroxyflavanón. Ďalšími flavonoidmi s inhibičným efektom boli naringenin, 7-hydrohyflavon a silibinin. Relatívne potentné inhibičné vlastnosti vykazoval aj kvercetin a apigenin (Škarydová a kol. 2009). Tieto inhibítory sú potenciálne využiteľné ako liečivá hormón-dependentných nádorov, vzhľadom na účasť AKR1C3 v steroidnom metabolizme (Penning a kol. 2006). Zároveň sa zistilo, že 7-hydroxyflavon s vysokou selektivitou inhibuje enzým AKR1C1 (Škarydová a kol. 2009).

Seliger a kol. (2018a) vo svojej štúdii skúmali efekt prírodných flavonoidných látok xantohumolu, isoxantohumolu a 8-prenylnaringeninu na aktivitu enzýmov AKR1A1, AKR1B1 a AKR1B10. AKR1B1 a AKR1B10 boli týmito látkami, ktoré sú bežne obsiahnuté v chmeli nekompetitívne inhibované. V ďalšej štúdii Seliger a kol. (2018b) identifikovali opäť látky izolované z chmelu - humulon, adhumulon a kohumulon, ako selektívne inhibítory enzýmu AKR1B10.

Ďalšou prírodnou látkou s inhibičným efektom na CRE je antrachinónová zlúčenina emodín (6-metyl-1,3,8-trihydroxyantrachinón). Bola skúmaná inhibícia šiestich najvýznamnejších enzýmov účastniacich sa metabolizmu daunorubicínu na daunorubicinol CBR1, AKR1C3, AKR7A2, AKR1B10, AKR1A1 a AKR1B1, z čoho všetky okrem AKR7A2 a AKR1A1 boli emodínom inhibované. Tieto výsledky by mohli byť využité v zvýšení účinnosti terapie antracyklínmi a pri znížení rezistencie na tieto chemoterapeutiká (Hintzpeter a kol. 2016).

2.3.2. ĎALŠIE PRÍRODNÉ LÁTKY

Ako vhodné látky potenciálne využiteľné v terapii nádorov v kombinácii s antracyklínovými antibiotikami sa v súčasnosti skúmajú tiež alkaloidy. Alkaloidy sú prírodné zlúčeniny, ktorých spoločným znakom je atóm dusíka uzavretý v heterocykle. Tieto sekundárne metabolity sú hojne zastúpené v rastlinách a sú často nositeľmi ich protizápalových, antimikróbnych, antihypertenzívnych či protinádorových účinkov (Lu a kol. 2012, Skarydova a kol. 2014, Takemura a kol. 2010).

Ako príklad možno uviesť alkaloid piperlongumin. Piska a kol. (2019) zistili, že piperlongumin interaguje s aktívnym miestom enzýmu CBR1, znižuje koncentráciu

redukčného metabolitu doxorubicinolu a zvyšuje antiproliferatívne a proapoptotické účinky terapie antracyklínmi voči nádorovým bunkám prostaty DU145.

Izochinolinové alkaloidy boli skúmané ako inhibítory AKR1C3, pretože ide o dôležitý enzým, ktorý je spájaný s výskytom hormón závislých aj nezývislých nádorov a takisto s rozvojom rezistencie voči antracyklínovým chemoterapeutikám (Skarydova a kol. 2014). Skarydova a kol. (2014) zisťovala vplyv alkaloidov na enzým AKR1C3 pri metabolizme daunorubicínu v prsných nádorových bunkách, kde identifikovali spomedzi 19 testovaných alklaloidov ako najvhodnejší ihibítor stylopín, ktorý predstavuje nový štruktúrny typ, ktorý je schopný ovplyvňovať aktivitu enzýmu AKR1C3.

Na záver by sa dalo konštatovať, že prírodné zlúčeniny sú bohatým zdrojom nových štruktúr, ktoré môžu byť terapeuticky atraktívne. Je odhadované, že 25–50 % všetkých obchodovaných liečiv má svoj pôvod práve v štruktúrach získaných z prírodných zdrojov a niektoré boli revolúciou v terapií závažných ochorení (napr. paklitaxel). Tieto zlúčeniny vlastnia prirodzenú biologickú aktivitu a zároveň sú schopné interagovať s bunečnými štruktúrami. Inhibícia karbonylredukujúcich enzýmov sa javí ako sľubný prístup v terapii niektorých špecifických nádorov alebo spôsob prekonania rezistencie v nádoroch, kde dochádza k zvýšenej expresii týchto enzýmov. Napriek tomu, že flavonoidy nevykazujú vždy excelentný inhibičný potenciál či selektivitu, môžu slúžiť ako vzorová zlúčenina pre cielenú syntézu derivátov s vhodnejšími vlastnosťami (Zemanová a kol. 2015).

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo stanoviť inhibičnú aktivitu vybraných prírodných látok a ich derivátov na vybraných enzýmoch skupiny SDR a AKR. Ciele práce sa dajú rozlíšiť na jednotlivé časti:

- Porovnanie enzýmovej aktivity vybraných enzýmov za využitia substrátu daunorubicínu

- Stanovenie aktivity enzýmu AKR7A2 so substrátom daunorubicínom

- Screening inhibičnej aktivity prírodných zlúčenín a ich derivátov na enzýme AKR7A2 a ďalších antracyklíny redukujúcich enzýmoch

- Stanovenie polovičnej inhibičnej koncentrácie najvýznamnejších inhibítorov

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. MATERIÁL A PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE

Použitý materiál

Všetky použité chemikálie v najvyššej kvalite komerčne dostupnej

DMSO (Fluka)

Amoniak (Lachema)

Ethylacetát (Merck KGaA)

Methanol (Merck)

Mobilná fáza

Kyselina mravčia (Penta)

Acetonitril (Sigma Aldrich)

Reagenčný systém:

$NADP^+$ (Fluka)

Glukóza-6-fosfát (Sigma-Aldrich)

Chlorid horečnatý hexahydrát (Lachema)

Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Roche)

Substrát

Daunorubicín hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Sodno-fosfátový pufor

$Na_2HPO_4.12\ H_2O$ (Penta)

$NaH_2PO_4.2\ H_2O$ (Penta)

Enzýmy:

AKR1A1 (KBV)
AKR1B1 (KBV)
AKR1B10 (KBV)
AKR1C1 (KBV)
AKR1C3 (KBV)

CBR1 (KBV)
CBR3 (KBV)

AKR1C2 (KBV)	
AKR7A2 (KBV)	

Prírodné látky:

1-o-acetyllykorin,	*Chlidanthus fragrans,* Amaryllidaceae
2-hydroxyflavanon,	Sigma Aldrich
3-hydroxyflavanon,	Sigma Aldrich
4-hydroxyflavanon,	Sigma Aldrich
5-hydroxyflavanon,	Sigma Aldrich
7-hydroxyflavanon,	Sigma Aldrich
9-o-demethylgalantin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
Acetylbulbisin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
Acetylhaemantamin	polosyntetický derivát haemataminu
Acetylkaranin	polosyntetický derivát karaninu
Acetyllambellin	*Nerine bowdenii*, Amaryllidaceae
Allokryptopin,	*Chelidonium majus*, Papaveraceae
Ambelin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
Apigenin,	Sigma Aldrich
(−)-Argemonin,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
(+)-Aromolin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Belladin,	*Nerine bowdenii,* Amarylidaceae
(+)-Berbamin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Berberin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Berlambin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Bersavin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Biochanin A,	Sigma Aldrich
(+)-Boldin,	*Peumus boldus,* Monimiaceae
Bufanamin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
Bufanizin	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
Bufanidrin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
(+)-Bulbokapnin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Daidzein,	Sigma Aldrich
Epigalokatechin galát,	Sigma Aldrich
Epimaritidin,	*Narcissus* cv PROFESSOR EINSTEIN, Amarylidaceae

(−)-Escholitzin,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
Floridzin,	Sigma Aldrich
(−)-Fumaricin,	*Fumaria officinalis,* Fumariaceae
(+)-Fumarilin,	*Fumaria officinalis,* Fumariaceae
Galantamin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
(−)-Galantin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
Glycyrrhetinová kyselina,	Sigma Aldrich
(+)-Haemantamin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
Haemantidin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
(+)-Hamayn,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
Hesperetin,	Sigma Aldrich
Hippeastrin,	*Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae
Homolykorin	*Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae
(−)-Hydrastin,	*Fumaria officinalis,* Fumariaceae
(−)-Chlidantin,	*Chlidanthum fragrans,* Amaryllidaceae
Chlorogenová kyselina,	Sigma Aldrich
(−)-Isokorydin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
(−)-Kalifornidin,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
(+)-Kanadalin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
(−)-Kanadin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Karanin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
(−)-Karyachin,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
Katechin,	Sigma Aldrich
Kávová kyselina,	Sigma Aldrich
(+)-Korydalin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
(+)-Korydin,	*Corydalis cava*, Fumariaceae
(+)-Korynolin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
(−)-Korykavamin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Korykavidin	*Corydalis cava,* Fumariaceae
(−)-Korypalmin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Krinin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae

Kryptopin,	*Fumaria officinalis,* Fumariaceae
Kvercetin,	Sigma Aldrich
Kvercitrin	Sigma Aldrich
Laurotetanin	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Luteolin,	Sigma Aldrich
Lykorenin,	*Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae
(−)-Lykorin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae
Masonin,	*Nerine filifolia,* Amaryllidaceae
Matrin,	*Sophora flavescens,* Fabaceae
Morin,	Sigma Aldrich
Myricetin,	*Fumaria officinallis,* Fumariaceae
Naringenin,	Sigma Aldrich
(+)-N-methyllaurotetain,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
(+)-Norisokorydin,	*Peumus boldus,* Monimiaceae
(+)-Obamegin,	*Berberis vulgaris,* Berberidaceae
Odulin,	*Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, Amaryllidaceae
(−)-*O*-methylkaryachin,	*Escholtzia californica,* Papaveraceae
O-methylfumarofin,	*Fumaria officinalis*, Fumariaceae
Oxymatrin,	*Sophora flavescens,* Fabaceae
(−)-Pallidin,	*Peumus boldus,* Monimiaceae
Palmatin,	*Corydalis cava*, Fumariaceae
(−)-Parfumin,	*Fumaria officinalis*, Fumariaceae
Protopin,	*Chelidonium majus,* Papaveraceae
Rutin,	Sigma Aldrich
(−)-Skoulerin,	*Corydalis cava*, Fumariaceae
Silibinin,	Sigma Aldrich
Sinaktin	*Fumaria officinalis*, Fumariaceae
(−)-Sinoakutin,	*Corydalis cava*, Fumariaceae
(−)-Stylopin,	*Chelidonium majus,* Papaveraceae
Taxifolin,	Sigma Aldrich
(+)-Tazzetin,	*Zephyranthes robusta,* Amaryllidaceae

(−)-Tetrahydrokolumbamin,	*Corydalis yanhusuo,* Papaveraceae
Tetrahydromasonin,	*Nerine filifolia,* Amaryllidaceae
(+)-Tetrahydropalmatin,	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Thaliktrikavin	*Corydalis cava,* Fumariaceae
Undulatin,	*Nerine bowdenii,* Amaryllidaceae
Vitexin,	Sigma Aldrich

V priebehu meraní na stanovenie inhibičnej aktivity prírodných látok nám boli poskytnuté z Katedry farmaceutickej botaniky novosyntetizované deriváty alkaloidov, u ktorých nebola stanovená aktivita voči žiadnemu karbonylredukujúcemu enzýmu. Z toho dôvodu som sa v tejto práci zamerala na základný screening týchto látok voči všetkým antracyklínreduktázam. Keďže tieto zlúčeniny budú súčasťou patentového konania, sú v tejto diplomovej práci označované kódmi a nie je uvedená ich štruktúra:
LC20; LC50; LC73; LC74; LC75; LC76; LC104; LC106; LC108; LC118

Pripravované roztoky a pufry

- 0,1 M Na-fosfátový pufor, pH 7,4
  Pufor bol pripravený zmiešaním vhodného pomeru 0,1 M roztoku Na_2HPO_4 (roztok A) a 0,1 M roztoku NaH_2PO_4 (roztok B), aby bolo dosiahnuté pH 7,4. Roztok A bol pripravený navážením 7,16 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ a zriedením vodou na objem 200 ml. Roztok B bol pripravený rozpustením 3,12 g $NaH_2PO_4.2\ H_2O$ v 200 ml vody. Roztok bol uchovávaný v chladničke.

- 20 mM daunorubicin (zásobný)
  Roztok bol pripravený navážením 1,13 mg daunorubicín hydrochloridu na analytických váhach a rozpustením v 100 µl vody. Roztok bol pripravovaný čerstvý.

- 5 mM daunorubicin (do reakcie)
  Roztok daunorubicínu bol v čas potreby nariedený zo zásobného 20 mM roztoku daunorubicínu a vody. Na 23 reakcií bolo použitých 57,5 µl 20 mM roztoku daunorubicínu a 172,5 µl vody.

- príprava enzýmov

  Enzýmy používané v reakciách boli nariedené zo zásobných roztokov (uchovávaných v mrazničke) a sodno-fosfátového pufru na základe koncentrácie zásobných roztokov. V čase potreby bolo pripravené množstvo potrebné na 21 reakcií.

- príprava inhibítorov

  Používané inhibítory boli uskladňované v chladničke v koncentrácii 1 mM. Do každej reakcie boli pipetované 2 µl tak, aby výsledná koncentrácia inhibítou v reakcii bola 20 µM.

- regeneračný systém

  Na analytických váhach bolo navážených 5 mg $NADP^+$ a 15 mg glukóza-6-fosfátu do mikroskúmavky Eppendorf. Obsah mikroskúmavky bol rozpustený v 250 µl 0,1 M Na-fosfátového pufru. Následne bolo pridaných 250 µl 0,1 M $MgCl_2$ a výsledný roztok bol dôkladne homogenizovaný. Tesne pred inkubáciu bolo pridaných 12,5 µl glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Toto množstvo regeneračného systému postačuje na 25 reakcií. Regeneračný systém bol pripravovaný v uvedenom množstve alebo v množstve dvojnásobnom, ktoré postačilo na 50 reakcií. Tento NADPH-regeneračný systém bol pripravený vždy v čase potreby. Zloženie roztoku je uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1 Zloženie regeneračného roztoku pre 1 reakciu

NADP	0,2 mg	Rozpustiť v 10 µl pufru
Glukóza-6-fosfát	0,6 mg	
$MgCl_2$		10 µl
Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza		0,5 µl

- mobilná fáza pre UHPLC

  Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním 0,1% kyseliny mravčej a acetonitrilu v pomere 74:26. Ku každej vzorke bolo pridaných 400 µl mobilnej fázy, z toho vyplýva, že na 25 reakcií bolo pripravených 10 ml mobilnej fázy.

Pomôcky a prístroje

- pomôcky

  V experimentálnej časti tejto diplomovej práce boli používané kadičky, odmerné valce, navažovacie lodičky, kopistka, parafilm, mikroskúmavky Eppendorf, mikropipety a špičky Biohit, stojany, injekčné striekačky VWR, filtre Whatman (Sigma Aldrich), stopky, sklenené vialky a inzerty Agilent Technologies, septá a viečka Agilent Technologies a ďalšie pomôcky potrebné pre prácu v laboratóriu

- prístroje

analytické váhy Scaltec SBC 22	Scaltec, USA,
termomixér Bioer Mixing Block MB-102	Eppendorf, Nemecko
prístroj na výrobu ľadovej drte Scotsman AF80	Scotsman, Velká Británia
trepačka Vortex Genius 3	IKA, Německo
centrifuga MiniSpin Plus,	Eppendorf, Nemecko
vákuový koncentrátor Concentrator plus,	Eppendorf, Nemecko
ultrazvuková čistička ACV 613T	Activ, Poľsko
UHPLC systém Agilent 1290,	Agilent Technologies, USA

4.2. METODIKA

4.2.1. Porovnanie aktivity skúmaných enzýmov

Do eppendorfiek bol pipetovaný regeneračný systém (20 µl), Na-fosfátový pufor (60 µl) a enzým v požadovanej koncentrácii 0,5 mg/ml (10 µl). Vzorky boli preinkubované 10 minút pri teplote 37 °C. Následne bol v rovnomerných časových intervaloch pridávaný substrát daunorubicín (10 µl). Reakcia každého enzýmu bola prevádzaná v triplikátoch, kontrola bez substrátu bola prevedená dvakrát pre každý enzým a kontrola bez enzýmu bola prevedená v duplikáte. Vzorky boli inkubované 30 minút pri 37 °C. Na ukončenie reakcie bolo pridaných 40 µl 26% NH_3 v totožnom poradí

a časových rozmedziach. Následne boli vzorky uložené na 10 minút do ľadu. Ďalší postup je totožný s postupom stanovenia enzýmovej aktivity AKR7A2.

4.2.2. Stanovenie enzýmovej aktivity AKR7A2 k daunorubicínu

Reakčná zmes pozostávajúca z 0,1 M Na-fosfátového pufru, NADPH-regeneračného systému, ktorý bol pripravovaný pred reakciou, a enzýmu AKR7A2 bola pipetovaná do eppendorfiek. Reakčná zmes bola preinkubovaná 10 minút pri 37 °C, následne bol v pravidelných 30 sekundových intervaloch pridávaný substrát daunorubicín v koncetráciách 20, 10, 8, 6, 4 a 2 mM v množstve 10 µl alebo 10 µl vody u kontroly bez substrátu, čím bola započatá reakcia. Každá reakcia bola v danej koncentrácii bola realizovaná ako triplikát a boli prevedené 2 kontrolné reakcie bez substrátu a 2 kontrolné reakcie bez enzýmu. Vzorky boli inkubované 30 minút pri teplote 37 °C. Reakcia bola ukončená v rovnakom poradí a časovom intervale pridaním 40 µl 26% NH_3. Ďalej boli vzorky uchované na 10 minút v ľade, následne k nim bol pridaný ethylacetát v množstve 1 ml a vzroky boli umiestnené na trepačku na 15 minút, kde bol do organickej fázy extrahovaný metabolit daunorubicinol. Vzorky boli centrifugované 2 minúty pri otáčkach 13 400 rpm. Následne bola odobraná organická vrstva do prázdnych eppendofiek, ktoré boli otvorené umiestnené do koncentrátoru, kde pri 30 °C došlo k jej odpareniu.

Ku každej odparenej vzorke bolo pridaných 400 µl mobilnej fázy pre UHPLC, každá vzorka bola dôkladne pretrepaná a následne umiestnená do ultrazvukovej lázne, kde došlo k rozpusteniu odparku. Celý objem bol prepipetovaný do insertov, ktroré boli umiestnené do vialiek. Ďalej bola prevedená analýza UHPLC.

4.2.3. Screening inhibičných vlastností testovaných látok

Do eppendorfiek bol rozpipetovaný regeneračný systém (20 µl), pufor v množstve 60 µl pre neinhibovanú reakciu a kontrolu bez substrátu, 70 µl pre kontrolu bez enzýmu alebo 58 µl pre reakciu s inhibítormi, enzým (10 µl) (okrem kontroly bez enzýmu). Ďalej bol do reakcie pridaný inhibítor alebo DMSO v množstve 2 µl. Skúmané potenciálne inhibítory boli rozpustené v DMSO a preto bola neinhibovaná rekacia s DMSO považovaná za kontrolu so 100% aktivitou. Reakčná zmes bola preinkubovaná po dobu 10 minút pri teplote 37 °C, následne bol pipetovaný v pravidelných časových intervaloch 5 mM daunorubicín 10 µl alebo 10 µl vody pri kontrole bez substrátu.

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 2. Ďalší postup je obdobný ako pri stanovovaní enzýmovej aktivity AKR7A2 k daunorubicínu.

V prípade screeningu zlúčenín označených kódmi LC bol použitý alternatívny postup, kde bola reakcia zastavená pridaním 300 µl methanolu. Vzorky boli vložené do ľadu na 10 minút a následne centrifugované 10 minút. Následne boli pipetované do insertov pomocou striekačiek s filtrom, vložené do vialiek a bola prevedená UHPLC analýza. Zlúčeniny označené ako LC sme okrem vplyvu na enzým AKR7A2 (5 µg proteínu/100 µl reakcii) testovali tiež ich vplyv na enzýmy AKR1A1 (1 µg proteínu/100 µl reakcii), AKR1B1 (5 µg proteínu/100 µl reakcii), AKR1B10 (3 µg proteínu/100 µl reakcii) a AKR1C3 (1,5 µg proteínu/100 µl reakcii). V prípade AKR1B1 bola reakcia predĺžená na 180 minút.

Tab. 2 Zloženie reakčnej zmesi

	Pufor (µl)	**Enzým (µl)**	**Regeneračný systém (µl)**	**Inhibítor (µl)**	**Substrát (µl)**
Neinhibovaná reakcia	60	10	20	0	10
Kontrola DMSO	58	10	20	2	10
Inhibovaná reakcia	58	10	20	2	10
Kontrola bez enzýmu	60	10 µl pufru	20	0	10
Kontrola bez substrátu	60	10	20	0	10 µl vody

4.2.4. Stanovenie IC_{50}

Na stanovenie IC_{50} bola zmeraná aktivita enzýmu AKR7A2 pri rôznych koncentráciách inhibítoru (−)-epigalokatechin galátu. Použité boli koncentrácie 1, 10, 25, 50, 75, 100, 200 a 500 µM (finálna koncentrácia v reakcii). Postup bol obdobných ako pri screeningu inhibičných vlastností testovaných látok.

4.2.5. UHPLC

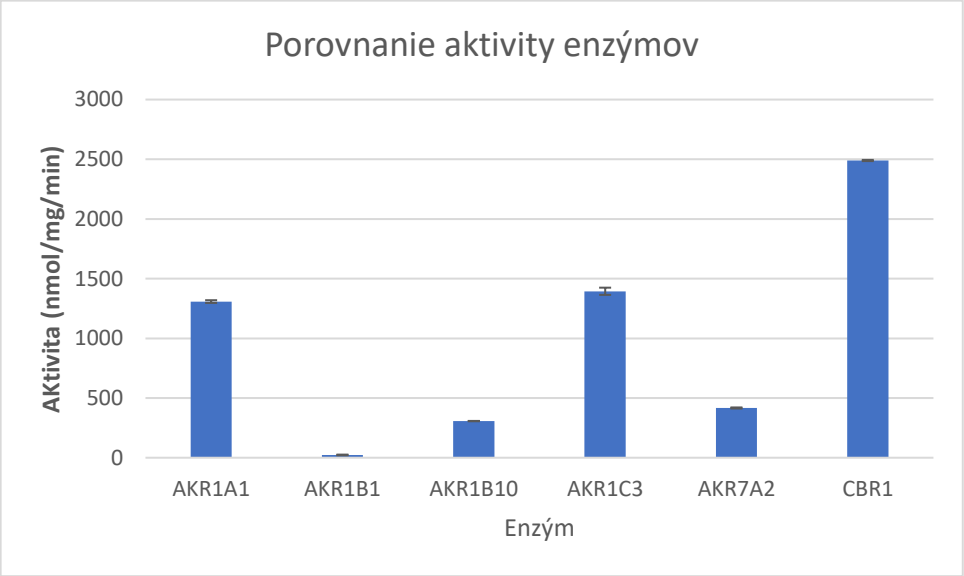
Vyhodnotenie reakcií bolo prevedné pomocou UHPLC Agilent 1290 Series (kolóna Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm; 1,8 µm) s filtrom 1290 Infinity) detekciou redukčného produktu daunorubicinolu, ktorý bol identifikovaný na základe retenčného času. Kvantitatívne množstvo daunorubicinolu bolo stanovené na základe odozvy fotometrockého detektoru.

Nástrek vzorku na kolónu bol v objeme 5 µl, elúcia bola isokratická, s prietokovou rýchlosťou 0,8 ml/min, mobilná fáza 0,1% kyselina mravčia:acetonitril (74:26), pri teplote 40 °C a tlaku 535 barr, detekcia flurescenčne (detektor FLDA, excitačná vlnová dĺžka 480 nm, emisná vlnová dĺžka 560 nm)

5. VÝSLEDKY

5.1. Vyhodnotenie aktivity enzýmov

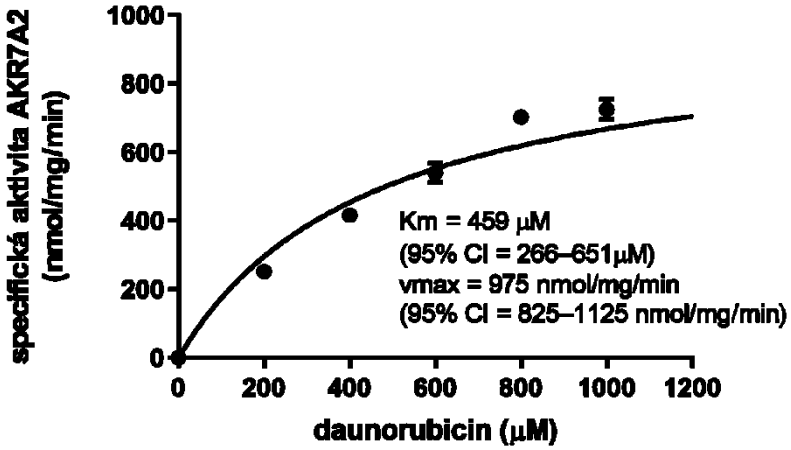
Najskôr bolo prevedené porovnanie aktivity karbonylredukujúcich enzýmov podľa postupu 4.2.1. Enzýmy boli pripravené vo finálnej koncentrácii 0,5 mg/ml a vyhodnotené pomocou UHPLC. Výsledky sú zaznamená v grafe Obr. 15 Aktivita bola hodnotená aj u enzýmov AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3, ale za použitých uvedených podmienok nebola zistená žiadna významnejšia aktivita a preto neboli zaznamenané do grafu.



Obr. 15 Porovnanie aktivity CRE

5.2. Stanovenie enzýmovej aktivity AKR7A2

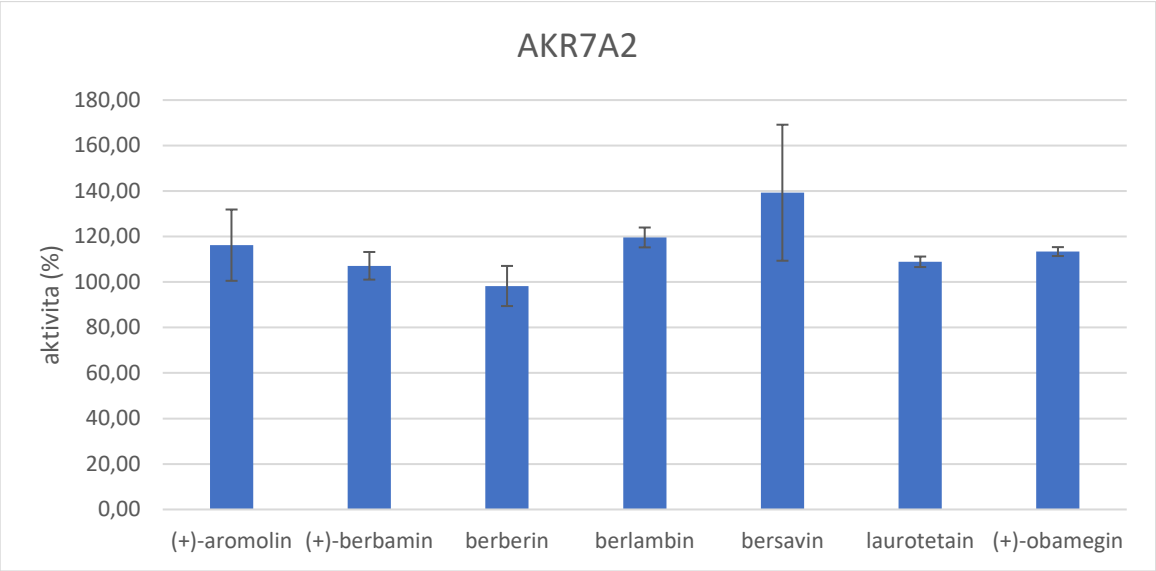
Na základe postupu 4.2.2. bola stanovená závislosť aktivity enzýmu AKR7A2 k daunorubicínu. Na základe výsledkov bola pri screeningu inhibičných látok používaná koncentrácia daunorubicínu 5 mM. Graf závisloti aktivity enzýmu na koncentrácii substrátu je v obrázku 16.



Obr. 16 Závislosť aktivity AKR7A2 na koncentrácii substrátu

5.3. Screening inhibičnej aktivity

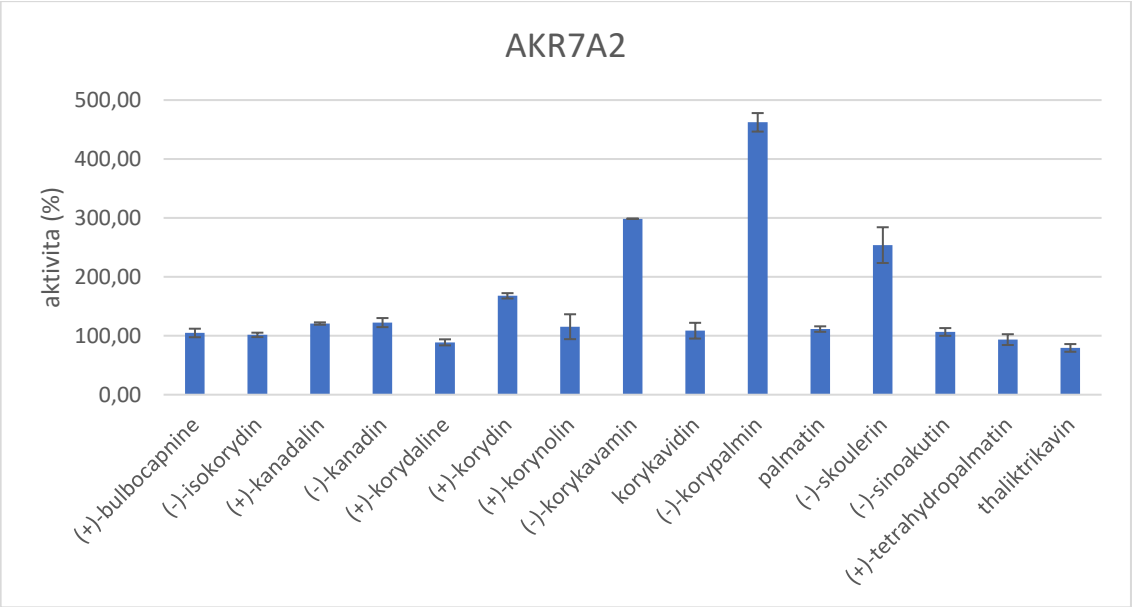
Pre screening inhibičnej aktivity boli skúmané prírodné inhibítory vo výslednej koncentrácii 20 μM v reakcii podľa postupu 4.2.3. Zistenia sú spracované do tabuliek a grafov (Obr. 17–31, Tabulka 3–17), kde je vyjadrená inhibícia enzýmov danou prírodnou zlúčeninou percentuálne vzhľadom k neinhibovanej reakcii. Skúmané potenciálne inhibítory boli rozpustené v DMSO a preto bola neinhibovaná reakcia s DMSO považovaná za kontrolu so 100% aktivitou. Na základe zistení bola aktivita silnejších inhibítorov (u ktorých bola inhibícia viac ako 20 %) opäť zmeraná vo vyššej koncentrácii (50 μM vo výslednej reakcii) (Obr. 32, Tab. 18). Na záver bola meraná aktivita potenciálnych inhibítorov poskytnutých z KBV, všetky v koncentráciách 10 μM a 50 μM. Výsledky z meraní sú uvedené v grafoch Obr. 33–44 a tabuľkách 19–30.



Obr. 17 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Berberis vulgaris.*

Tab. 3 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Berberis vulgaris.*

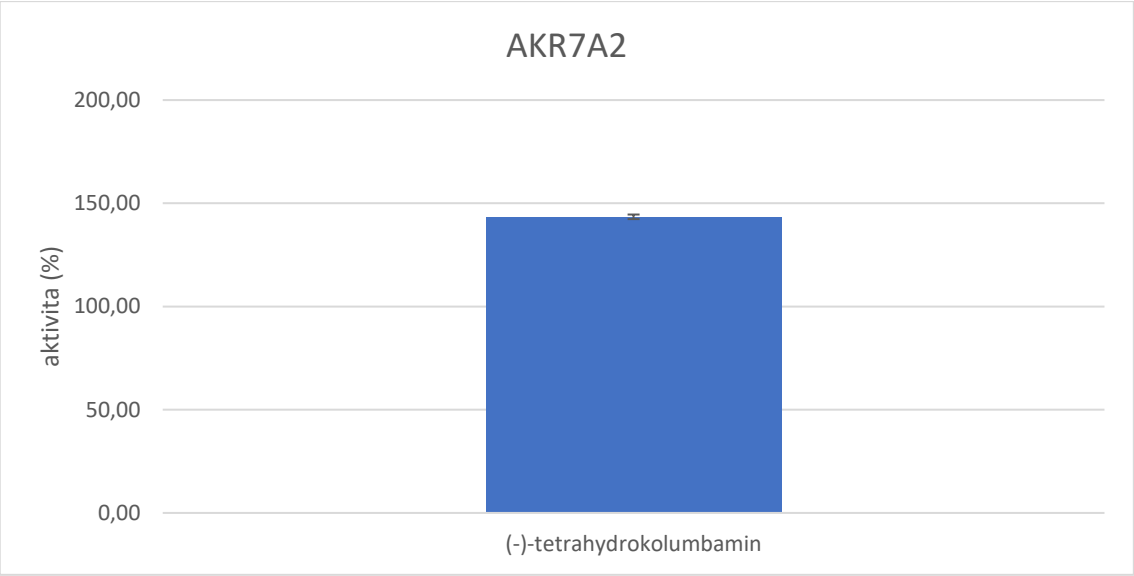
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(+)-aromolin	116,21 ± 15,68	neinhibuje
(+)-berbamin	107,14 ± 6,07	neinhibuje
berberin	98,26 ± 8,82	1,74 ± 8,82
berlambin	119,60 ± 4,37	neinhibuje
bersavin	139,27 ± 29,90	neinhibuje
laurotetain	108,90 ± 2,31	neinhibuje
(+)-obamegin	113,39 ± 1,96	neinhibuje



Obr. 18 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Corydalis cava*.

Tab. 4 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Corydalis cava*.

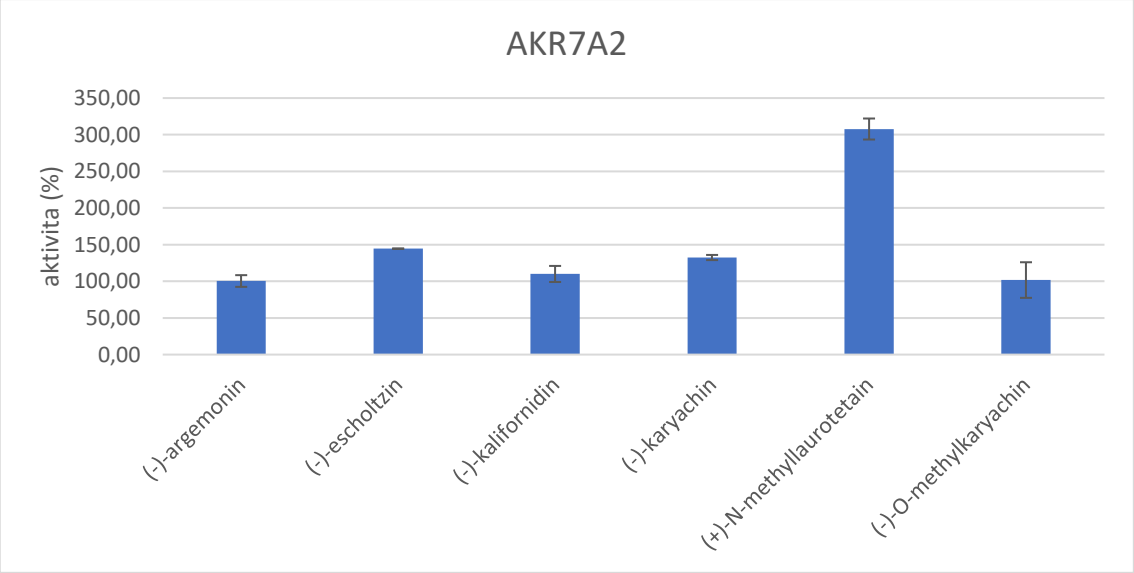
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(+)-bulbokapnin	104,76 ± 7,25	neinhibuje
(−)-isokorydin	101,49 ± 3,74	neinhibuje
(+)-kanadalin	120,74 ± 2,02	neinhibuje
(−)-kanadin	122,35 ± 7,71	neinhibuje
(+)-korydalin	88,83 ± 5,14	11,17 ± 5,14
(+)-korydin	167,80 ± 4,53	neinhibuje
(+)-korynolin	115,37 ± 21,12	neinhibuje
(−)-korykavamin	298,65 ± 0,05	neinhibuje
korykavidin	108,62 ± 13,39	neinhibuje
(−)-korypalmin	462,23 ± 15,70	neinhibuje
palmatin	111,37 ± 4,65	neinhibuje
(−)-skoulerin	253,83 ± 30,33	neinhibuje
(−)-sinoakutin	106,49 ± 6,53	neinhibuje
(+)-tetrahydropalmatin	93,45 ± 9,17	6,55±9,17
thaliktrikavin	79,37 ± 6,54	20,63±6,54



Obr. 19 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Corydalis yanhusuo*.

Tab. 5 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Corydalis yanhusuo*.

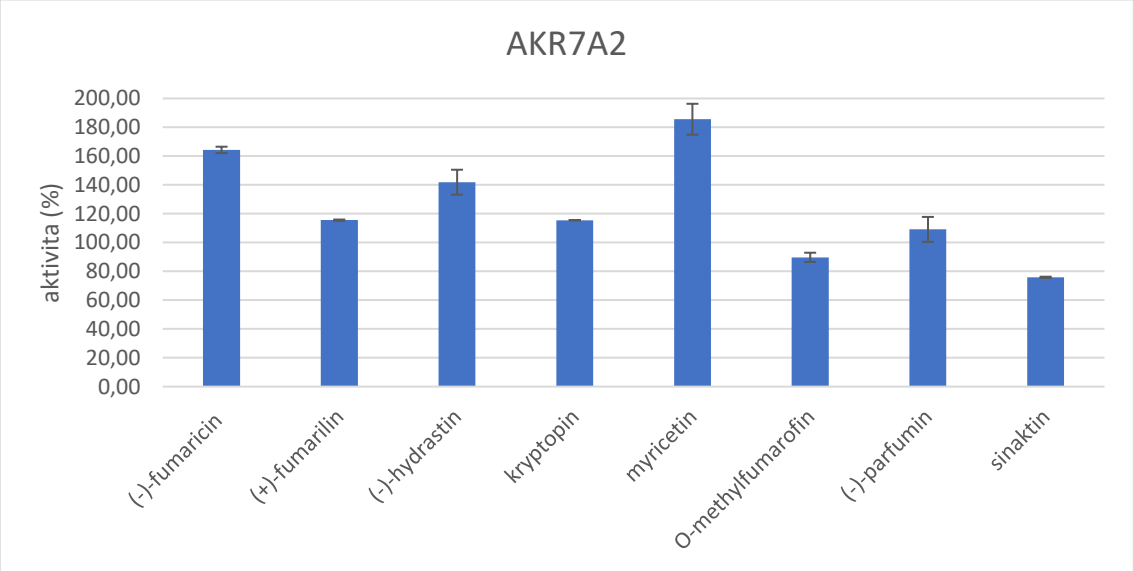
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(−)-tetrahydrokolumbamin	143,46 ± 1,10	neinhibuje



Obr. 20 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Escholtzia californica*.

Tab. 6 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Escholtzia californica*.

Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(−)-argemonin	100,39 ± 7,99	neinhibuje
(−)-escholtzin	144,52 ± 0,30	neinhibuje
(−)-kalifornidin	110,03 ± 10,96	neinhibuje
(−)-karyachin	132,46 ± 3,52	neinhibuje
(+)-*N*-methyllaurotetain	307,77 ± 14,34	neinhibuje
(−)-*O*-methylkaryachin	101,73 ± 24,29	neinhibuje

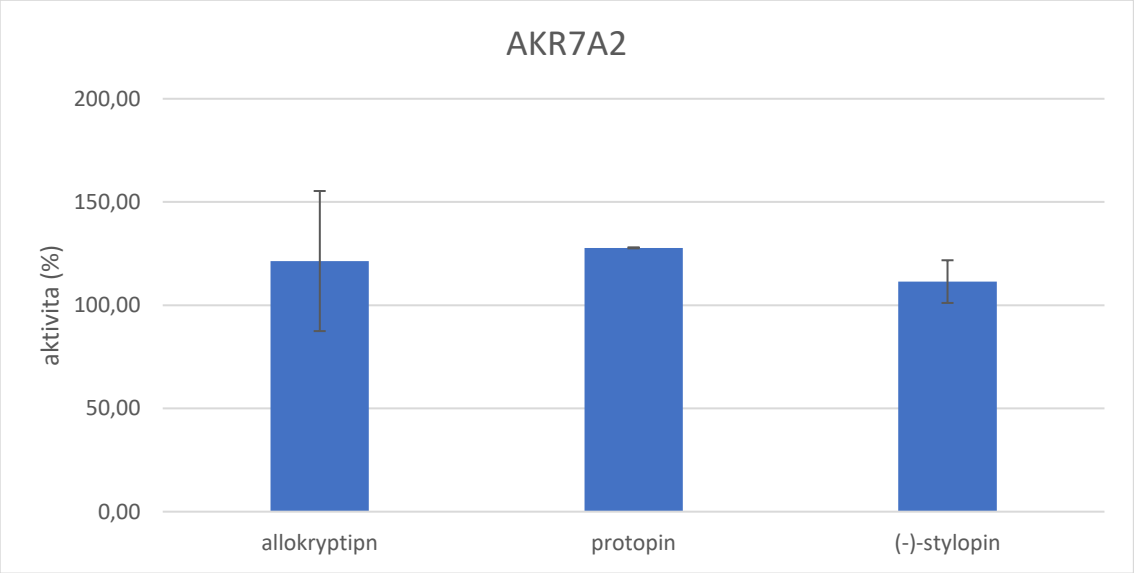


Obr. 21 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Fumaria officinalis*.

Tab. 7 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Fumaria officinalis.*

Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(−)-fumaricin	164,32 ± 2,21	neinhibuje
(+)-fumarilin	115,53 ± 0,44	neinhibuje
(−)-hydrastin	141,88 ± 8,66	neinhibuje
kryptopin	115,50 ± 0,07	neinhibuje

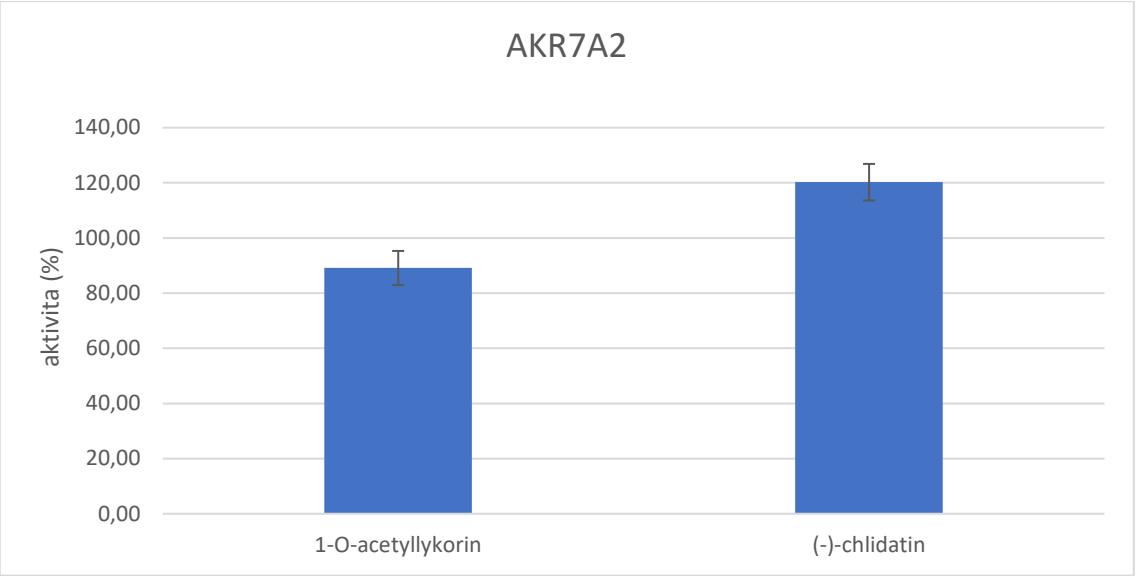
myricetin	185,59 ± 10,74	neinhibuje
O-methylfumarofin	89,74 ± 3,21	10,26 ± 3,21
(−)-parfumin	109,12 ± 8,66	neinhibuje
sinaktin	75,87 ± 0,42	24,13 ± 0,42



Obr. 22 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Chelidonium majus.*

Tab. 8 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Chelidonium majus.*

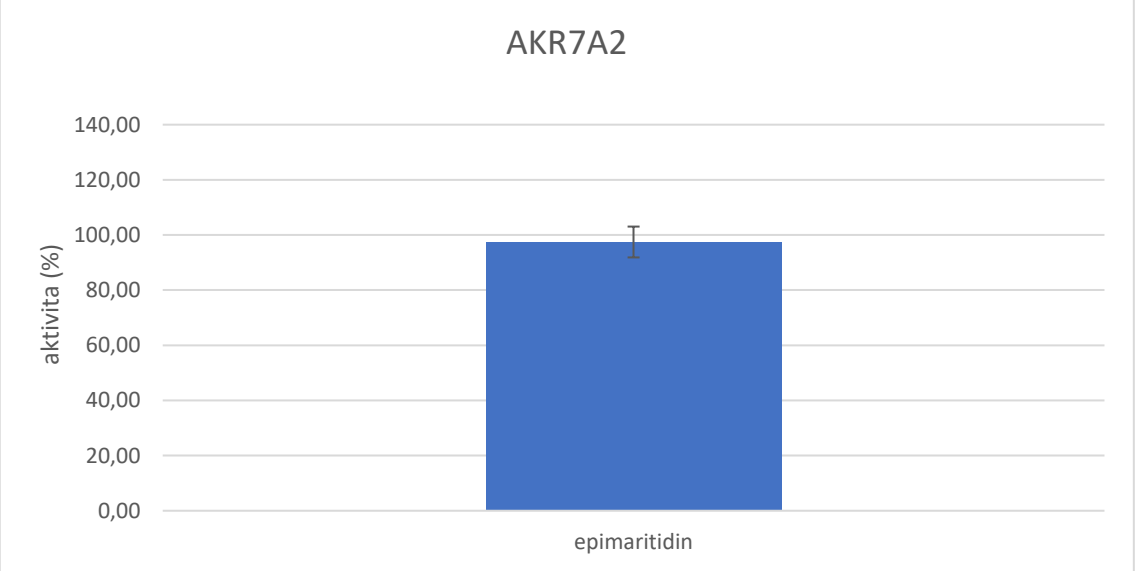
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
allokryptopin	121,40 ± 33,93	neinhibuje
protopin	127,80 ± 0,24	neinhibuje
(−)-stylopin	111,44 ± 10,34	neinhibuje



Obr. 23 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Chlidanthus fragrans.*

Tab. 9 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Chlidanthus fragrans.*

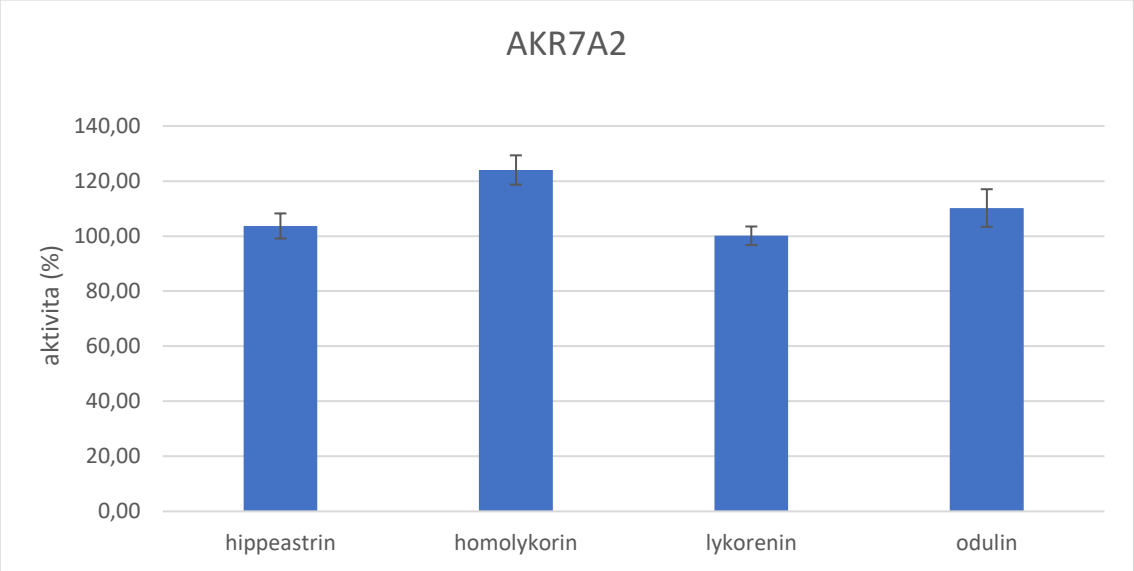
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
1-*O*-acetyllykorin	89,11 ± 6,19	10,89 ± 6,19
(−)-chlidatin	120,24 ± 6,61	neinhibuje



Obr. 24 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Narcissus* cv PROFESSOR EINSTEIN.

Tab. 10 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Narcissus* cv PROFESSOR EINSTEIN.

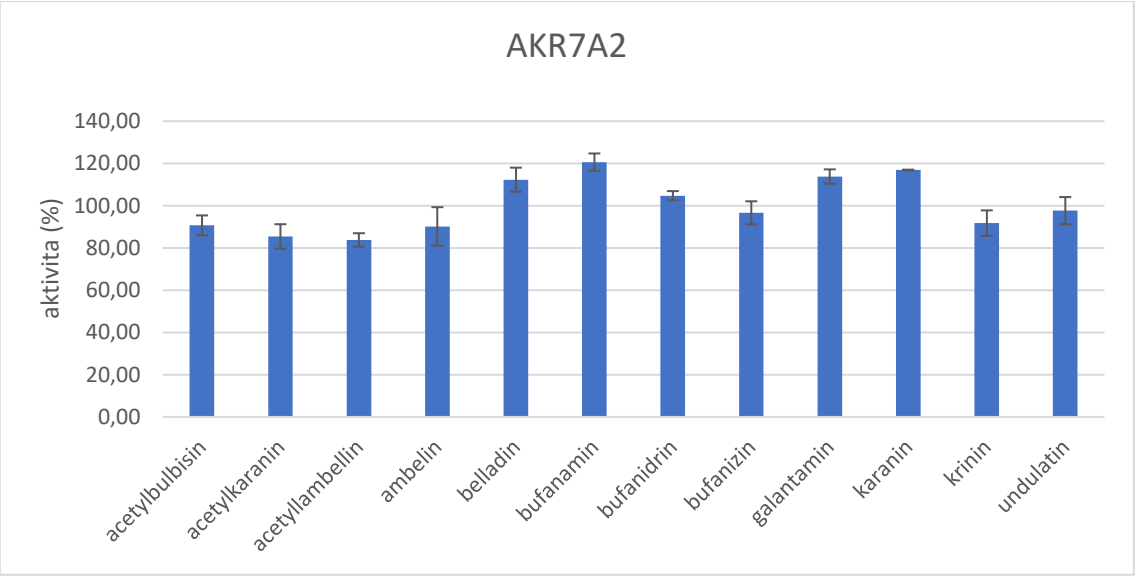
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
epimatridin	97,45 ± 5,59	2,55 ± 5,59



Obr. 25 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master.

Tab. 11 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master.

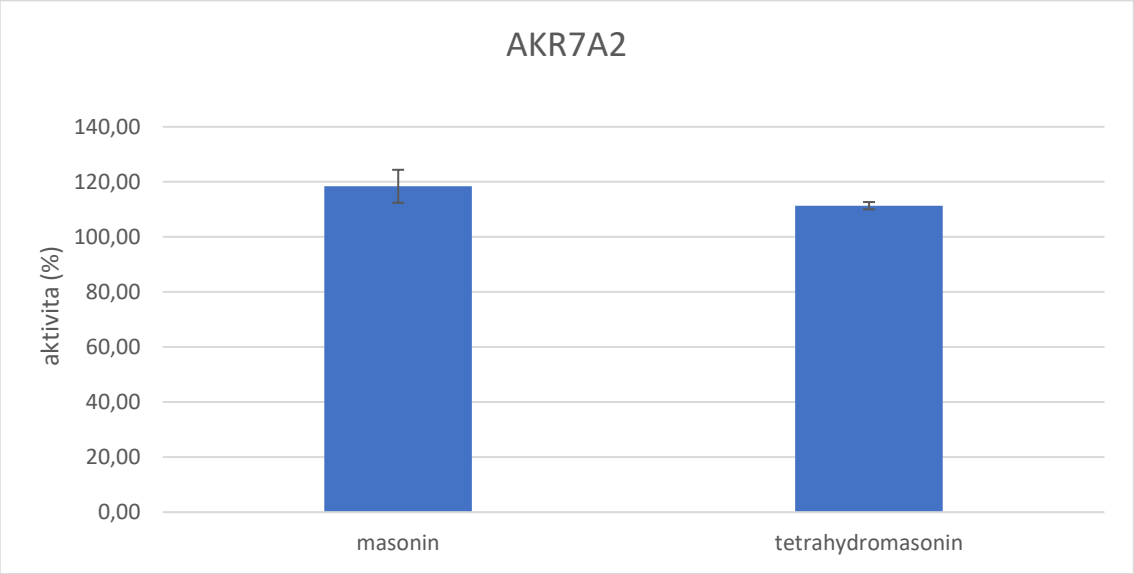
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
hippeastrin	103,69 ± 4,56	neinhibuje
homolykorin	124,03 ± 5,32	neinhibuje
lykorenin	100,12 ± 3,38	neinhibuje
odulin	110,22 ± 6,82	neinhibuje



Obr. 26 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 μM), *Nerine bowdenii*. Do tejto skupiny látok bola zaradená aj zlúčenina acetylkaranin, ktorý je polosyntetický derivát odvodený od karaninu.

Tab. 12 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 μM), *Nerine bowdenii*. Do tejto skupiny látok bola zaradená aj zlúčenina acetylkaranin, ktorý je polosyntetický derivát odvodený od karaninu.

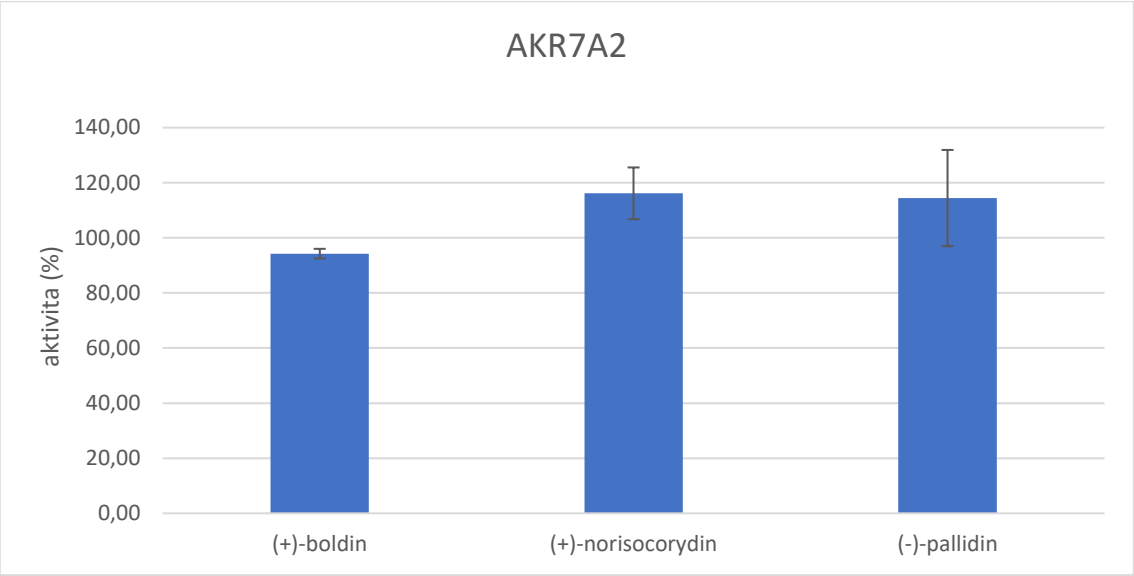
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
acetylbulbisin	90,68 ± 4,73	9,32 ± 4,73
acetylkaranin	85,45 ± 5,79	14,55 ± 5,79
acetyllambelin	83,78 ± 3,19	16,22 ± 3,19
ambelin	90,16 ± 9,15	9,84 ± 9,15
belladin	112,32 ± 5,69	neinhibuje
bufanamin	120,63 ± 4,10	neinhibuje
bufanidrin	104,73 ± 2,18	neinhibuje
bufanizin	96,62 ± 5,47	3,38 ± 5,47
galantamin	113,81 ± 3,39	neinhibuje
karanin	116,89 ± 0,17	neinhibuje
krinin	91,76 ± 6,03	8,24 ± 6,03
undulatin	97,64 ± 6,45	2,36 ± 6,45



Obr. 27 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Nerine filifolia.*

Tab. 13 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Nerine filifolia.*

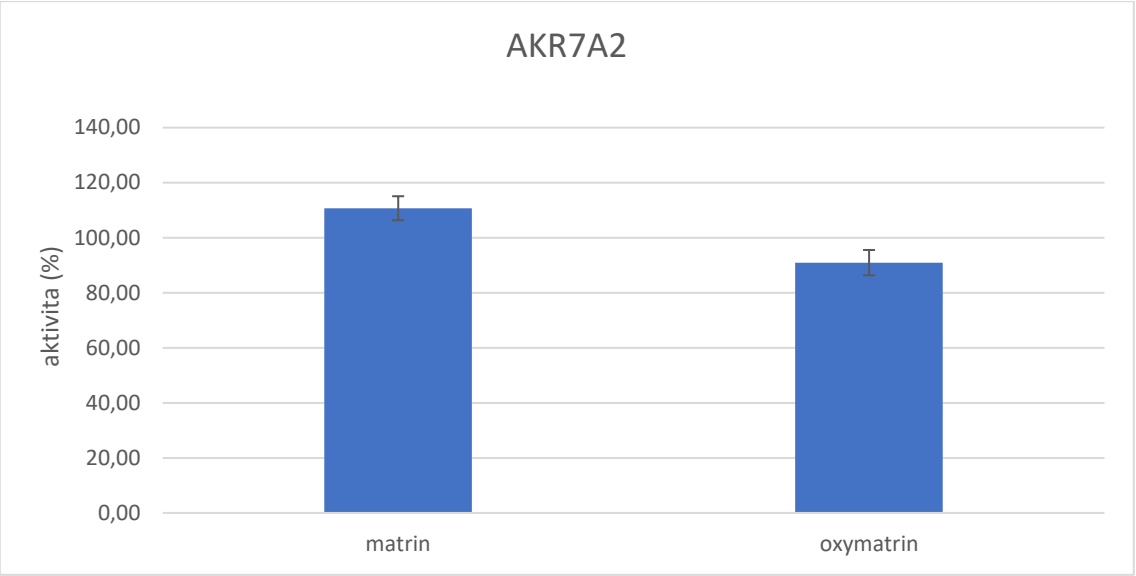
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
masonin	118,40 ± 5,99	neinhibuje
tetrahydromasonin	111,35 ± 1,33	neinhibuje



Obr. 28 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Peumus boldus.*

Tab. 14 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Peumus boldus.*

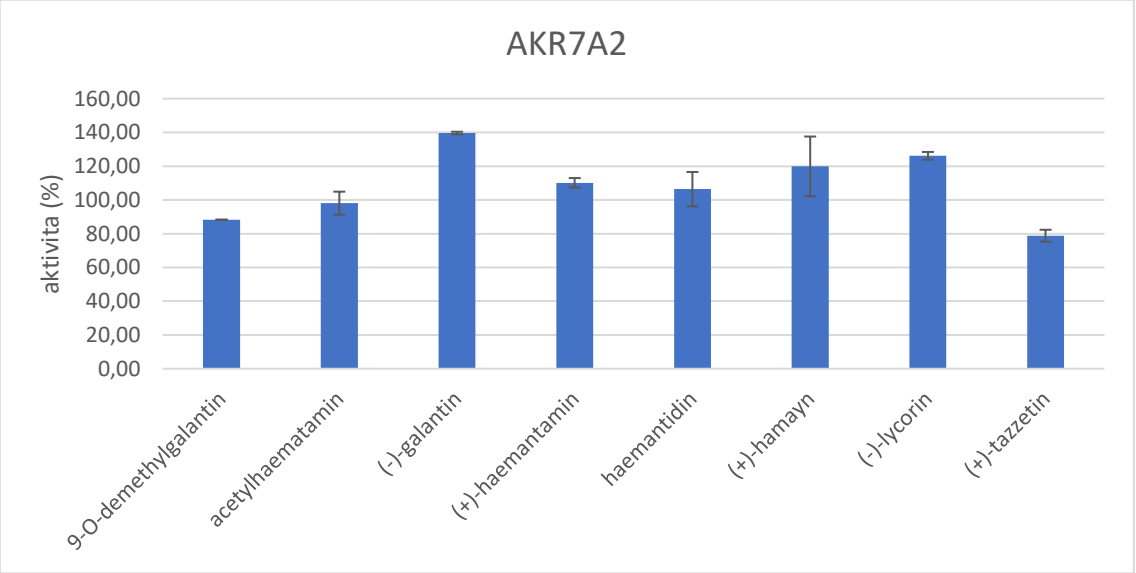
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
(+)-boldin	94,27 ± 1,74	5,73 ± 1,74
(+)-norisokorydin	116,16 ± 9,39	neinhibuje
(−)-pallidin	114,43 ± 17,48	neinhibuje



Obr. 29 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Sophora flavescens.*

Tab. 15 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Sophora flavescens.*

Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
matrine	110,71 ± 4,36	neinhibuje
oxymatrin	90,94 ± 4,60	9,06 ± 4,60

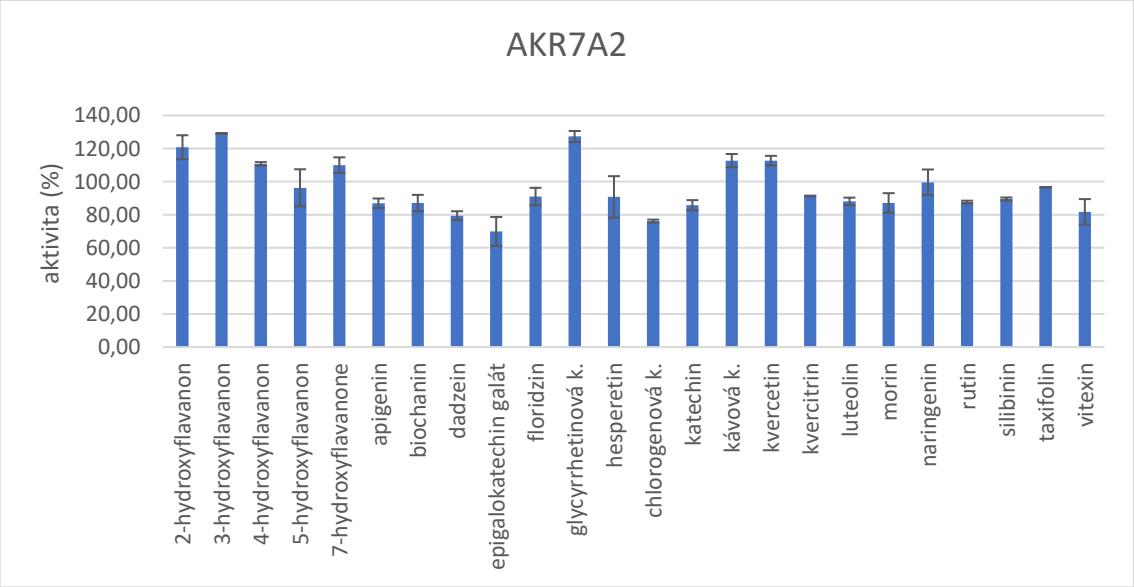


Obr. 30 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Zephyranthes*

robusta. Do tejto skupiny látok bola zaradená aj zlúčenina acetylhaematamin, ktorý je polosyntetický derivát odvodený od haemantaminu.

Tab. 16 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), *Zephyranthes robusta.* Do tejto skupiny látok bola zaradená aj zlúčenina acetylhaematamin, ktorý je polosyntetický derivát odvodený od haemantaminu.

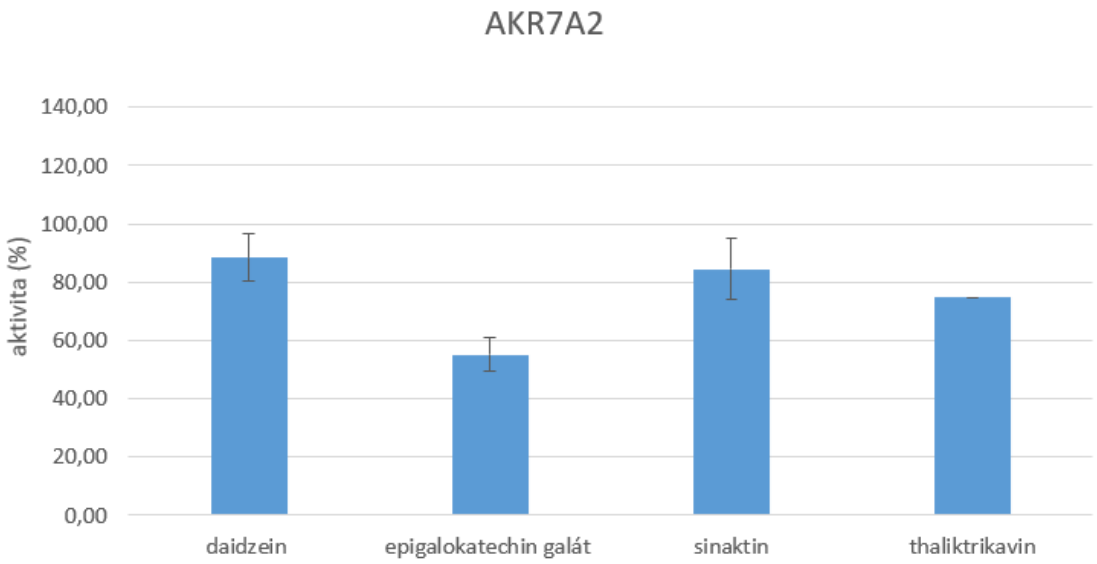
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
9-*O*-demethylgalantin	88,26 ± 0,08	11,74 ± 0,08
acetylhaemantamin	98,09 ± 6,83	1,91 ± 6,83
(−)-galantin	139,65 ± 0,77	neinhibuje
(+)-haemantamin	110,17 ± 2,79	neinhibuje
haemantidin	106,40 ± 10,19	neinhibuje
(+)-hamayn	119,89 ± 17,68	neinhibuje
(−)-lykorin	126,15 ± 2,29	neinhibuje
(+)-tazzetin	78,80 ± 3,53	21,20 ± 3,53



Obr. 31 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 µM), zakúpené Sigma-Aldrich

Tab. 17 Výsledky inhibície AKR7A2 potenciálnymi inhibítormi (20 μM), zakúpené Sigma-Aldrich

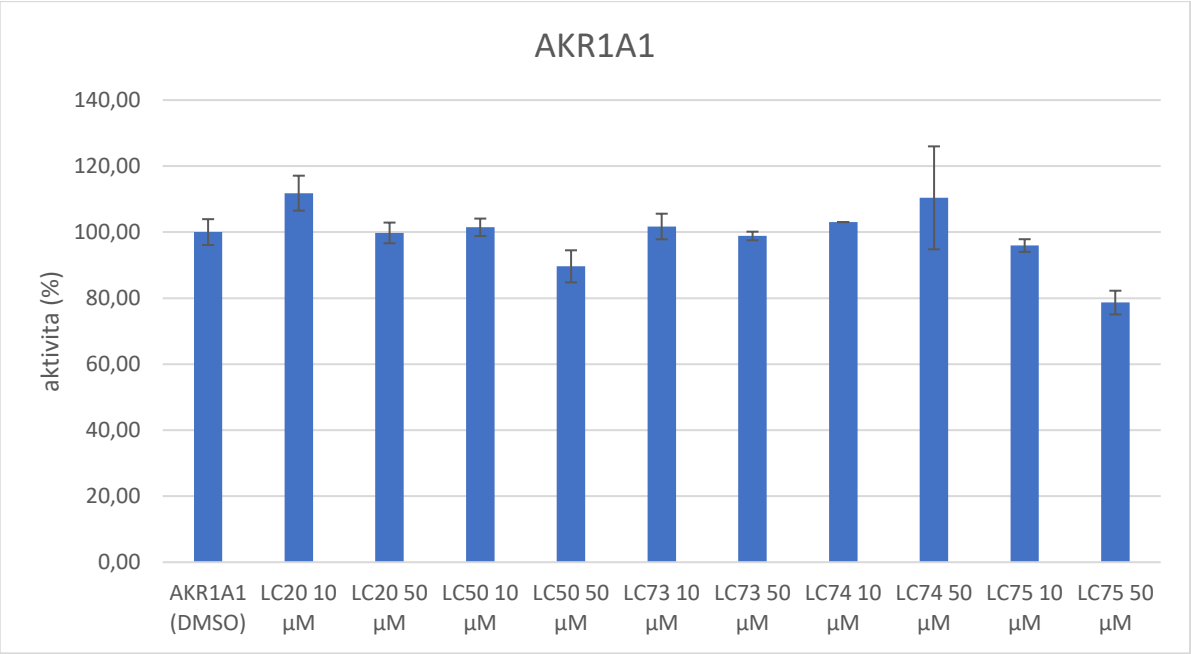
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
2-hydroxyflavanon	120,83 ± 7,22	neinhibuje
3-hydroxyflavanon	129,13 ± 0,07	neinhibuje
4-hydroxyflavanon	110,79 ± 1,01	neinhibuje
5-hydroxyflavanon	96,29 ± 11,18	3,71 ± 11,18
7-hydroxyflavanone	109,97 ± 4,74	neinhibuje
apigenin	86,92 ± 2,91	13,08 ± 2,91
biochanin	87,03 ± 4,99	12,97 ± 4,99
daidzein	79,44 ± 2,68	20,56 ± 2,68
epigalokatechin galát	69,89 ± 8,76	30,11 ± 8,76
floridzin	90,98 ± 5,30	9,02 ± 5,30
glycyrrhetinová kyselina	127,28 ± 3,36	neinhibuje
hesperetin	90,78 ± 12,54	9,22 ± 12,54
chlorogenová kyselina	76,18 ± 0,89	23,82 ± 0,89
katechin	85,79 ± 10,95	14,21 ± 10,95
kávová k.	112,73 ± 3,99	neinhibuje
kvercetin	126,68 ± 2,87	neinhibuje
kvercitrin	91,36 ± 0,19	8,64 ± 0,19
luteolin	88,08 ± 2,28	11,92 ± 2,28
morin	87,16 ± 5,88	12,84 ± 5,88
naringenin	99,57 ± 7,77	0,43 ± 7,77
rutin	87,71 ± 0,79	12,29 ± 0,79
silibinin	89,56 ± 0,89	10,44 ± 0,89
taxifolin	96,62 ± 0,01	3,38 ± 0,01
vitexin	81,76 ± 7,71	18,24 ± 7,71



Obr. 32 Výsledky inhibície AKR7A2 najvýraznejšími potenciálnymi inhibítormi (50 μM)

Tab. 18 Výsledky inhibície AKR7A2 najvýraznejšími potenciálnymi inhibítormi (50 μM)

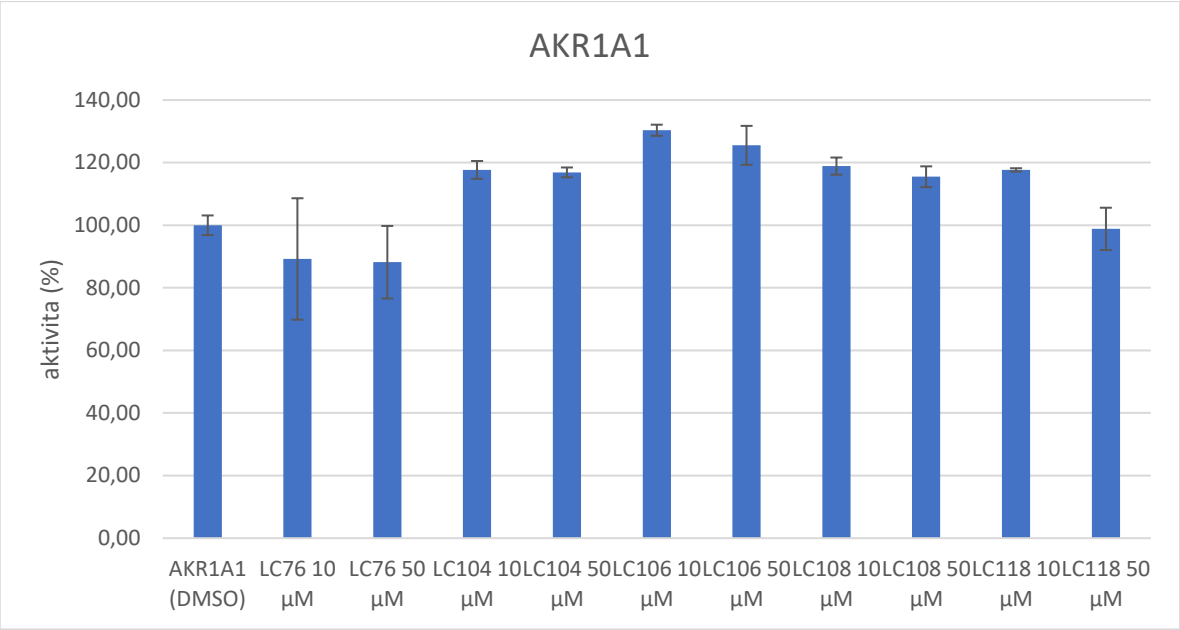
Zlúčenina	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
daidzein	88,34 ± 0,81	11,66 ± 0,81
epigalokatechin galát	55,09 ± 14,16	44,91±14,16
sinaktin	84,54 ± 5,27	15,46 ± 5,27
thaliktrikavin	74,74 ± 1,07	25,26 ± 1,07



Obr. 33 Výsledky inhibície AKR1A1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 19 Výsledky inhibície AKR1A1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

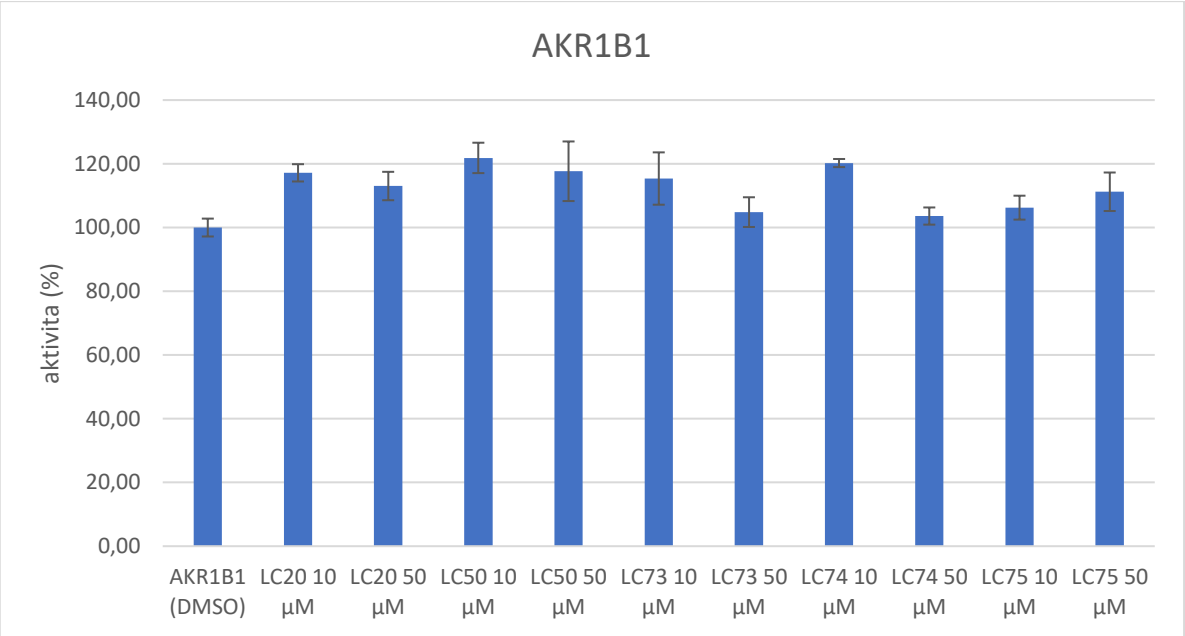
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1A1	748,11 ± 12,73		
AKR1A1 (DMSO)	722,58 ± 28,36	100,00 ± 3,92	
LC20 10 µM	807,80 ± 42,79	111,79 ± 5,30	neinhibuje
LC20 50 µM	720,83 ± 22,58	99,76 ± 3,13	0,24 ± 3,13
LC50 10 µM	733,12 ± 19,37	101,46 ± 2,64	neinhibuje
LC50 50 µM	647,64 ± 31,49	89,63 ± 4,86	10,37 ± 4,86
LC73 10 µM	734,86 ± 28,51	101,70 ± 3,88	neinhibuje
LC73 50 µM	714,18 ± 9,27	98,84 ± 1,30	1,16 ± 1,30
LC74 10 µM	744,50 ± 0,27	103,03 ± 0,04	neinhibuje
LC74 50 µM	797,61 ± 124,39	110,38 ± 15,60	neinhibuje
LC75 10 µM	693,17 ± 13,33	95,93 ± 1,92	4,07 ± 1,92
LC75 50 µM	568,32 ± 20,42	78,65 ± 3,59	21,35 ± 3,59



Obr. 34 Výsledky inhibície AKR1A1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 20 Výsledky inhibície AKR1A1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

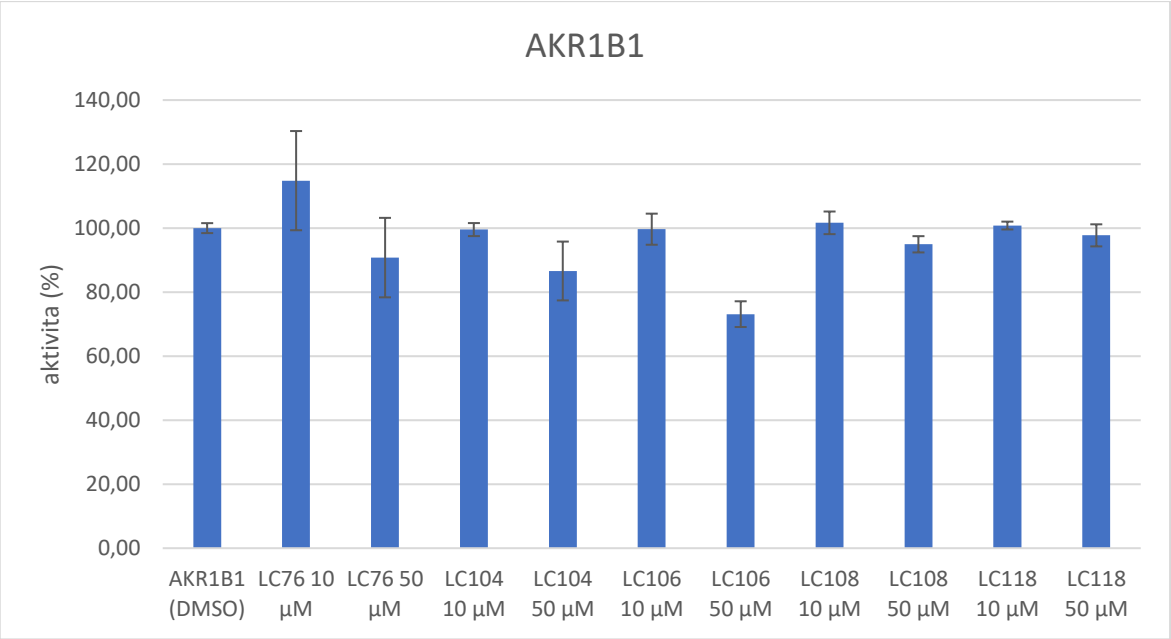
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1A1	315,24 ± 17,24		
AKR1A1 (DMSO)	256,20 ± 8,04	100,00 ± 3,14	
LC76 10 µM	228,58 ± 44,36	89,22 ± 19,41	10,78 ± 19,41
LC76 50 µM	225,95 ± 26,19	88,19 ± 11,59	11,81 ± 11,59
LC104 10 µM	301,52 ± 8,58	117,69 ± 2,85	neinhibuje
LC104 50 µM	299,49 ± 4,71	116,89 ± 1,57	neinhibuje
LC106 10 µM	333,99 ± 5,95	130,36 ± 1,78	neinhibuje
LC106 50 µM	321,62 ± 20,03	125,53 ± 6,23	neinhibuje
LC108 10 µM	304,63 ± 8,37	118,90 ± 2,75	neinhibuje
LC108 50 µM	295,92 ± 9,85	115,50 ± 3,33	neinhibuje
LC118 10 µM	301,54 ± 1,58	117,69 ± 0,52	neinhibuje
LC118 50 µM	253,24 ± 17,11	98,84 ± 6,76	1,16 ± 6,76



Obr. 35 Výsledky inhibície AKR1B1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 21 Výsledky inhibície AKR1B1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

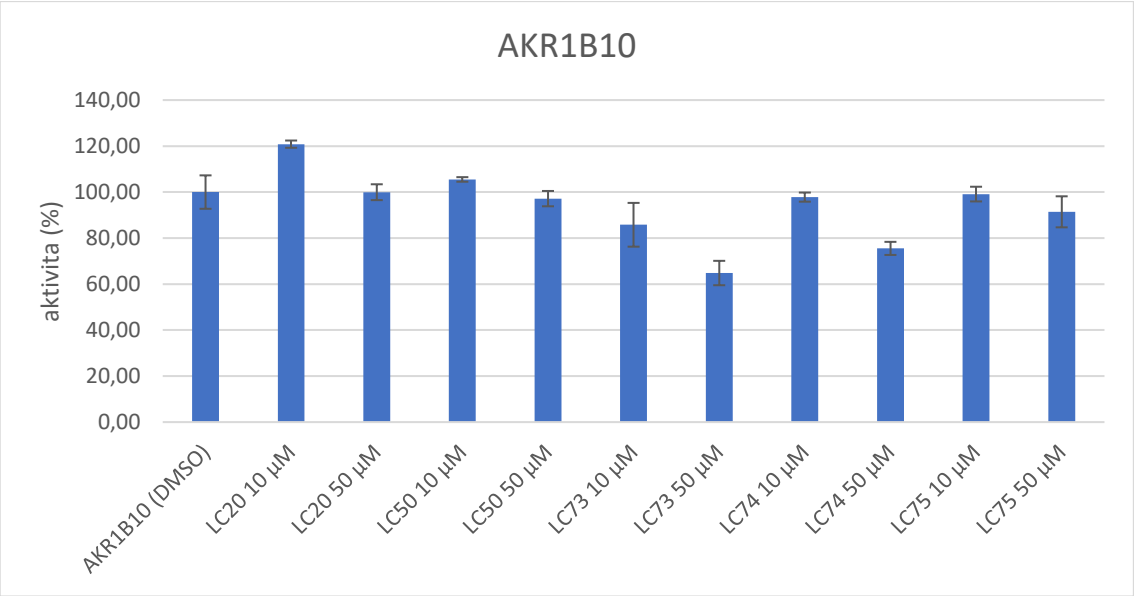
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1B1	22,15 ± 2,31		
AKR1B1 (DMSO)	16,24 ± 0,46	100,00 ± 2,80	
LC20 10 µM	19,03 ± 0,52	117,17 ± 2,71	neinhibuje
LC20 50 µM	18,36 ± 0,82	113,03 ± 4,46	neinhibuje
LC50 10 µM	19,79 ± 0,94	121,85 ± 4,77	neinhibuje
LC50 50 µM	19,11 ± 1,79	117,66 ± 9,35	neinhibuje
LC73 10 µM	18,74 ± 1,54	115,38 ± 8,21	neinhibuje
LC73 50 µM	17,03 ± 0,79	104,84 ± 4,67	neinhibuje
LC74 10 µM	19,53 ± 0,25	120,24 ± 1,27	neinhibuje
LC74 50 µM	16,83 ± 0,45	103,61 ± 2,69	neinhibuje
LC75 10 µM	17,26 ± 0,65	106,24 ± 3,76	neinhibuje
LC75 50 µM	18,07 ± 1,09	111,23 ± 6,04	neinhibuje



Obr. 36 Výsledky inhibície AKR1B1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 22 Výsledky inhibície AKR1B1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

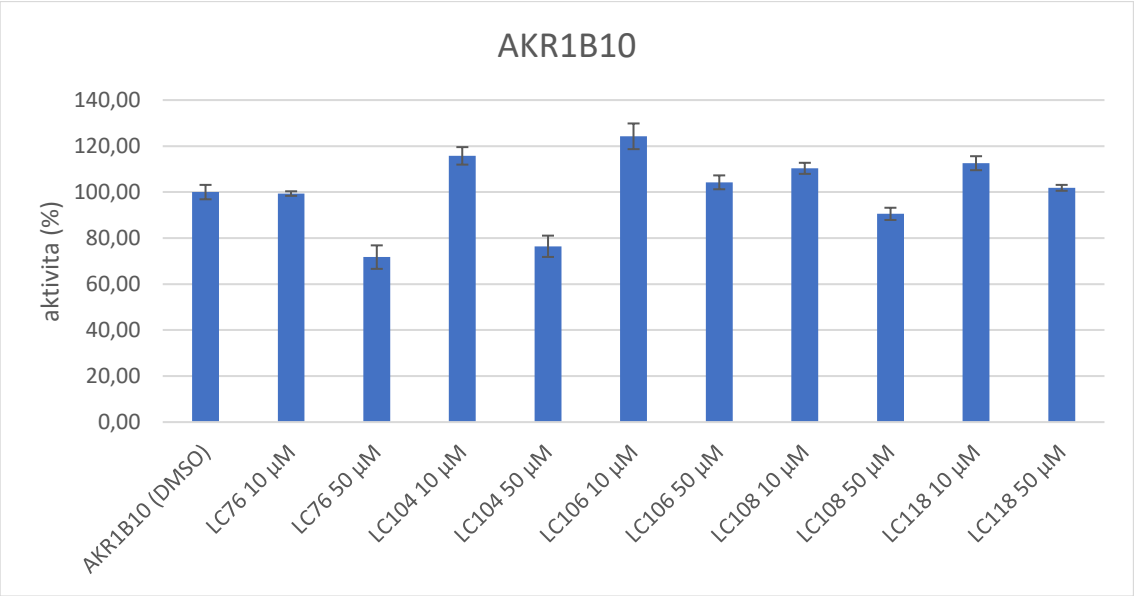
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1B1	5,08 ± 0,31		
AKR1B1 (DMSO)	4,12 ± 0,06	100,00 ± 1,56	
LC76 10 µM	4,73 ± 0,73	114,83 ± 15,49	neinhibuje
LC76 50 µM	3,74 ± 0,46	90,79 ± 12,41	9,21 ± 12,41
LC104 10 µM	4,10 ± 0,08	99,54 ± 2,04	0,46 ± 2,04
LC104 50 µM	3,57 ± 0,33	86,60 ± 9,19	13,40 ± 9,19
LC106 10 µM	4,11 ± 0,20	99,66 ± 4,86	0,34 ± 4,86
LC106 50 µM	3,01 ± 0,12	73,12 ± 4,02	26,88 ± 4,02
LC108 10 µM	4,19 ± 0,15	101,65 ± 3,53	neinhibuje
LC108 50 µM	3,91 ± 0,10	94,95 ± 2,54	5,05 ± 2,54
LC118 10 µM	4,15 ± 0,05	100,80 ± 1,23	neinhibuje
LC118 50 µM	4,03 ± 0,14	97,74 ± 3,45	2,26 ± 3,45



Obr. 37 Výsledky inhibície AKR1B10 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 23 Výsledky inhibície AKR1B10 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

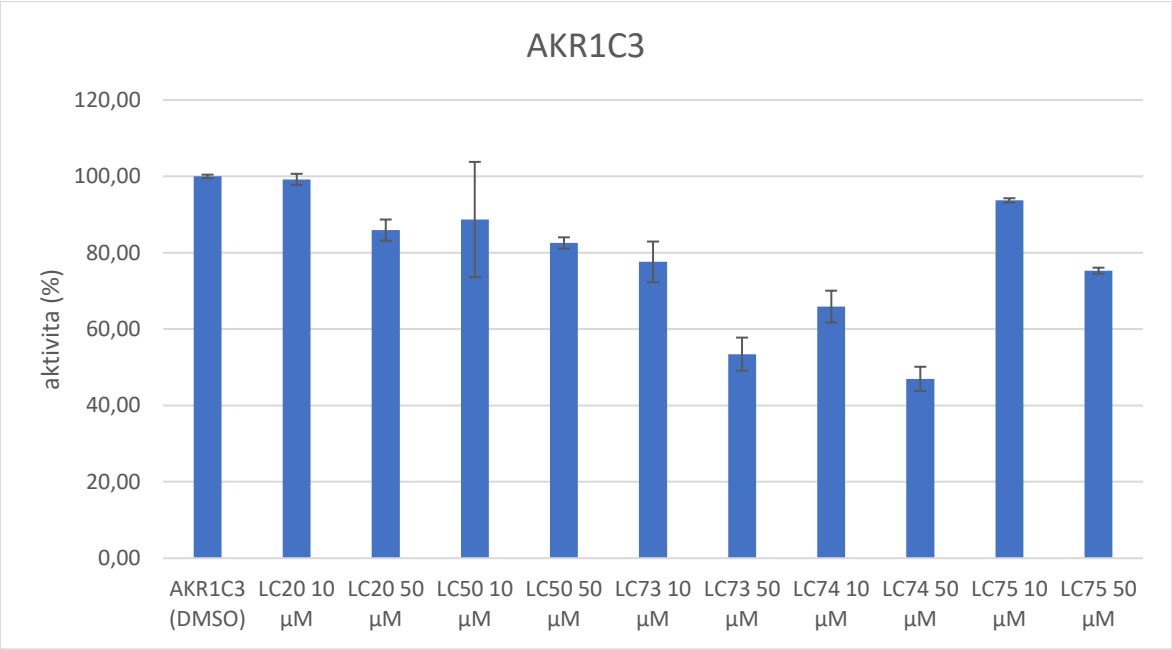
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1B10	178,05 ± 7,42		
AKR1B10 (DMSO)	144,93 ± 10,53	100,00 ± 7,27	
LC20 10 µM	175,12 ± 2,76	120,84 ± 1,58	neinhibuje
LC20 50 µM	144,86 ± 4,99	99,95 ± 3,44	0,05 ± 3,44
LC50 10 µM	152,90 ± 1,52	105,51 ± 0,99	neinhibuje
LC50 50 µM	140,80 ± 4,68	97,15 ± 3,32	2,85 ± 3,32
LC73 10 µM	124,33 ± 11,83	85,79 ± 9,52	14,21 ± 9,52
LC73 50 µM	93,92 ± 4,98	64,81 ± 5,30	35,19 ± 5,30
LC74 10 µM	141,76 ± 2,80	97,82 ± 1,98	2,18 ± 1,98
LC74 50 µM	109,45 ± 3,12	75,52 ± 2,85	24,48 ± 2,85
LC75 10 µM	143,67 ± 4,59	99,13 ± 3,19	0,87 ± 3,19
LC75 50 µM	132,49 ± 8,93	91,42 ± 6,74	8,58 ± 6,74



Obr. 38 Výsledky inhibície AKR1B10 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 24 Výsledky inhibície AKR1B10 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

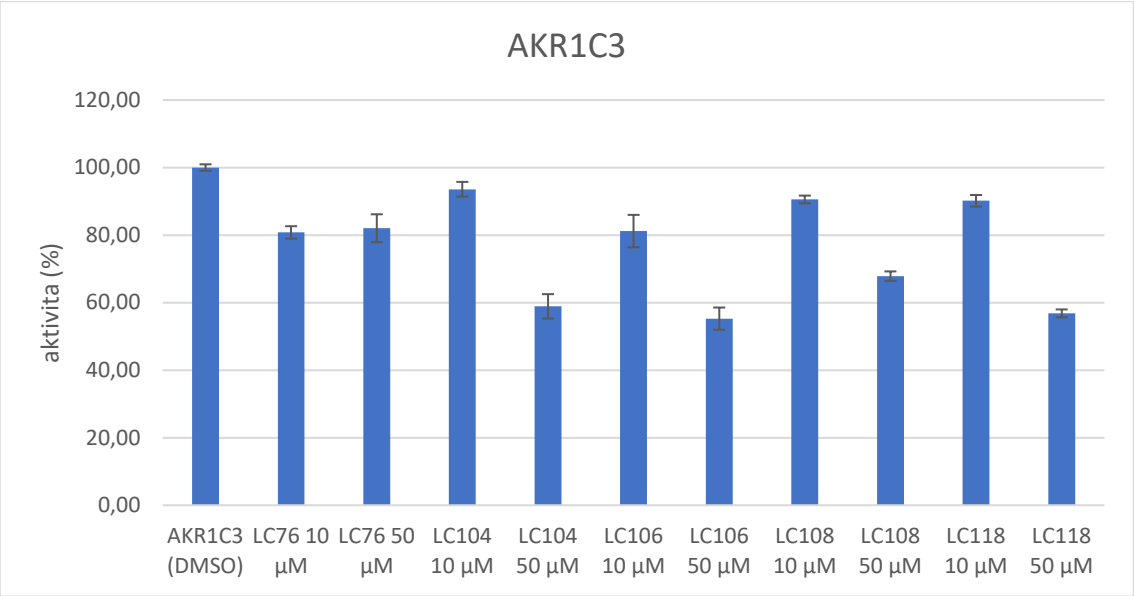
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1B10	178,05 ± 7,42		
AKR1B10 (DMSO)	144,93 ± 10,53	100,00 ± 7,27	
LC76 10 µM	73,81 ± 0,73	99,35 ± 0,99	0,65 ± 0,99
LC76 50 µM	53,28 ± 2,72	71,72 ± 5,11	28,28 ± 5,11
LC104 10 µM	85,99 ± 3,27	115,75 ± 3,80	neinhibuje
LC104 50 µM	56,79 ± 2,63	76,44 ± 4,63	23,56 ± 4,63
LC106 10 µM	92,31 ± 5,16	124,26 ± 5,59	neinhibuje
LC106 50 µM	77,44 ± 2,33	104,24 ± 3,01	neinhibuje
LC108 10 µM	81,96 ± 1,97	110,32 ± 2,41	neinhibuje
LC108 50 µM	67,26 ± 1,79	90,54 ± 2,66	9,46 ± 2,66
LC118 10 µM	83,62 ± 2,54	112,55 ± 3,04	neinhibuje
LC118 50 µM	75,66 ± 0,97	101,85 ± 1,28	neinhibuje



Obr. 39 Výsledky inhibície AKR1C3 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 25 Výsledky inhibície AKR1C3 látkami LC20, LC50, LC73, LC74 LC75

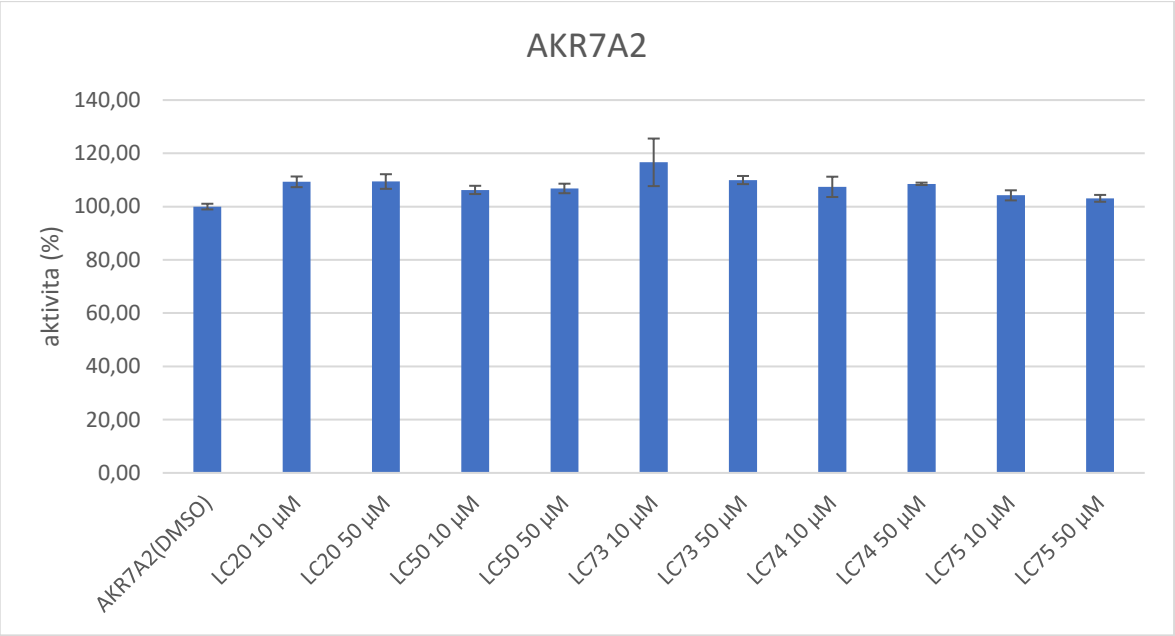
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1C3	546,36 ± 3,65		
AKR1C3 (DMSO)	557,95 ± 2,62	100,00 ± 0,47	
LC20 10 µM	553,64 ± 8,10	99,23 ± 1,46	0,77 ± 1,46
LC20 50 µM	479,46 ± 13,35	85,93 ± 2,78	14,07 ± 2,78
LC50 10 µM	494,97 ± 74,72	88,71 ± 15,10	11,29 ± 15,10
LC50 50 µM	460,74 ± 6,82	82,58 ± 13,29	17,42 ± 13,29
LC73 10 µM	433,04 ± 23,08	77,61 ± 5,33	22,39 ± 5,33
LC73 50 µM	298,22 ± 12,93	53,45 ± 4,34	46,55 ± 4,34
LC74 10 µM	367,75 ± 15,33	65,91 ± 4,17	34,09 ± 4,17
LC74 50 µM	262,07 ± 8,31	46,97 ± 3,17	53,03 ± 3,17
LC75 10 µM	522,90 ± 2,97	93,72 ± 0,57	6,28 ± 0,57
LC75 50 µM	420,22 ± 3,30	75,32 ± 0,79	24,68 ± 0,79



Obr. 40 Výsledky inhibície AKR1C3 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 26 Výsledky inhibície AKR1C3 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

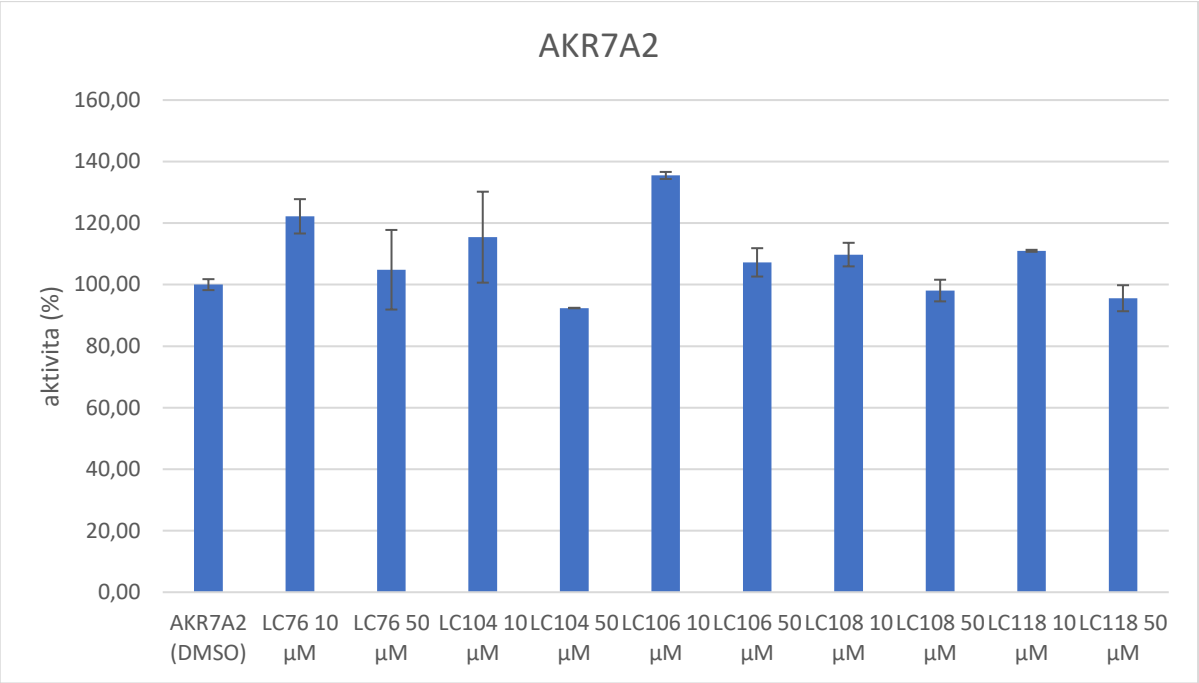
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR1C3	519,00 ± 10,42		
AKR1C3 (DMSO)	405,54 ± 3,93	100,00 ± 0,97	
LC76 10 µM	327,67 ± 6,05	80,80 ± 1,85	19,20 ± 1,85
LC76 50 µM	332,69 ± 13,76	82,04 ± 4,14	17,96 ± 4,14
LC104 10 µM	379,50 ± 8,33	93,58 ± 2,20	6,42 ± 2,20
LC104 50 µM	238,89 ± 8,64	58,91 ± 3,62	41,09 ± 3,62
LC106 10 µM	329,30 ± 15,81	81,20 ± 4,80	18,80 ± 4,80
LC106 50 µM	224,09 ± 7,41	55,26 ± 3,30	44,74 ± 3,30
LC108 10 µM	367,29 ± 4,21	90,57 ± 1,15	9,43 ± 1,15
LC108 50 µM	275,20 ± 3,86	67,86 ± 1,40	32,14 ± 1,40
LC118 10 µM	365,71 ± 6,26	90,18 ± 1,71	9,82 ± 1,71
LC118 50 µM	230,46 ± 2,70	56,83 ± 1,17	43,17 ± 1,17



Obr. 41 Výsledky inhibície AKR7A2 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 27 Výsledky inhibície AKR7A2 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

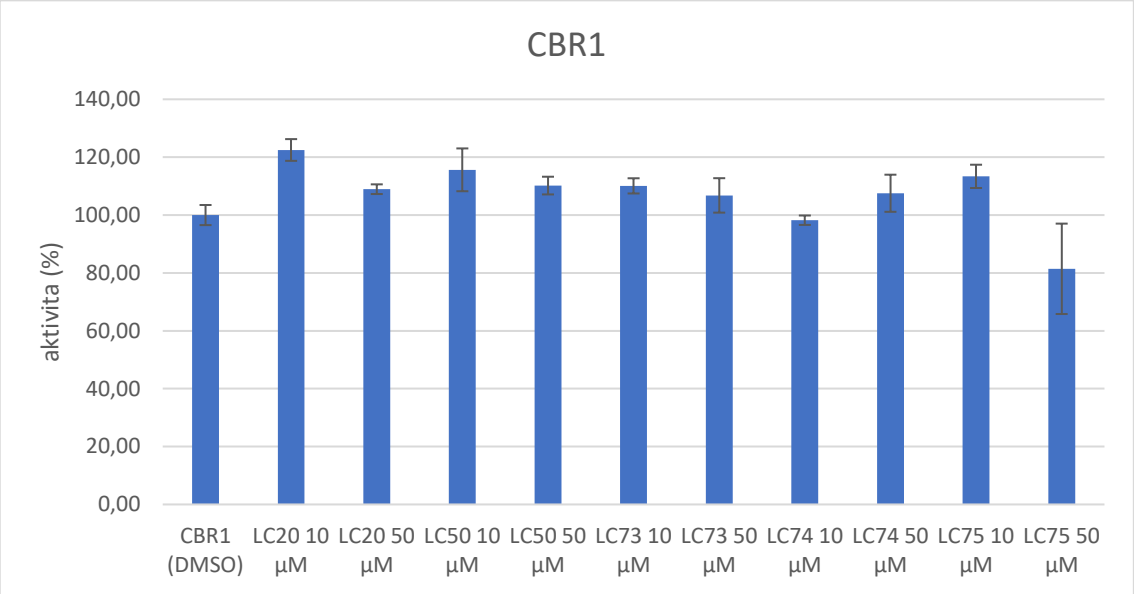
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR7A2	392,78 ± 9,45		
AKR7A2 (DMSO)	358,37 ± 3,82	100,00 ± 1,07	
LC20 10 µM	391,72 ± 7,85	109,30 ± 2,01	neinhibuje
LC20 50 µM	392,11 ± 10,78	109,41 ± 2,75	neinhibuje
LC50 10 µM	380,82 ± 5,91	106,26 ± 1,55	neinhibuje
LC50 50 µM	382,80 ± 6,85	106,81 ± 1,79	neinhibuje
LC73 10 µM	417,94 ± 37,33	116,62 ± 8,93	neinhibuje
LC73 50 µM	394,11 ± 6,02	109,97 ± 1,53	neinhibuje
LC74 10 µM	384,96 ± 14,67	107,42 ± 3,81	neinhibuje
LC74 50 µM	389,02 ± 1,76	108,55 ± 0,45	neinhibuje
LC75 10 µM	373,53 ± 7,08	104,23 ± 1,89	neinhibuje
LC75 50 µM	369,48 ± 4,76	103,10 ± 1,29	neinhibuje



Obr. 42 Výsledky inhibície AKR7A2 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 28 Výsledky inhibície AKR7A2 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

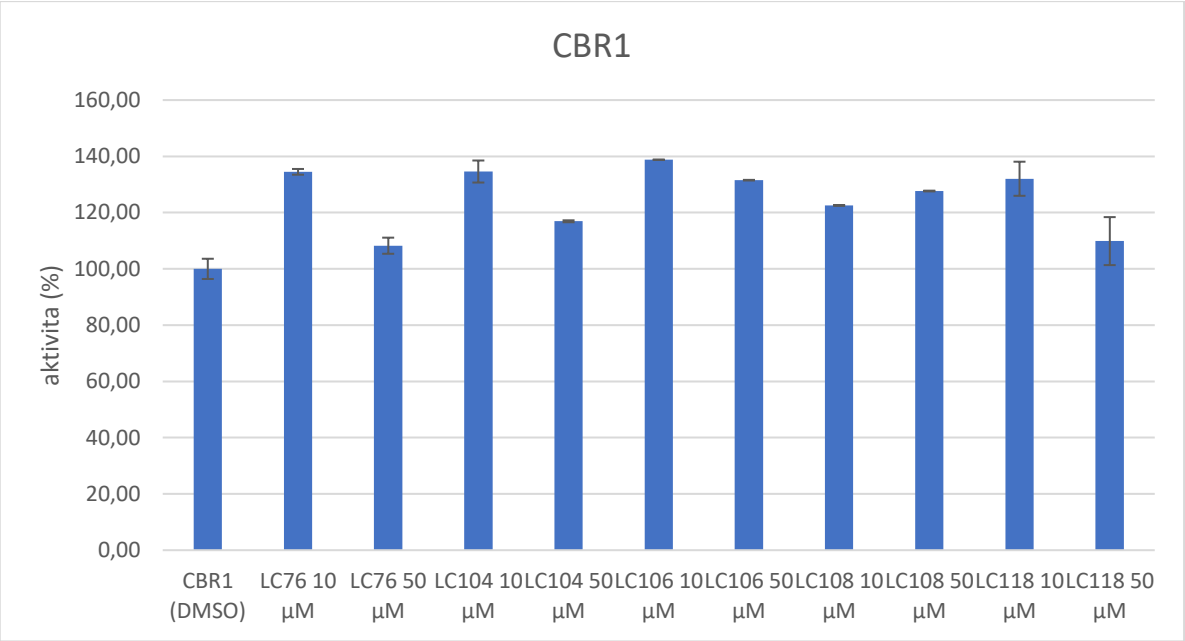
Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
AKR7A2	392,78 ± 9,45		
AKR7A2 (DMSO)	358,37 ± 3,82	100,00 ± 1,07	
LC76 10 µM	44,92 ± 2,51	122,21 ± 5,30	neinhibuje
LC76 50 µM	38,54 ± 4,99	104,84 ± 12,94	neinhibuje
LC104 10 µM	42,43 ± 6,27	115,43 ± 14,79	neinhibuje
LC104 50 µM	33,96 ± 0,03	92,39 ± 0,08	7,61 ± 0,08
LC106 10 µM	49,81 ± 0,57	135,50 ± 1,14	neinhibuje
LC106 50 µM	39,42 ± 1,82	107,23 ± 4,61	neinhibuje
LC108 10 µM	40,35 ± 1,55	109,76 ± 3,84	neinhibuje
LC108 50 µM	36,05 ± 1,27	98,08 ± 3,52	1,92 ± 3,52
LC118 10 µM	40,80 ± 0,13	110,99 ± 0,32	neinhibuje
LC118 50 µM	35,13 ± 1,49	95,58 ± 4,23	4,42 ± 4,23



Obr. 43 Výsledky inhibície CBR1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Tab. 29 Výsledky inhibície CBR1 látkami LC20, LC50, LC73, LC74, LC75

Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
CBR1	2025,80 ± 155,97		
CBR1 (DMSO)	2094,40 ± 72,85	100,00 ± 3,48	
LC20 10 µM	2565,42 ± 96,41	122,49 ± 3,76	neinhibuje
LC20 50 µM	2281,60 ± 38,27	108,94 ± 1,68	neinhibuje
LC50 10 µM	2421,83 ± 179,17	115,63 ± 7,40	neinhibuje
LC50 50 µM	2307,78 ± 70,55	110,19 ± 3,06	neinhibuje
LC73 10 µM	2305,61 ± 60,52	110,08 ± 2,63	neinhibuje
LC73 50 µM	2236,66 ± 133,07	106,79 ± 5,95	neinhibuje
LC74 10 µM	2057,16 ± 33,50	98,22 ± 1,63	1,78 ± 1,63
LC74 50 µM	2252,25 ± 144,42	107,54 ± 6,41	neinhibuje
LC75 10 µM	2374,50 ± 95,50	113,37 ± 4,02	neinhibuje
LC75 50 µM	1705,37 ± 266,35	81,43 ± 15,62	18,57 ± 15,62



Obr. 44 Výsledky inhibície CBR1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Tab. 30 Výsledky inhibície CBR1 látkami LC76, LC104, LC106, LC108, LC118

Zlúčenina, koncentrácia	**Špecifická aktivita (nmol/mg/min)**	**Aktivita (%)**	**Inhibícia (%)**
CBR1	407,18 ± 1,04		
CBR1 (DMSO)	508,34 ± 18,27	100,00 ± 3,59	
LC76 10 µM	683,69 ± 6,96	134,49 ± 1,02	neinhibuje
LC76 50 µM	550,20 ± 15,77	108,23 ± 2,87	neinhibuje
LC104 10 µM	684,25 ± 26,80	134,60 ± 3,92	neinhibuje
LC104 50 µM	594,37 ± 2,04	116,92 ± 0,34	neinhibuje
LC106 10 µM	705,52 ± 0,17	138,79 ± 0,02	neinhibuje
LC106 50 µM	668,60 ± 0,73	131,52 ± 0,11	neinhibuje
LC108 10 µM	622,96 ± 0,80	122,55 ± 0,13	neinhibuje
LC108 50 µM	649,04 ± 0,86	127,68 ± 0,13	neinhibuje
LC118 10 µM	671,19 ± 40,68	132,03 ± 6,06	neinhibuje
LC118 50 µM	558,52 ± 47,63	109,87 ± 8,53	neinhibuje

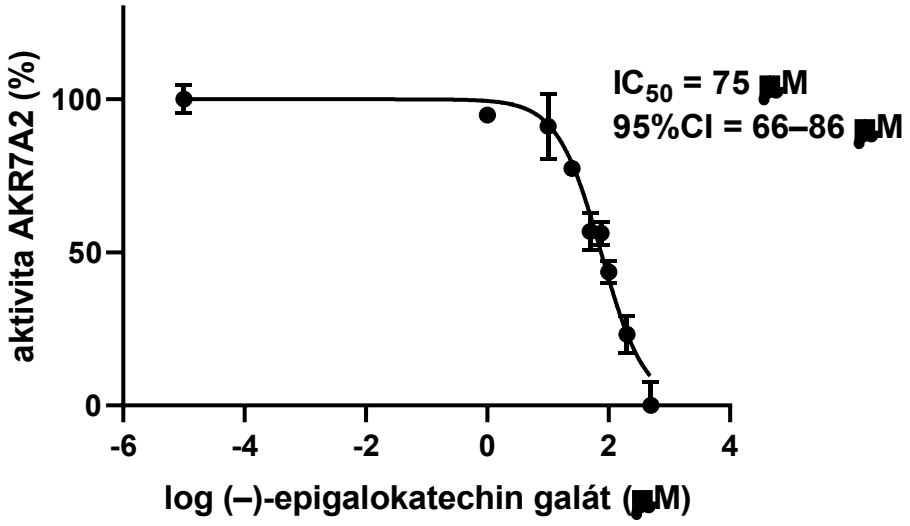
5.4. Stanovenie IC_{50}

Žiadna zo skúmaných látok nevykazovala výrazné inhibičné vlastnosti. Ako jeden z najsilnejších inhibítorov bola stanovená látka (−)-epigalokatechin galát. Na stanovenie

IC_{50} bola zmeraná aktivita enzýmu AKR7A2 v závislosti na koncentrácii inhibítoru podľa postupu 4.2.4. Výsledky stanovenia IC_{50} sú zaznamenané v grafe Obr. 45 a tabuľke 31.

Tab. **31** IC_{50} stanovovaného inhibítoru epigalokatechin galátu

Inhibítor	**IC_{50}**	**95% interval spoľahlivosti**
(−)-epigalokatechin galát	75 μM	66–86 μM



Obr. 45 Stanovenie IC_{50} (−)-epigalokatechin galátu voči enzýmu AKR7A2

6. DISKUSIA

Inhibícia karbonylredukujúcich enzýmov sa javí ako sľubný prístup v terapii nádorov, či ako spôsob prekonania rezistencie nádorov, v ktorých dochádza k zvýšenej expresii detoxifikačných enzýmov (okrem iného práve CRE), čím sa znižuje terapeutická účinnosť liečiv (Ax a kol. 2000, Zemanová a kol. 2015). To znamená, že inhibícia redukcie karbonylovej skupiny môže zvýšiť terapeutickú účinnosť látky použitej ako liečivo, ale zároveň dokáže znížiť množstvo alebo závažnosť nežiaducich účinkov (Malátková a Wsól 2014).

Medzi základné terapeutiká v terapii nádorových ochorení sú využívané antracyklínové chemoterapeutiká. Napriek ich preukázaným protinádorovým účinkom je ich klinické využívanie obmedzené z dôvodu kardiotoxicity, ktorá je spôsobená ich C13 redukovanými metabolitmi, pričom táto metabolická cesta je katalyzovaná práve karbonylredukujúcimi enzýmami (Menna a kol. 2012). Medzi najvýznamnejšie antracyklínredukujúce enzýmy radíme AKR1C3, AKR1A1 či CBR1 (Hofman a kol. 2015). Tiež Bains a kol. (2010a) preukázali význam AKR1C3, AKR1C4 a AKR7A2 v redukcii antracyklínov tým, že preukázali súvislosť medzi gentickým polymofizmom týchto enzýmov a znížením *in vitro* metabolizmu doxorubicínu i daunorubicínu. V tejto diplomovej práci sme zistili, že za stanovených podmienok má najvýraznejšiu antracyklínreduktázovú aktivitu CBR1, AKR1A1 a AKR1C3. Redukujúcu aktivitu voči daunorubicínu, i keď nie tak výraznú, vykazovali enzýmy AKR7A2, AKR1B10 a AKR1B1. Bola hodnotená aj aktivita enzýmov AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 a CBR3, ale za použitých uvedených podmienok nebola zistená žiadna významnejšia aktivita.

Tieto enzýmy taktiež zasahujú do patogenézy nádorových ochorení. Ako príklad možno uviesť enzýmy AKR1C, ktoré sa účastnia metabolizmu prostaglandínov a podporujú bunečnú proliferáciu. Predpokladá sa účasť AKR1C3 v patogenéze nádoru prostaty a pŕs, keďže metabolizuje steroidné štruktúry (Pfeiffer 2011, Yoda a kol. 2015). Preukázaná je aj korelácia medzi expresiou AKR1C3 a adenokarcinómom (Miller a kol. 2012) a kolorektálnym karcinómom (Nakarai a kol. 2015). AKR1C3 je tiež spájaný s rozvojom rezistencie voči antharacyklínovým chemoterapeutikám (Hofman a kol. 2014).

AKR1B1 sa v bunke účastní procesov, ktoré súvisia s karcinogenézou, ako napr. EMT (epithelial-mesenchymal transition), zápal a angiogenéza (Wu a kol. 2017,

Zablocki a kol. 2011). Nadmerná expresia AKR1B1 tiež súvisí so skrátenou dobou prežitia pacientov s AML a rôznymi typmi myelómov (Laffin a Petrash 2012).

Enzým AKR1B10 podporuje bunečný rast a prežitie zásahom do syntézy mastných kyselín a lipidov (Ma a kol. 2008). Nadexprimovaný je pri nádoroch pŕs, hepatocelulárnom karcinóme, nemalobunečnom karcinóme pľúc, nádore krčka maternice, endometria a pankreasu (Scuric a kol. 1998, Ma a kol. 2012, Sato a kol. 2016, Yao a kol. 2014, Yoshitake a kol. 2007). Li a kol. (2017) potvrdili nadexpresiu AKR1B10 v nádore pŕs, čo podnecuje migráciu a inváziu MCF-7 a BT-20 bunkami prostredníctvom ERK signalizačnej kaskády.

Najvýraznejšie antracyklínredukujúce vlastnosti v tejto diplomovej práci vykazoval enzým CBR1. Mnohé štúdie ukazujú, že pri tumorigenéze v rôznych tkanivách dochádza k zmenám v expresii tohto enzýmu. Štúdie ukazujú, že aktivita v nádorových tkanivách môže byť zvýšená 2- až 40-násobne (López de Cerain a kol. 1999). Zvýšená aktivita bola zaznamená v nádorových tkanivách pľúc, hrubého čreva či pŕs, naopak znížená aktivita u nádorov pečene a prostaty (Ismail a kol. 2000, Lal a kol. 2008, López de Cerain 1999, Suto a kol. 1999). CBR1 je diagnostickým a prognostickým biomarkerom rozvoja rezistencie voči doxorubicínu u nádorov gastrointestinálneho traktu. Tiež je preukázané, že práve táto upregulácia CBR1 je jedným z hlavných príčin rezistencie voči antracyklínom (Matsunaga a kol. 2015).

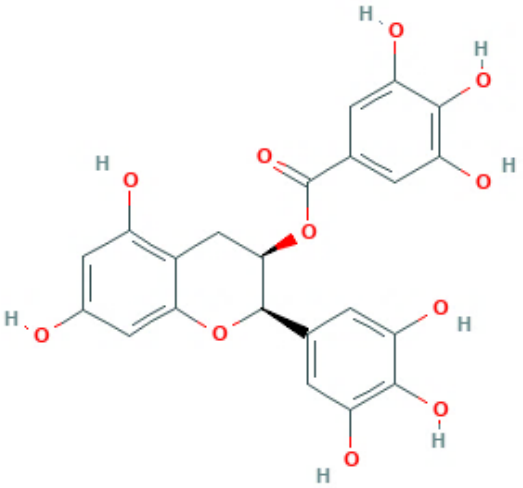
Vzhľadom k tomu, že uvedené enzýmy sa podieľajú na procesoch súvisiacich s nádorovými ochoreniami i metabolizme protinádorových liečiv, objavuje sa v dnešnej dobe mnoho prác, ktoré sa zaoberajú hľadaním potenciálnych inhibítorov týchto enzýmov.

V tejto diplomovej práci boli skúmané ako inhibítory látky prírodného pôvodu zo skupiny flavonoidov a alkaloidov. Flavonoidy boli vybrané ako vhodné látky pretože bolo preukázané, že flavonoidné zlúčeniny ovplyvňujú procesy a enzýmy súvisiace s proliferáciou, diferenciáciou, apoptózou, zápalom, angiogenézou a taktiež ovplyvňujú mnoholiekovú rezistenciu. Bolo zistené, že flavonoidy sú schopné modulovať eflux látok z buniek spôsobený P-glykoproteínom, čo môže byť jeden z mechanizmov ovplyvňovania rezistencie na chemoterapeutiká pri terapií nádorov (Ravishankar a kol. 2013).

Táto diplomová práca bola zameraná na skúmanie inhibičnej aktivity voči enzýmu AKR7A2. AKR7A2 patrí medzi enzýmy, ktorých nadmerná expresia je zaznamenaná v súvisloti s akútnou myeloidnou leukémiou (Camós a kol. 2006). Zároveň detskí

pacienti s Downovým syndrómom vykazujú až desaťnásobne vyššie riziko rozvoja leukémie oproti tým bez Downovho syndrómu (Lange 2000). Pacienti s Downovým syndrómom pri liečbe AML predstavujú skupinu s vyšším rizikom rozvoja antracyklínmi spôsobenej kardiotoxicity a bezpečná dávka pre terapiu u tejto skupiny ľudí stále nebola stanovená (Quiñones-Lombraña a kol. 2014). S Downovým syndrómom sa spája až 3,74-násobne vyššie riziko kardiotoxicity po terapii antracyklínmi (Krischer a kol. 1997). AKR7A2 je najhojnejšia antracyklínreduktáza v srdečnom svale a preto sa predpokladá, že je jedným z hlavných faktorov prispievajúcich ku kardiotoxickým vedľajším účinkom terapie antracyklínovými terapeutikami u pacientov s aj bez Downovho syndrómu (Quiñones-Lombraña a kol. 2014). Z toho dôvodu bol skúmaný vplyv methylácie DNA na expresiu AKR7A2 v srdci a bolo zistené, že u pacientov bez DS koreluje methylácia v mieste CpG −865 s expresiou AKR7A2, ale u pacientov s DS koreluje methylácia DNA v mieste CpG −232 s expresiou AKR7A2, čo by mohlo byť jednou z príčin rozdielnej karbonylredukujúcej aktivity u týchto skupín (Hoefer a kol. 2016).

Žiadna z nami testovaných látok nevykazovala voči enzýmu AKR7A2 výraznú inhibičnú aktivitu. U potenciálnych inhibítorov, ktorých inhibičná aktivita v koncentrácii 20 µM prevýšila 20 % bola meraná inhibičná aktivita aj pri koncentrácii 50 µM. Napriek očakávaniu inhibičná aktivita daidzeinu a sinaktinu poklesla. Pravdepodobne môže byť príčinou ich nízka rozpustnosť a tým spôsobené vylučovanie z roztoku. Ako najvhodnejší potenciálny inhibítor sa javí epigalokatechin galát (Obr. 46) (inhibícia 30,11 % pri koncentrácii 20 µM; 44,91 % pri koncentrácii 50 µM), preto bola zmeraná jeho IC_{50}. Žiadny z potenciálnych inhibítorov (testovaných v koncentrácii 20 µM) enzýmu AKR7A2 neprekročil zníženie aktivity o viac ako 50 %.



Obr. 46 Štruktúra epigalokatechin galátu (prevzaté z *Internet 4*)

(−)-Epigalokatechin galát (EGCG) je látka, ktorá patrí medzi flavonoidy, konkrétne do skupiny katechínov, ktoré sú početne zastúpené v listoch čajovníka. Sú mu pripisované účinky antikancerogénne, antioxidačné, antiangiogénne, antivirové i antibiotické (Cao a Cao 1999, Katiyar a Mukhtar 1997, Nakayama a kol. 1993, Waltner-Law a kol. 2002, Yang a Wang 1993). Tak ako u iných flavonoidných zlúčenín, predpokladá sa, že najdôležitejšie pre naviazanie a inhibičný efekt sú 5- a 7-hydroxyskupina (Arai a kol. 2015). Huang a kol. (2010) zistli, že EGCG dokáže inhibovať karbonylreduktázu CBR1, pričom došlo k zvýšeniu účinnosti a zníženiu kardiotoxicity protinádorového liečiva daunorubicínu v terapii kepatocelulárneho karcinómu. Tieto štúdie boli prevádzané na bunečných líniách a hepatálnch bunkách myší.

V priebehu meraní na stanovenie inhibičnej aktivity prírodných látok nám boli poskytnuté z Katedry farmaceutickej botaniky novosyntetizované deriváty alkaloidov, u ktorých nebola doposiaľ stanovená aktivita voči žiadnemu karbonylredukujúcemu enzýmu. Z toho dôvodu som sa v tejto práci zamerala na základný screening týchto látok voči významným antracyklínreduktázam. Keďže tieto zlúčeniny budú súčasťou patentového konania, sú v tejto diplomovej práci označované kódmi a nie je uvedená ich štruktúra. Výraznejšie inhibičné vlastnosti vykazovali látky LC73 (46,55 %), LC74 (53,03 %), LC104 (41,09 %), LC106 (44,74 %) a LC118 (32,14 %), všetky v koncentrácii 50 μM. Táto inhibičná aktivita bola však zaznamenaná iba voči enzýmu AKR1C3, aktivita ostatných skúmaných enzýmov nebola značne ovplyvnená. Meranie IC_{50} a ďalšie experimenty týkajúce sa týchto látok budú prevedené v najbližšej budúcnosti.

7. ZÁVER

Teoretická časť diplomovej práce obsahuje poznatky o antracyklínových chemoterapeutikách, ich kardiotoxicite a rezistencii a tiež bližšie charakterizovaná zlúčenina daunorubicín. Takisto boli charakterizované základné karbonylreduktázy z nadrodín SDR a AKR, ktoré sa podieľajú na redukcii antracyklínov.

Praktická časť práce mala ako hlavný cieľ stanoviť inhibičnú aktivitu vybraných prírodných látok voči aldo-ketoreduktáze AKR7A2, prípadne iným karbonylredukujúcim enzýmom. Aktivita bola meraná pri premene daunorubicínu na jeho menej aktívny metabolit daunorubicinol, ktorý je zároveň podozrivý, že sa viac hromadí v srdci a preto sa viac podieľa na kardiotoxicite.

Z testovaných látok mala inhibičný vplyv na enzým AKR7A2 viac ako 40 % iba zlúčenina epigalokatechin galát v koncentrácii 50 μM. U tejto látky bola následne stanovená polovičná inhibičná koncentrácia (IC_{50}).

V druhej časti tejto práce bol prevedený základný screening nových synteticky pripravených derivátov alkaloidov voči významným antracyklínreduktázam. Tieto látky boli poskytnuté z Katedry farmaceutickej botaniky. Pri testovaní mali inhibičný efekt nad 40 % látky LC73, LC74, LC104 a LC106 (v koncentrácii 50 μM) pri inhibícii enzýmu AKR1C3 (1,5 μg proteínu/100 μl reakcii). Meranie IC_{50} a ďalšie experimenty týkajúce sa týchto látok budú prevedené v najbližšej budúcnosti.

Na záver sa dá skonštatovať, že stanovené ciele tejto práce boli splnené. Bola porovnaná aktivita vybraných antracyklínreduktáz voči substrátu daunorubicínu, stanovená aktivita prideleného enzýmu AKR7A2 voči substrátu, zaznamenaná inhibičná aktivita vybraných prírodných zlúčenín a u najvýraznejšieho inhibítoru stanovená IC_{50}.

Napriek tomu, že v tejto práci sa nepodarilo odhaliť žiadnu zlúčeninu, ktorá by vykazovala výrazný inhibičný efekt voči enzýmu AKR7A2, je podstatné získavať poznatky o prírodných látkach ako inhibítoroch, ktoré sa môžu stať predlohou pre objav nových štruktúr, ktorých aktivita bude dostatočná pre klinické využitie.

8. ZOZNAM SKRATIEK

ABC	ATP Binding Cassette
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
ABCC1	ATP-binding cassette subfamily C member 1
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G member 2
AKR	aldo-ketoreduktáza
AML	akútna myeloblastová leukémia
ANT	antracyklín
Asn	asparagín
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein kinase
ATP	adenozíntrifosfát
BCRP	breast cancer resistance protein
CRE	carbonyl reducing enzyme, karbonylredukujúci enzým
CBRs	karbonylreduktázy
DAU	daunorubicín
DS	Downov syndróm
DHO	dihydrooracín
DHRS4	dehydrogenáza/reduktáza SDR rodiny člen 4
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DOX	doxorubicín
EGCG	epigalokatechin galát
EMT	epithelial–mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAS	fatty acid synthesis, syntéza mastných kyslelín
GABA	gamma-aminobutyric acid, kyselina gamma-aminomaslová
HSD	11β-hydroxysteroiddehydrogenáza
HSD11B1	11β-hydroxysteroiddehydrogenáza typ 1
IC_{50}	poloviční inhibiční koncentrace
IL	interleukín
Lys	lysín
MDR	multiple drug resistance, mnonohočetná lieková rezistencia

MDR	medium-chain dehydrogenases, dehydrigenázy/reduktázy so stredne dlhým reťzcom
monoHER	7-monohydroxyethylrutosid
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
MRP	multidrug resistance-associated protein, proteínu spájaný s mnoholiekovou rezistenciou MRP
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NNK	(4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanón
NOS1	NO syntáza 1
NOS2	NO syntáza 2
NOS3	NO syntáza 3
NQO1	NADPH-chinóndehydrogenáza
NQO2	chinónreduktáza 2
ONE	4-oxo-2-nonenal
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons
PGE	prostaglandín E
PGF	prostaglandín F
PGH	prostaglandín H
QR	quinone reductase, chinónreduktáza
RNA	ribonukleotidová kyselina
ROS	reactive oxygen species
SDR	short-chain dehydrogenase, dehydrogenáza/reduktáza s krátkym reťazcom
Ser	serín
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TIM-barrel	triose phosphate isomerase-barrel
Tyr	tyrosín
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

9. ZDROJE

Agapova OA., Yang P., Wang WH., Lane DA., Clark AF., Weinstein BI., Hernandez MR. (2003): Altered expression of 3α-hydroxysteroid dehydrogenases in human glaucomatous optic nerve head astrocytes. Neurobiology of Disease. 14, 63–73

Aherne AS., O´Brien NM. (2002): Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. 18, 75–81

Ahmed NK., Felsted RL., Bachur NR. (1978): Comaprison and characterization of mammalian xenobiotic ketone reductases. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 209, 12–19

Anderson A. a Walker BR. (2013): 11β-HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease. Drugs. 73, 1385–1393

Aubel-Sadron G., Londos-Gagliardi D. (1984) Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. Biochemie. 66, 333–352

Arai Y., Endo S., Miyagi N., Abe N., Miura T., Nishinaka T., Terada T., Oyama M., Goda H., El-Kabbani O., Hara A., Matsunaga T., Ikari A. (2015): Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1. Fitoterapia. 101, 51–56

Atalla A., Breyer-Pfaff U., Maser E. (2000): Purification and characterization of oxidoreductases catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol. Xenobiotica. 30, 755–769

Ax W., Soldan M., Koch L., Maser E. (2000): Development of Daunorubicin Resistance in Tumour Cells by Induction of Carbonyl Reduction. Biochemical Pharmacology. 59, 293–300

Bains OS., Takahashi RH., Pfeifer TA., Grigliatti TA., Reid RE., Riggs KW (2008): Two allelic variants of aldo-keto reductase 1A1 exhibit reduced in vitro metabolism of daunorubicin. Drug Metabolism & Disposition. 36, 904–910

Bains OS., Grigliatti TA., Reid RE., Riggs KW (2010a): Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 335, 533–545

Bains OS., Karkling MJ., Lubieniecka JM., Grigliatti TA., Reid RE., Riggs KW. (2010b): Naturally occurring variants of human CBR3 alter anthracycline in vitro metabolism. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 332, 755–763

Barski OA., Gabbay KH., Bohren KM. (1996): Aldehyde reductase, catalytic mechanism and substrate recognition. Advances in Experimental Medicine and Biology. 414, 443–451

Barski OA., Papusha VZ., Ivanova MM., Rudman DM., Finegold MJ. (2005): Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 289, F200–F207

Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A. (2008): The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. Drug Metabolism Reviews. 40, 553–624

Bauman DR., Steckelbroeck S., Penning TM. (2004): The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. Drugs New Perspective. 17, 563–578

Beranič N., Brožič P., Brus B., Sosič I., Gobec S., Lanišnik Rižner T. (2012): Expression of human aldo-keto reductase 1C2 in cell lines of peritoneal endometriosis: Potential implications in metabolism of progesterone and dydrogesterone and inhibition by progestins. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 130, 16–25

Berthiaume JM. and Wallace KB. (2007) Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. Cell Biology and Toxicology. 23, 15–25

Bilardi RA., Kimura K-I., Phillips DR., Cutts SM. (2012): Processing of anthracycline DNA-adducts via DNA replikation and interstrand crosslink repair pathways. Biochemical Pharmacology. 83, 1241–1250

Blanco JG., Sun C.L., Landier W., Chen L., Esparza-Duran D., Leisenring W., Mays A.,. Friedman DL., Ginsberg JP., Hudson MM., Neglia JP., Oeffinger KC., Ritchey AK., Villaluna D., Relling MV., Bhatia S. (2012): Anthracycline-Related Cardiomyopathy After Childhood Cancer: Role of Polymorphisms in Carbonyl Reductase Genes-A Report From the Children's Oncology Group. Journal of Clinical Oncology. 30, 1422–1429

Blouin K., Blanchette S., Richard Ch., Dupont P., Luu-The V., Tchernof A. (2005): Expression and activity of steroid aldoketoreductases 1C in omental adipose tissue are positive correlates of adiposity in women. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 288, E398–E404

Bohren KM., Bullock B., Wermuth B., Gabbay KH. (1989): The aldo-keto reductase superfamily. The Journal of Biological Chemistry. 264, 9547–9551

Bonnensen C., Eggleston IM., Hayes JD. (2001): Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. Cancer Research. 61, 6120–6130

Breyer-Pfaff U., Nill K. (2000): High-affinity stereo selective reduction of the enantiomers of ketotifen and of ketonic nortryptyline metabolites by aldo-keto reductases from human liver. Biochemical Pharmacology. 59, 249–260

Breyer-Pfaff U., Nill K. (2004): Carbonyl reduction of naltrexone and dolasetron by oxidoreductases isolated from human liver cytosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 56, 1601–1606

Brožič P., Šmuc T., Gobec S., RižnerTL. (2006): Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. Molecular and Cellular Endocrinology. 259, 30–42

Bruynzeel AM., Mul PP., Berkhof J., Bast A., Niessen HW., van der Vijgh WJ. (2006): The influence of the time interval between monoHER and doxorubicin administration on the protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 58, 699–702

Burczynski ME., Lin HK., Penning TM. (1999): Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase. Cancer Research. 59, 607–614

Burczynski ME., Sridhar GR., Palackal NT., Penning TM. (2001): The reactive oxygen species and Michael acceptors-inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the α,β-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-none. Journal of Biological Chemistry. 276, 2890–2897

Byrns MC., Steckelbroeck S., Penning TM. (2008): An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective of aldo-keto reductase 1C3 (type inhibitor 2 3alpha-HSD, type 5 17β-HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. Biochemical Pharmacology. 75, 484–493

Camós M., Esteve J., Jares P., Colomer D., Rozman M., Villamor N., Costa D., Carrió A., Nomdedéu J., Montserrat E., Campo E. (2006): Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. Cancer Research. 66, 6947–6954

Cao Y., Cao R. (1999): Angiogenesis inhibited by drinking tea. Nature. 398, 381

Cihalová D., Ceckova M., Kucera R., Klimes J., Staud F. (2015): Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 *in vitro*. Biochemical Pharmacology. 98, 465–472

Cook NC., Samman S. (1996): Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Journal of Nutritional Biochemistry. 7, 66–76

Crotti S., Posocco B., Marangon E., Nitti D., Toffoli G., Agostini M (2015): Mass spectrometry in the pharmacokinetic studies of anticancer natural products. Mass Spectrometry Reviews. 36, 213–251

Dan S., Shirakawa M., Mukai Y., Yoshida Y.,Yamazaki K., Kawaguchi T., Matsuura M., Nakamura Y., Yamori T. (2003): Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines. Cancer Science. 94, 1074–1082

Davidson WS., Walton DJ., Flynn TG. (1978): A comparative study of the tissue and species distribution of NADPH-dependent aldehyde reductase. Comparative Biochemistry and Physiology B. 60, 309–315

Dean M., Hamon Y., Chimini G. (2001): The human ATP-binding cassete (ABC) transporter superfamily. The Journal of Lipid Research. 4, 1007–1017

Deweese JE., Osheroff N. (2008): The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep´s clothing. Nucleic Acids Research. 37, 738–748

Deyashiki Y., Ohshima K., Nakanishi M., Sato K., Matsuura K., Hara A. (1995): Molecular cloning and characterization of mouse estradiol 17 beta-dehydrogenase (A-specific), a member of the aldoketoreductase family. Journal of Biological Chemistry. 270, 10461–10467.

Díez-Dacal B., Gayarre J., Gharbi S., Timms JF., Coderch C., Gago F., Pérez-Sala D. (2011): Identification of aldo-keto reductase AKR1B10 as a selective target for modification and inhibition by prostaglandin A1: implications for antitumoral activity. Cancer Research. 71, 4161–4171

Doorn JA., Maser E., Blum A., Claffey DJ., Petersen DR. (2004): Human carbonyl reductase catalyzes reduction of 4-oxonon-2-enal. Biochemistry. 43, 13106–13114

Downes CS., Clarke DJ., Mullinger AM., Gimenez-Abian JF., Creighton AM., Johnson RT. (1994): A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. Nature. 372, 467–470

Dzyakanchuk Anna A., Balazs Z., Nashev Lyubomir G., Amrein Kurt E., Odermatt A. (2009): 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 reductase activity is dependent on a high ratio of NADPH/NADP(+) and is stimulated by extracellular glucose. Molecular and cellular endocrinology. 301, 137–141

Edwardson DW., Narendrula R., Chewchuk S., Mispel-Beyer K., Mapletoft JP., Parissenti AM. (2015): Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. Current Drug Metabolism. 16, 412–426

El-Kabbani O., Scammells PJ., Day T., Dhagat U., Endo S., Matsunaga T., Soda M., Hara A. (2010): Structure-based optimization and biological evaluation of human 20a-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) salicylic acid-based inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. 45, 5309–5317

Ellis EM., Judah DJ., Neal GE., Hayes JD. (1993): An ethoxyquin-inducible aldehyde reductase from rat liver that metabolizes aflatoxin B1 defines a subfamily of aldo-keto reductases. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 90, 10350–10354

Ellis EM. (2007): Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. Pharmacology & Therapeutics. 115, 13–24

Endo S., Matsunaga T., Kitade Y., Ohno S., Tajima K., El-Kabbani O., Hara A. (2008): Human carbonyl reductase 4 is a mitochondrial NADPH-dependent quinone reductase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 377, 1326–1330

Endo S., Matsunaga T., Mamiya H., Ohta C., Soda M., KitadeY., Tajima K., Zhao HT., El-Kabbani O., Hara A. (2009): Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductaselike protein: endogenous substrates and inhibition by steroids. Archives of Biochemistry and Biophysics. 487, 1–9

Endo S., Matsunaga T., Soda M., Tajima K., Zhao HT., El-Kabbani O., Hara A. (2010): Selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by antiinflammatory N-phenylanthranilic acids and glycyrrhetic acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 33, 886–890

Espana L., Martin B., Aragues R., Chiva C., Oliva B., Andreu D., Sierra A. (2005) Bcl-x(L)-mediated changes in metabolic pathways of breast cancer cells: from survival in the blood stream to organspecific metastasis. The American Journal of Pathology. 167, 1125–1137

Ferrans VJ., Clark JR., Zhang J., Yu ZX., Herman EH. (1997): Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. Tsitologiia. 39, 928–937

Forrest GL., Gonzalez B. (2000): Carbonyl reductase. Chemico-Biological Interactions. 129, 21–40

Forrest G.L., Gonzalez B., Tseng W., Li X., Mann J. (2000): Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. Cancer Research. 60, 5158–5164

Gewirtz DA (1999): A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracyline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochemical Pharmacology. 57, 727–741

Gonzalez-Covarrubias V., Kalabus JL., Blanco JG. (2008): Inhibition of polymorphic human carbonyl reductase 1 (CBR1) by cardioprotectant flavonoid 7-monohydroxyethyl rutoside (monoHER). Pharmaceutical Research. 25, 1730–1734

Goormaghtigh E., Huart P., Praet M., Brasseur R., and Ruysschaert JM. (1990) Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. Biophysical Chemistry. 35, 247–257

Gronau S., Koenig GD., Jerg M., Riechelmann H. (2002): 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. Clinical otolaryngology and allied sciences. 27, 453–457

Guengerich FP., Cai H., McMahon M., Hayes JD., Sutter TR., Groopman JD., et al. (2001): Reduction of aflatoxin B1 dialdehyde by rat and human aldo-keto reductases. Chemical Research in Toxicology. 14, 727–737

Gylfe AE., Katainen R., Kondelin J., et al. (2013): Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer. PLoS Genetics. 9, e1003876

Hale JP., Lewis IJ. (1994): Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. Archive of Disease in Childhood. 71, 457–462

Halliwell B. and Gutteridge JMC. (2007): Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, New York, 2007

Hande KR. (2008): Topoisomerase II inhibitors. Update Cancer Therapeutic. 3, 13–26

Hara A., Matsuura K., Tamada Y., Sato K., Miyabe Y., Deyashiki Y., Ishida N. (1996): Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile-acid-bindig protein and an oxidoreductase of human colon cells. Biochemical Journal. 313, 373–376

Harborne JB., Williams CA. (2000): Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 55, 481–504

Havsteen BH. (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics. 96, 67–202

Haytowitz DB., Bhagwat S., Holden JM. (2013): Sources of variability in the flavonovid content of foods. Precedia Food Science. 2, 46–51

Heim KE., Tagliaferro AR., Bobilya DJ. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry. 13, 572–584

Henderson BE., Feigelson HS. (2000): Hormonal carcinogenesis. Carcinogenesis. 21, 427–33

Higaki Y., Usami N., Shintani S., et al. (2003): Selective and potent inhibitors of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone. Chemico-Biological Interactions. 143–144, 503–513

Hintzpeter J., Seliger JM, Hofman J., Martin HJ., Wsol V., Maser E. (2016): Inhibition of human anthracycline reductases by emodin - A possible remedy for anthracycline resistance. Toxicology and Applied Pharmacology. 293, 21–29

Hoefer CC., Quiñones-Lombraña A., Blair RH., Blanco JG. (2016): Role of DNA methylation on the expression of the anthracycline metabolizing enzyme AKR7A2 in human heart. Cardiovascular Toxicology. 16, 182–192

Hoffmann F, Maser E. (2007): Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/ reductase superfamily. Drug Metabolism Reviews. 39, 87–144

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, 238–248

Hofman J., Skarka A., Havrankova J., Wsol V. (2015): Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. Biochemical Pharmacology. 96, 168–78b

Hotta N., Toyota T., Matsuoka K., Shigeta Y., Kikkawa R., Kaneko T., Takahashi A., Sugimura K., Koike Y., Ishii J., Sakamoto N. (2001): SNK-860 diabetic neuropathy study group, clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic

peripheral neuropathy: a 52-week multicenter placebo-controlled double-blind parallel group study. Diabetes Care. 24, 1776– 1782

Hotta N., Kawamori R., Fukuda M., Shigeta Y. (2012): Aldose reductase inhibitor-diabetes complications trial study group, long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications: multivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. Diabetic Medicine. 29, 1529–1533

Huang W., Ding L., Huang Q., Hu H., Liu S., Yang X., Hu X., Dang Y., Shen S., Li J., Ji X., Jiang S., Liu JO., Yu L. (2010): Carbonyl reductase 1 as a novel target of (−)-epigallocatechin gallate against hepatocellular carcinoma. Hepatology. 52, 703–14

Hult M., Nobel CS., Abrahmsen L., Nicoll-Griffith DA., Jornavall H., Oppermann UC. (2001): Novel enzymological profiles of human 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Chemico-Biological Interactions. 130–132, 805–814

Hyndman D., Bauman DR, Heredia VV, Penning TM (2003): The aldo-keto reductase homepage. Chemico-Biological Interactions. 143–144, 621–631

Chang Q., Harter TM., Rikimaru LT., Petrash JM. (2003): Aldo-keto reductases as modulators of stress response. Chemico-Biological Interactions. 143–144, 325–332

Chen Z., Kastaniotis AJ., Miinalainen IJ., Rajaram V., Wierenga RK., Hiltunen JK. (2009): 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS. The FASEB Journal. 23, 3682–91

Chung YT., Matkowskyj KA., Li H., et al. (2012): Overexpression and oncogenic function of aldo–keto reductase family 1B10 (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. Modern Pathology. 25, 758–66

Imai H., Dansako H., Ueda Y., Satoh S. and Kato N. (2018) Daunorubicin, a topoisomerase II poison, suppresses viral production of hepatitis B virus by inducing

cGAS-dependent innate immune response. Biochemical and Biophysical Research Communications. 504, 672–678

Ireland LS., Harrison DJ., Neal GE., Hayes JD. (1998): Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo–keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. Biochemical Journal. 332, 21–34

Ismail E., Al-Mulla F., Tsuchida S., Suto K., Motley P., Harrison PR., et al. (2000): Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function. Cancer Research. 60, 1173–1176

Ito Y., Mitani T., Harada N., Isayama A., Tanimori S., Takenaka S., et al. (2013): Identification of carbonyl reductase 1 as a resveratrol-binding protein by affinity chromatography using 4′-amino-3,5-dihydroxy-trans-stilbene. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 59, 358–64

Iwata N., Inazu N., Satoh T. (1989): The purification and properties of NADPH-dependant carbonyl reductases from rat ovary. Journal of Biochemistry. 105, 556–564

Jarabak J., Harvey RG. (1993): Studies on three reductases which have polycyclic aromatic hydrocarbon quinones as substrates. Archives of Biochemistry and Biophysics. 303, 394–401

Ji Q., Chang L., VanDenBerg D., Stanczyk FZ., Stolz A. (2003): Selective reduction of AKR1C2 in prostate cancer and its role in DHT metabolism. Prostate. 54, 275–289

Jez JM., Bennett MJ., Schlegel BP., Lewis M., Penning TM. (1997a): Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. Biochemical Journal. 326, 625–636

Jez JM., Flynn TG., Penning TM. (1997b): A new nomenclature for aldo-keto reductase superfamily. Biochemical Pharmacology. 54, 639–647

Jez JM. a Penning TM. (2001): The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. Chemico-Biological Interactions. 130–132, 499–525

Jornvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalezduarte R., Jeffery J., et al. (1995): Short-chain dehydrogenases reductases (Sdr). Biochemistry. 34, 6003–6013

Kassner N., Huse K., Martin HJ., Gödtel-Armbrust U., Metzger A., Meinieke I., Brockmöller J., Klein K., Zanger UM., Maser E., Wojnowski L. (2008): Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in human liver. Drug Metabolism and Disposition. 36, 2113–2120

Katiyar SK., Mukhtar H. (1997): Tea antioxidants in cancer chemoprevetion. Journal of Cellular Biochemistry. Suppl. 27, 59–67

Kavanagh KL., Klimacek M., Nidetzky B.,. Wilson D.K. (2002): The structure of apo and holo forms of xylose reductase, a dimeric aldo-keto reductase from Candida tenuis. Biochemistry. 41, 8785–8795.

Kelly VP., Ireland LS., Ellis EM., Hayes JD. (2000): Purification from rat liver of a novel constitutively expressed member of the aldo-keto reductase 7 family that is widely distributed in extrahepatic tissues. Biochemical Journal. 348, 389–400

Kelly VP., Sherratt PJ., Crouch DH., Hayes JD. (2002): Novel homodimeric and heterodimeric rat gammahydroxybutyrate synthases that associate with the Golgi apparatus define a distinct subclass of aldoketo reductase 7 family proteins. Biochemical Journal. 366, 847–861

Khanim F., Davies N., Velica P., Hayden R., Ride J., Pararasa C., Chong MG., Gunther U., Veerapen N., Winn P., Farmer R., Trivier E., Rigoreau L., Draysonand M., Bunce C. (2014): Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate. British Journal of Cancer. 110, 1506–1516

Kim JS., Chang JW., Yun HS., Yang KM., Hong EH., Kim DH., et al. (2010): Chloride intracellular channel 1 identified using proteomic analysis plays an important role in the radiosensitivity of HEp-2 cells via reactive oxygen species production. Proteomics. 10, 2589–604

Kim JS., Chang JW., Yun HS., Yang KM., Hwang SG. (2012): Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. Cancer Biology & Therapy. 13, 638–646

Knight LP., Primiano T., Groopman JD., Kensler TW., Sutter TR. (1999): c DNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B_1-metabolizing member of the aldo-keto reducctase super-family, AKR7A3. Carcinogenesis. 20, 1215–1223

Kokenberg EANM. (1991): Pharmacokinetic studies of daunorubicin in patients with acute myeloid leukemia. Doctoral thesis. Department of hematology. Erasmus University Rotterdam.

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

Kozma E., Brown E., Ellis EM., Lapthorn AJ. (2002): The crystal structure of rat liver AKR7A1 - A dimeric member of the aldo-keto reductase superfamily. Journal of Biological Chemistry. 277, 16285–16293

Krischer JP., Epstein S., Cuthbertson DD., Goorin AM., Epstein ML., Lipshultz SE. (1997): Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. Journal of Clinical Oncology. 15, 1544–1552

Kropotova ES., Tychko RA., Zinov'eva OL., et al. (2010): Downregulation of AKR1B10 gene expression in colorectal cancer. Molecular Biology (Mosk). 44, 243–50

Laffin B. a Petrash JM. (2012): Expression of the aldo-keto reductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. Frontiers in Pharmacology. 3, 104

Lal S., Sandanaraj E., Wong ZW., Ang PC., Wong NS., Lee EJ., et al. (2008): CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. Cancer Science. 99, 2045–2054

Lan Q., Zheng T., Shen M. a kol. (2007): Genetic polymorphisms in oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. Human Genetics. 121, 161–168

Lange BV. (2000): The management of neoplastic disorders of haematopoeisis in children with Down's syndrome. British Journal of Haematology. 110, 512–524

Larasati YA., Yoneda-Kato N., Nakamae I.,Yokoyama T., Meiyanto E. & Kato J. (2018): Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. Scientific reports. 8, 2039

Laštovková L. (2011): *Inhibiční studie lidské membránově vázané karbonylreduktasy*. Rigorózní práce. Katedra biochemických věd. Univerzita Karlova v Praze Framaceutická fakulta v Hradci Králové

Lewis MJ., Wiebe JP., Heathcote JG. (2004): Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. BMC Cancer. 4, 27

Li J., Guo Y., Duan L., Hu1 X.,. Zhang X., Hu J., Huang L., He R., Hu Z., Luo W.,Tan T., Huang R., Liao D., Zhu YS., Luo DX. (2017): AKR1B10 promotes breast cancer cell migration and invasion via activation of ERK signaling. Oncotarget. 8, 33694–33703

Licata S., Saponiero A., Mordente A., Minotti G. (2000): Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. Chemical Research in Toxicology. 13, 414–420

Lin HK., Steckelbroeck S., Fung KM.,. Jones AN., Penning TM. (2004): Characterization of a monoclonal antibody for human aldo-keto reductase AKR1C3 (type 2 3α-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17-hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate. Steroids. 69, 795–801

Lipshultz SE., Colan SD., Gelber RD., Perez-Atayde AR., Sallan SE., Sanders SP. (1991): Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. The New England Journal of Medicine. 324, 808–815

López de Cerain A., Marín A., Idoate MA., Tuñón MT., Bello J. (1999): Carbonyl reductase and NADPH cytochrome p450 reductase activities in human tumoral versus normal tissues. European Journal of Cancer. 35, 320–324

Loriot Y., Fizazi K., Jones RJ., Van Den Brande J., Molife RL., Omlin A., et al. (2014): Safety, tolerability and anti-tumour activity of the androgen biosynthesis inhibitor ASP9521 in patients with metastatic castration-resistant prostatecancer: multi-centrephaseI/IIstudy. Investigational New Drugs. 32, 995–1004

Lu JJ., Bao JL., Chen XP., Huang M., Wang YT. (2012): Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer angents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 485042

Lyon RC., Johnston SM., Watson DG., McGarvie G., Ellis EM. (2007): Synthesis and catabolism of γ-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells - Role of the aldo-keto reductase AKR7A2. Journal of Biological Chemistry. 282, 25986–25992

Ma J., Yan R., Zu X., Cheng JM., Rao K., Liao DF., et al. (2008): Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. Journal of Biological Chemistry. 283, 3418–23

Ma J., Luo DX., Huang C., Shen Y., Bu Y., Markwell S., Gao J., Liu J., Zu X., Cao Z., Gao Z., Lu F., Liao DF., et al. (2012): AKR1B10 overexpression in breast cancer: association with tumor size, lymph node metastasis and patient survival and its potential as a novel serum marker. International Journal of Cancer. 131, E862–71

Makiishi T., Araki S., Koya D., Maeda S., Kashiwagi A., Haneda M. (2003). C-106T polymorphism of AKR1B1 is associated with diabetic nephropathy and erythrocyte

aldose reductase content in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. American Journal of Kidney Diseases. 42, 943–951

Malátková P., Wsól V. (2014): Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. Drug metabolism reviews. 46, 96–123

Martin HJ., Breyer-Pfaff U., Wsol V., Venz S., Block S., Maser E. (2006): Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: Role in carbonyl reduction of xenobiotics. Drug Metabolism and Disposition. 34, 464–70

Maser E. (1995): Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction. The pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases. Biochemical Pharmacology. 49, 421–440

Maser E., Oppermann UC. (1997): Role of type-1 11betahydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes. European Journal of Biochemistry. 249, 365–369

Maser E. (2006): Neuroprotective role for carbonyl reductase? Biochemical and Biophysical Research Communications. 340, 1019–1022

Matsumoto T., Ono Y., Kuromiya A., Toyosawa K., Ueda Y., Bril V. (2008): Long-term treatment with ranirestat (AS-3201), a potent aldose reductase inhibitor, suppresses diabetic neuropathy and cataract formation in rats. Journal of Pharmacological Sciences. 107, 340–348

Matsumoto R., Tsuda M., Yoshida K., Tanino M., Kimura T., Nishihara H, Abe T., Shinohara N., Nonomura K., Tanaka S.(2016): Aldo-keto reductase 1C1 induced by interleukin-1β mediates the invasive potential and drug resistance of metastatic bladder cancer cells. Scientific Reports. 6, 34625

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

Matsunaga T., Wada Y., Endo S., Soda M., El-Kabbani O., Hara A. (2012): Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. Frontiers in Pharmacology. 3, 5

Matsunaga T., Hojo A., Yamane Y., Endo S., El-Kabbani O., Hara A. (2013): Pathophysiological roles of aldo–keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. Chemico-Biological Interactions. 202, 234–242

Matsunaga T., Yamaguchi A., Morikawa Y., et al. (2014): Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. Anticancer Drugs. 25, 868–877

Matsunaga T., Kezuka Ch., Morikawa Y., Suzuki A., Endo S., Iguchi K., Miura T., Nishinaka T., Terada T., El-Kabbani O., Hara A., Ikari A. (2015): Up-regulation of carbonyl reductase 1 renders development of doxorubicin resistance in human gastrointestinal cancers. Biological and and Pharmaceutical Bulletin. 38, 1309–1319

Matsuura K., Tamada Y., Deyashiki Y., Miyabe Y., Nakanishi M., Ohya I, Hara A (1996): Activation of human liver 3α-hydroxysteroid dehydrogenase by sulphobromophtalein. Biochemical Journal. 313, 179–184

Matsuura K., Hara A., Kato M., Deyashiki Y., Miyabe Y., Ishikura S., Sugyiama T., Katagiri Y, (1998): Activation of human liver 3α-hydroxysteroid dehydrogenase by clofibrate derivates. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 285, 1096–1103

Mazur A., Bayle D., Lab C., Rock E., Rayssiguier Y. (1999): Inhibitory effect of procyanidin-rich extracts on LDL oxidation in vitro. Atherosclerosis. 145, 421–422

Megias-Vericat JE., Martínez-Cuadrón D., Herrero MJ., Aliño SF., Poveda JL., Sanz MÁ., Montesinos P. (2018): Pharmacogenetics of metabolic genes of anthracyclines in acute myeloid leukemia. Current Drug Metabolism. 19, 55–74

Menna P., Paz OG., Chello M., Covino E., Salvatorelli E., Minotti G. (2012): Anthracycline cardiotoxicity. Expert Opinion on Drug Safety. 11, 21–36

Miller VL., Lin HK., Murugan P., Fan M., Penning TM., Brame LS., et al. (2012): Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is expressed in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma but not small cell carcinoma. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 5, 278–289

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, 158–229

Miura T., Nishinaka T., Terada T. (2008): Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. Molecular and Cellular Biochemistry. 315, 113–121

Molnari JC. and Myers AL. (2012): Carbonyl reduction of bupropion in human liver. Xenobiotica. 42, 550–561

Mordente A., Meucci E., Silvestrini A., et al. (2009): New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity. Current Medicinal Chemistry. 16, 1656–1672

Moreland TA., Hewick DS. (1975): Studies on a ketone reductase in human and rat liver and kidney soluble fraction using warfarin as a substrate. Biochemical Pharmacology. 24, 1953–1957

Murakami A., Yakabe K., Yoshidomi K., Sueoka K., Nawata S., Yokoyama Y., et al. (2012): Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. Cancer Letters. 323, 69–76

Murphy MP. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochemical Journal. 417. 1–13

Nakarai C., Osawa K., Akiyama M., Matsubara N., Ikeuchi H., Yamano T., et al. (2015): Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastases in colorectal cancer. Clinical and Experimental Medicine. 15, 333–341

Nakayama M., Suzuki K., Toda M., Okubo S., and Hara Y. (1993): Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. Antiviral Research. 21, 289–299

Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000): Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinikcou praxi I. typická MDR. Klinická onkologie. Zvlášní číslo 2, 4–9.

O'Brien MM., Taub JW., Chang MN., Massey GV., Stine KC., Raimondi SC., Becton D., Ravindranath Y., Dahl GV. (2008): Children's oncology group study, P.O.G. cardiomyopathy in children with Down syndrome treated for acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group Study POG 9421. Journal of Clinical Oncology. 26, 414–420

O'Connor T., Ireland LS., Harrison DJ., Hayes JD. (1999): Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. Biochemical Journal. 343, 487–504

Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A. (1995): Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver. Biochemical Pharmacology. 50, 221–227

Ohkura-Hada S., Kondoh N., Hada A., Arai M., Yamazaki Y., Shindoh M., Kitagawa Y., Takahashi M., Ando T., Sato Y., Yamamoto M. (2008): Carbonyl reductase 3(CBR3) mediates 9-cisretinoic acid-induced cytostatis and is a potential prognostic marker for oral malignancy. The Open Dentistry Journal. 2, 78–88

Ondrušová M. (2007): Epidemiológia zhubných nádorov. Via Practica. 4, 6–9

Opperman UCT. a Maser E. (2000): Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. Toxicology. 144, 71–81

Opperman U., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu XQ., Lindh M., et al. (2003): Short-chain dehydrogenases/ reductases (SDR): the 2002 update. Chemico-Biological Interactions. 143, 247–253

Opperman U. (2007): Carbonyl reductases: the complex relationship of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 47, 293–322

Penning TM., Burczynski ME., Jez JM., Hung CF., Lin HK., Ma HC., et al. (2000): Human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. Biochemical Journal. 351, 67–77

Penning TM. (2004): Aldo-keto reductases and formation of polycyclicaromatic hydrocarbons o-quinones. Methods in Enzymology. 378, 31–67

Penning TM., Jin Y., Steckelbroeck S., Rižner TL., Lewis M. (2004): Structure–function of human 3α-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. Molecular and Cellular Endocrinology. 2015, 63–67

Penning TM., Steckelbroeck S., Bauman DR., Miller MW., Jin Y., Peehl DM., et al. (2006): Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: Role in prostate disease and the development of specific inhibitors. Molecular and Cellular Endocrinology. 248, 182–91

Penning TM., Drury JE. (2007): Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphism. Archives of Biochemistry and Biophysics. 464, 241–250

Penning TM. (2015): The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. Chemico-Biological Interactions. 234, 236–246

Persson B., Kallberg Y., Bray JE., Bruford E., Dellaporta SL., Favia AD., Duarte RG., Jornvall H., Kavanagh KL., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning TM., Thornton JM., Adamski J., Oppermann U. (2009): The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. Chemico-Biological Interactions. 178, 94–98

Pfeiffer MJ., Smit FP., Sedelaar JP., Schalken JA. (2011): Steroidogenic enzymes and stem cell markers are upregulated during androgen deprivation in prostate cancer. Molecular Medicine. 17, 657–664

Piekorz RP., Gingras B., Hoffmeyer A., Ihle JN., Weinstein Y. (2005): Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Molecular Endocrinology. 19, 431–440

Pilka ES., Niesen FH., Lee WH., El-Hawari Y., Dunford JE., Kochan G., Wsol V., Martin HJ., Maser E., Oppermann U. (2009): Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. PLoS One. 4, e7113

Piska K., Koczurkiewicz P., Wnuk D., Karnas E., Bucki A., Wójcik-Pszczoła K., Jamrozik M., Michalik M., Kołaczkowski M., Pękala E. (2019): Synergistic anticancer activity of doxorubicin and piperlongumine on DU145 prostate cancer cells – The involvement of carbonyl reductase 1 inhibition. Chemico-Biological Interactions. 300, 40–48

Plebuch M., Soldan M., Hungerer C., Koch L., Maser E. (2007): Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. Cancer Letters. 255, 49–56

Psotová J., Chlopčíková Š., Miketová P., Hrbáč J., Šimánek V. (2004): Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes:

Part III. Apigenin, baicalelin, kaempherol, luteolin and quercetin. Phytotherapy Research. 18, 516–521

Quinn AM., Harvey RG., Penning TM. (2008): Oxidation of PAH trans-dihydrodiols by human aldo-keto reductase AKR1B10. Chemical Research in Toxicology. 21, 2207–15

Quiñones-Lombraña A., Ferguson D., Blair RH., Kalabus JL., Redzematovic A., Blanco JG. (2014): Interindividual variability in the cardiac expression of anthracycline reductases in donors with- and without- Down syndrome. Pharmaceutical Research. 31, 1644–1655

Raffa D., Maggio B., Raimondi MV., Plescia F., Daidone G. (2017): Recent discoveries of anticancer flavonoids. European Journal of Medicial Chemistry. 142, 213–228

Ravishankar D., Rajora AK., Greco F., Osborn HMI. (2013): Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 45, 2821–2831

Ris MM., von Wartburg JP. (1973): Heterogeneity of NADPH-dependent aldehyde-reductase from human and rat brain. European Journal of Biochemistry. 37, 69–77

Rižner TL., Smuc T., Rupreht R., et al. (2006): AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. Molecular and Cellular Endocrinology. 248, 126–135

Rižner TL. (2012): Enzymes of the AKR1B and AKR1C subfamilies and uterine diseases. Frontiers in Pharmacology. 3, 34

Rižner TL., Penning TM. (2014): Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. Steroids. 79, 49–63

Rosemond MJC., Walsh JS. (2004): Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. Drug Metabolism Reviews. 36, 335–361

Ruiz FX., Gallego O., Ardevol A., et al. (2009): Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. Chemico-Biological Interactions. 178, 171–7

Russel DW. (2009): Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. Journal of Lipid Research. 50, 120–125

Sales KJ., Boddy SC.,. Jabbour HN. (2008): F-prostanoid receptor alters adhesion, morphology and migration of endometrial adenocarcinoma cells. Oncogene. 27, 2466–2477

Sato S., Genda T., Ichida T., Murata A., Tsuzura H., Narita Y., Kanemitsu Y., Ishikawa S., Kikuchi T., Mori M., Hirano K., Iijima K., Wada R., et al. (2016): Impact of aldo-keto reductase family 1 member B10 on the risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 31, 1315–1322

Scully RE., Lipshultz SE. (2007): Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. Cardiovascular Toxicology. 7, 122–128

Scuric Z., Stain SC., Anderson W.F, Hwang JJ. (1998): New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Hepatology. 27, 943–50

Seliger JM., Misuri L., Maser E., Hintzpeter J. (2018a): The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 33, 607–614

Seliger JM., Cicek SS., Witt LT., Martin HJ.1, Maser E., Hintzpeter J. (2018b): Selective inhibition of human AKR1B10 by n-humulone, adhumulone and cohumulone isolated from Humulus lupulus extract. Molecules. 23, 3041

Sestanj K., Bellini F., Fung S., Abraham N., Treasurywala A., Humber L., Simard-Duquesne N., Dvornik D. (1984): N-[5-(trifluoromethyl)-6-methoxy-1-

naphthalenyl]thioxomethyl]-N-methylglycine (Tolrestat), a potent, orally active aldose reductase inhibitor. Jornal of Medicinal Chemistry. 2, 255–256

Shapiro HK. (1998): Carbonyl-trapping therapeutic strategies. American Journal of Therapeutics. 5, 323–353

Shen Y., Zhong L., Johnson S., Cao D. (2011): Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. Chemico-Biological Interactions. 191, 192–198

Skarydova L., Hofman J., Chlebek J., Havrankova J., Kosanova K., Skarka A., Hostalkova A., Plucha T., Cahlikova L., Wsol V. (2014): Isoquinoline alkaloids as a novel type of AKR1C3 inhibitors. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 143, 250–258

Smith LA., Cornelius VR., Plummer CJ., Levitt G., Verrill M., Canney P., Jones A. (2010): Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BMC Cancer. 10, 337

Soldan M., Ax W., Koch L., Plebuch M., Maser E. (1999): Cytostatic drug resistance: Role of phase-I daunorubicin metabolism in cancer cells. Advances in Experimental Medicine and Biology. 463, 529–538

Sonneveld P., Wassenaar HA., Nooter K. (1984): Long persistance of doxorubicin in human skin after extravasation. Caner Treatment Reports. 68, 895–6

Song DG., Lee JY., Lee EH., Jung SH., Nho CW., Cha KH., Koo SY., Pan CH. (2010): Inhibitory effects of polyphenols isolated from Rhus verniciflua on aldo-ketoreductase family 1 B10. BMB Reports. 43, 268–272

Steinherz L., Steinherz P. (1991): Delayed cardiac toxicity from anthracycline therapy. Pediatrician. 18, 49–52

Stewart DJ., Grewaal D., Green RM., Mikhael N., Goel R., Montpetit VA., et al. (1993): Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues. Anticancer Research. 13, 1945–52

Stolz A., Hammond L., Lou H., Takikawa H., Ronk M., Shively JE. (1993): cDNA cloning and expression of the human hepatic bile acid-binding protein. A member of the monomeric reductase gene family. Journal of Biological Chemistry. 268, 10448–10457

Steckelbroeck S., Jin Y., Gopishetty S., Oyesanami B., Penning TM. (2004): Human cytosolic 3α-hydroxysteroide dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity. Journal of Biological Chemistry. 279, 10784–10795

Suto K., Kajihara-Kano H., Yokoyama Y., Hayakari M., Kimura J., Kumano T., et al. (1999): Decreased expression of the peroxisomal bifunctional enzyme and carbonyl reductase in human hepatocellular carcinomas. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 125, 83–88

Suzuki-Yamamoto T., Nishizawa M., Fukui M., Okuda-Ashitaka E., Nakajima T., Ito S., et al. (1999): cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. FEBS Letters. 462, 335– 340

Szakacs G., Varadi A., Ozvegy-LaczkaC., Sarkadi B. (2008): The role of ABC-transporters in drug absorption, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). Drug Discovery Today. 13, 379–393

Šimůnek T., Štěrba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. (2009): Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. Pharmacological reports. 61, 154–171

Škarydová L., Živná L., Xiong G., Maser E., Wsól V. (2009): AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. Chemico-Biological Interctions. 178, 138–144

Takemura M., Ikezawa N., Iwasa K., Sato F. (2010): Metabolic diversification of benzylisoquinoline alklaoid biosynthesis through the introduction of a branch pathway in Eschscholzia californica. Plant and Cell Physiology. 51, 949–959

Takemura M., Endo S., Matsunaga T., Soda M., Zhao HT., El-Kabbani O., Tajima K., Iinuma M., Hara A. (2011): Selective inhibition of the tumor marker aldo-keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. Journal of Natural Products. 74, 1201–1206

Takenaka K., Tanaka F, Ogawa E, Oyanagi H, Wada H. (2005): Carbonyl reductase expression and its clinical significance in nonsmall-cell lung cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 14, 1972–1975

Tammali R., Reddy AB., Saxena A., Rychahou PG., Evers BM., Qiu S., Awasthi S., Ramana KV., Srivastava SK. (2011a). Inhibition of aldose reductase prevents colon cancerometastasis. Carcinogenesis. 32, 1259–1267

Tammali R.,. Srivastava SK, Ramana KV. (2011b): Targeting aldose reductase for the treatment of cancer. Current Cancer Drug Targets. 11, 560– 571

Tan NC., Tasaka H., Yu KP., Murphy ML., Kardnofsky DA. (1967): Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic dinase: Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. Cancer. 20, 333–353

Tanaka M., Bateman R., Rauh D., Vaisberg E., Ramachandani S., Zhang C. et al. (2005): An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules. PLoS Biology. 2005, e128.

Tian H., Li X., Jiang W., Lv C., Sun W., Huang C., Chen R. (2016): High expression of AKR1C1 is associated with proliferation and migration of small-cell lung cancer cells. Lung Cancer: Targets and Therapy. 7, 53–61

Turrens JF. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of Physiology. 552, 335–344

Usami N., Kitahara K., Ishikura S., Nagano M., Sakai S., Hara A. (2001): Characterization of a major form of human isatin reductase and the reduced metabolite. European Journal of Biochemistry. 268, 5755–5763

Usami N., Yamamoto T., Shintani S., Higaki Y., Ishikura S., Katagiri Y., Hara A. (2002): Substrate specificity of human 3(20)a-hydroxysteroid dehydrogenase for neurosteroids and its inhibition by benzodiazepines. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25, 441–445

Valcovici M., Andrica F., Serban C., Dragan S. (2016): Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives. Archives of Medical Science. 12, 428–435

Veitch ZW., Guo B., Hembruff SL., Bewick AJ., Heibein AD., Eng J., Cull S., Maclean DA., and Parissenti AM. (2009). Induction of 1C aldo-keto reductases and other drug dose-dependent genes upon acquisition of anthracycline resistance. Pharmacogenetics and Genomics. 19, 477–488

Wallace KB. (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. Pharmacology & Toxicology. 93, 105–115

Waltner-Law ME., Wang XL., Law BK., Hall RK., Nawano M., Granner DK. (2002): Epigallokatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. The Journal of Biological Chemistry. 277, 34933–34940

Wang M. (2006): Inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 for the treatment of metabolic syndrome. Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000). 7, 319–323

Wang HW., Lin CP., Chiu JH., et al. (2007): Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1and AKR1C2) overexpression and drug resistance in non-small cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. International Journal of Cancer. 120, 2019–2027

Wang T., Li Q., Bi K. (2018): Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 13, 12–23

Watanabe K., Sugawara C., Ono A., Fukuzumi Y., Itakura S., Yamazaki M., Tashiro H., Osoegawa K., Soeda E., Nomura T. (1998): Mapping of a novel human carbonyl reductase, CBR3, and ribosomal pseudogenes to human chromosome 21q22.2. Genomics. 52, 95–100

Weiss RB. (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? Seminars in oncology. 19, 670–686

Wermuth B. (1981): Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandine 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. Journal of Biological Chemistry. 256, 1206–13

Wermuth B., Bohrem KM., Heinemann G., von Wartburg JP., Gabbay KH. (1988): Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. Journal of Biological Chemistry 263, 16185-16188

Wirth H., Wermuth B. (1992): Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 40, 1857–1863

Wsol V., Szotakova B., Skálová L., Maser E. (2004): The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Toxicology. 197, 253–261

Wsol V., Szotakova B., Martin HJ., Maser E. (2007): Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man. Toxicology. 238, 111–118

Wu CP., Hsieh CH., Wu YS. (2011): The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. Molecular Pharmaceutics. 8, 1996–2011

Wu X., Li X., Fu Q., Cao Q., Chen X., Wang M., Yu J., Long J., Yao J., Liu H., Wang D., Liao R., Dong Ch. (2017): AKR1B1 promotes basal-like breast cancer progression by a positive feedback loop that activates the EMT program. The Journal of Experimental Medicine. 214, 1065–1079

Yamamoto T., Matsuura K., Shintani S., Hara A., Miyabe Y., Sugiyama T., Katagiri Y. (1998): Dual effects of anti-inflammatory 2-arylpropionic acid derivates on a major isoform of human liver 3α-hydroxysteroid dehydrogenase. Biological and Pharmaceutical Bulletin 21, 1148–1153

Yang CS., Wang ZY. (1993): Tea and cancer. Journal of National Cancer Institute. 85, 1038–49

Yang B., Millward A., Demaine A. (2003): Functional differences between the susceptibility Z−2/C-106 and protective Z+2/T-106 promoter region polymorphisms of the aldose reductase gene may account for the association with diabetic microvascular complications. Biochimica et Biophysica Acta. 1639, 1–7

Yang B., Hodgkinson A., Oates PJ., Millward BA., Demaine AG. (2008): High glucose induction of DNA-binding activity of the transcription factor NFkappaB in patients with diabetic nephropathy. Biochimica et Biophysica Acta. 1782, 295–302.

Yang X., Hua W., Ryu S., Yates P., Chang Ch., Zhang H., Di L. (2018): 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 1 human tissue distribution, selective inhibitor and role in doxorubicin metabolism. Drug Metabolism and Disposition. 46, 1023–1029

Yao HB. et al. (2014): AKR1B10, a good prognostic indicator in gastric cancer. European Journal of Surgical Oncology. 40, 318–324

Yoda T., Kikuchi K., Miki Y., Onodera Y., Hata S., Takagi K., et al. (2015): 11beta-prostaglandin F2alpha, a bioactive metabolite catalyzed by AKR1C3, stimulates prostaglandin F receptor and induces slug expression in breast cancer. Molecular and Cellular Endocrinology. 413, 236–247

Yoshitake H., Takahashi M., Ishikawa H., et al (2007): Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. International Journal of Gynecologic Cancer. 17, 1300–1306

Zablocki GJ., Ruzycki PA., Overturf MA., Palla S., Reddy GB., Petrash JM. (2011): Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens. Chemico-Biological Interactions. 191, 351–356

Zemanová L., Hofman J., Novotná E., Musilek K., Lundova T., Havrankova J., Hostalkova A., Chlebek J., Cahlikova L., Wsol W. (2015): Flavones inhibit the activity of AKR1B10, a promising therapeutic target for cancer treatment. Journal of Natural Products. 78, 2666–2674

Zhong L., Liu Z., Yan R., et al. (2009): Aldo-keto reductase family 1 B10 protein detoxifies dietary and lipid-derived alpha, beta-unsaturated carbonyls at physiological levels. Biochemical and Biophysical Research Communications 387, 245–50

Zhong L., Shen H., Huang C., et al. (2011): AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. Toxicology and Applied Pharmacology. 255, 40–7

Zhong T., Xu F., Xu J., Liu L., Chen Y. (2015): Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) is associated with the doxorubicin resistance in human breast cancer via PTEN loss. Biomedicine & Pharmacotherapy. 69, 317–325.

Zhou YL., Yao ML., Zhou J., Chang Y., Li JL., Wang YZ, Wu HP., Chen YH., Liu YR., Huang XJ. a Ruan GR (2018) Synergistic antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus SG611-PDCD5 and daunorubicin in human leukemic cells. OncoTargets and Therapy. 11, 5121–5132

Zhu H, Chang LL., Yan FJ., Hu Y., Zeng CM., Zhou TY., Yuan T., Ying MD., Cao J., He QJ., Yang B. (2018): AKR1C1 activates STAT3 to promote the metastasis of non-small cell lung cancer. Theranostics. 8, 676–692

Zimmermann TJ., Niesen FH., Pilka ES., Knapp S. Oppermann U., Maier ME. (2009): Discovery of a potent and selective inhibitor for human carbonyl reductase 1 from propionate scanning applied to the macrolide zearalenone. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 17, 530–6

10. INTERNETOVÉ ZDROJE

Internet 1. Štruktúra daunorubicínu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30323#section=Structures>

Internet 2. Schéma bunečného cyklu - MUNI. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1451/podzim2013/bk2156/Bunecny_cyklus_2013.pdf>

Internet 3. Tvorba semichinónového radikálu – SemanticScholar. Online. [cit. 6.5.2019]. Dostupné z: < https://www.semanticscholar.org/paper/Cancer-chemotherapy-and-drug-metabolism.-Riddick-Lee/ed42b3c59539e56014ae7c00e12efe162a305ab6/figure/0>

Internet 4. Štruktúra epigalokatechin galátu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65064#section=2D-Structure>

Internet 5. Štruktúra 1-*O*-acetyllykorinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443672#section=Structures>

Internet 6. Štruktúra 2´-hydroxyflavanonu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/176925#section=Structures>

Internet 7. Štruktúra 3-hydroxyflavanonu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11349#section=Structures>

Internet 8. Štruktúra 4´-hydroxyflavanonu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/165506#section=Structures>

Internet 9. Štruktúra 5-hydroxyflavanonu – Sigma-Aldrich. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/h4405?lang=en&region=SK>

Internet 10. Štruktúra 7-hydroxyflavanonu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1890#section=Structures>

Internet 11. Štruktúra 9-*O*-demethylgalantinu – PubChem, upravené. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/97315#section=2D-Structure>

Internet 12. Štruktúra acetylbulbisinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/56928078#section=Structures>

Internet 13. Štruktúra acetylhaemantaminu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70684778#section=2D-Structure>

Internet 14. Štruktúra acetylkaraninu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/258956#section=Structures>

Internet 15. Štruktúra allokryptopinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/98570#section=2D-Structure>

Internet 16. Štruktúra ambellinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25092366#section=2D-Structure>

Internet 17. Štruktúra apigeninu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280443#section=2D-Structure>

Internet 18. Štruktúra argemoninu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/98569#section=2D-Structure>

Internet 19. Štruktúra aromolinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/362574#section=2D-Structure>

Internet 20. Štruktúra belladinu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441586#section=Structures>

Internet 21. Štruktúra berbaminu – PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10170#section=Structures>

Internet 22. Štruktúra berberinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2353#section=Structures>

Internet 23. Štruktúra berlambinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11066#section=2D-Structure>

Internet 24. Štruktúra bersavinu - UPCE. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/68897/VlasakovaS_Vyuziti_prutokove_RH_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Internet 25. Štruktúra biochaninu A - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280373#section=2D-Structure>

Internet 26. Štruktúra boldinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10154#section=2D-Structure>

Internet 27. Štruktúra bufanaminu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/222152#section=2D-Structure>

Internet 28. Štruktúra bufanidrinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338023#section=2D-Structure>

Internet 29. Štruktúra bulbokapninu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12441#section=2D-Structure>

Internet 30. Štruktúra daidzeinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281708#section=2D-Structure>

Internet 31. Štruktúra epimaritidinu - ResearchGate. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/figure/Synthesis-of-racemic-oxomaritidine-and-epimaritidine_fig1_50807105>

Internet 32. Štruktúra escholitzinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12304178#section=2D-Structure>

Internet 33. Štruktúra floridzinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6072#section=2D-Structure>

Internet 34. Štruktúra fumaricinu - ChemSpider. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10395472.html>

Internet 35. Štruktúra fumarilinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/159888#section=2D-Structure>

Internet 36. Štruktúra galantaminu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9651#section=2D-Structure>

Internet 37. Štruktúra galantinu - SpectraBase. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://spectrabase.com/spectrum/4QFWh28zUhn>

Internet 38. Štruktúra glycyrrhetinovej kyseliny - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10114#section=2D-Structure>

Internet 39. Štruktúra haemantaminu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441593#section=2D-Structure>

Internet 40. Štruktúra haemantidinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443678#section=2D-Structure>

Internet 41. Štruktúra hamaynu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443670#section=2D-Structure>

Internet 42. Štruktúra hesperidinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10621#section=2D-Structure>

Internet 43. Štruktúra hippeastrinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441594#section=2D-Structure>

Internet 44. Štruktúra homolykorinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160473#section=2D-Structure>

Internet 45. Štruktúra hydrastinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/197835#section=2D-Structure>

Internet 46. Štruktúra chlidantinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9814447#section=2D-Structure>

Internet 47. Štruktúra chlorogenovej kyseliny - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427#section=2D-Structure>

Internet 48. Štruktúra isokorydinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10143#section=2D-Structure>

Internet 49. Štruktúra kalifornidinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15385520#section=Structures>

Internet 50. Štruktúra kanadalinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9864120#section=2D-Structure>

Internet 51. Štruktúra kanadinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/34458#section=2D-Structure>

Internet 52. Štruktúra karaninu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441589#section=2D-Structure>

Internet 53. Štruktúra karyachinu - wildflowerfinder. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <http://wildflowerfinder.org.uk/Flowers/P/Poppy(Californian)/Caryachine.png>

Internet 54. Štruktúra katechinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9064#section=2D-Structure>

Internet 55. Štruktúra kávovej kysliny - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/689043#section=2D-Structure>

Internet 56. Štruktúra korydalinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/101301#section=2D-Structure>

Internet 57. Štruktúra korydinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10153#section=2D-Structure>

Internet 58. Štruktúra korykavaminu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12304036#section=2D-Structure>

Internet 59. Štruktúra korykavidinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12304033#section=2D-Structure>

Internet 60. Štruktúra korynolinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/177014#section=2D-Structure>

Internet 61. Štruktúra korypalminu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12304090#section=2D-Structure>

Internet 62. Štruktúra krininu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/398937#section=2D-Structure>

Internet 63. Štruktúra kryptopinu - PubChem. Online. [cit. 26.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72616#section=2D-Structure>

Internet 64. Štruktúra kvercetinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=2D-Structure>

Internet 65. Štruktúra kvercitrinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280459#section=2D-Structure>

Internet 66. Štruktúra laurotetaninu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/267400#section=2D-Structure>

Internet 67. Štruktúra luteolinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280445#section=2D-Structure>

Internet 68. Štruktúra lykoreninu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/160472#section=2D-Structure>

Internet 69. Štruktúra lykorinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72378#section=2D-Structure>

Internet 70. Štruktúra masoninu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/168922#section=2D-Structure>

Internet 71. Štruktúra matrin - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91466#section=2D-Structure>

Internet 72. Štruktúra morinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281670#section=2D-Structure>

Internet 73. Štruktúra myricetinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281672#section=2D-Structure>

Internet 74. Štruktúra naringeninu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/932#section=2D-Structure>

Internet 75. Štruktúra *N*-methyllaurotetainu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16573#section=2D-Structure>

Internet 76. Štruktúra norisokorydinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12313549#section=2D-Structure>

Internet 77. Štruktúra obameginu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441064#section=2D-Structure>

Internet 78. Štruktúra odulinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/101919101#section=2D-Structure>

Internet 79. Štruktúra *O*-methylfumarofinu – Plantes de Phytoterapie. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2014_Lyon_Dijoux_Phytotherapie/co/fumeterre.html>

Internet 80. Štruktúra *O*-methylkaryachinu - Elsevier. Online. [cit.27.4.2019]. Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0960076014000910?token=F22524C1957CDAEF8F3A9D829FB1057D18FE8EB904E7AB59BF78878F3E5450C5407B4EB85E66AAD3D00034E3ACCE9DB6>

Internet 81. Štruktúra oxymatrinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/114850#section=Structures>

Internet 82. Štruktúra pallidinu - ChemSpider. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16738259.html>

Internet 83. Štruktúra palmatinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19009#section=2D-Structure>

Internet 84. Štruktúra parfuminu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/185623#section=2D-Structure>

Internet 85. Štruktúra protopinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4970#section=2D-Structure>

Internet 86. Štruktúra rutinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=2D-Structure>

Internet 87. Štruktúra silibininu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31553#section=2D-Structure>

Internet 88. Štruktúra sinaktinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5321317#section=2D-Structure>

Internet 89. Štruktúra sinoakutinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/821366#section=2D-Structure>

Internet 90. Štruktúra skoulerinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439654#section=2D-Structure>

Internet 91. Štruktúra stylopinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6770#section=2D-Structure>

Internet 92. Štruktúra taxifolinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439533#section=2D-Structure>

Internet 93. Štruktúra tazzetinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/271607#section=2D-Structure>

Internet 94. Štruktúra tetrahydrokolumbaminu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440229#section=2D-Structure>

Internet 95. Štruktúra tetrahydromasoninu - MDPI, upravené. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/719/htm>

Internet 96. Štruktúra tetrahydropalmatinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5417#section=2D-Structure>

Internet 97. Štruktúra thaliktrikavinu - UNIZG. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:949/preview>

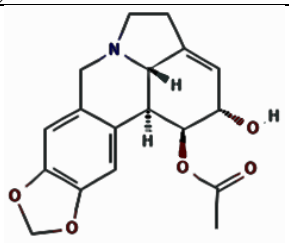
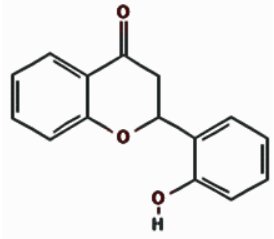
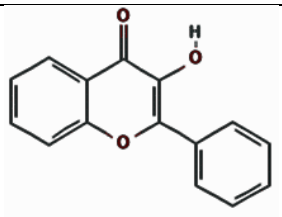
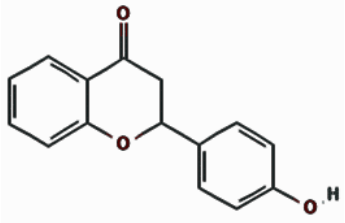
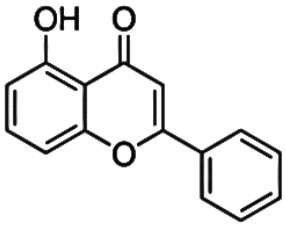
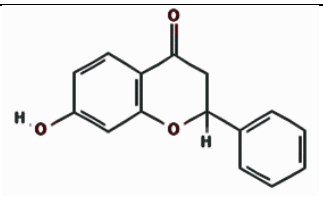
Internet 98. Štruktúra undulatinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/271606#section=2D-Structure>

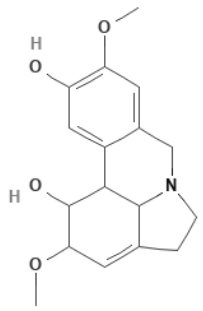
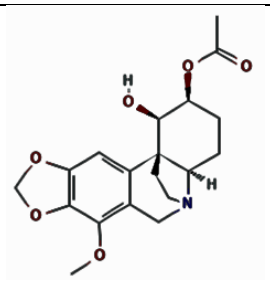
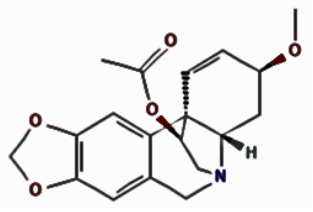
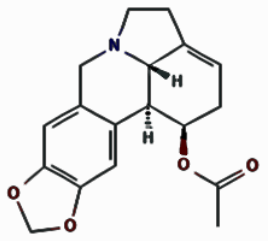
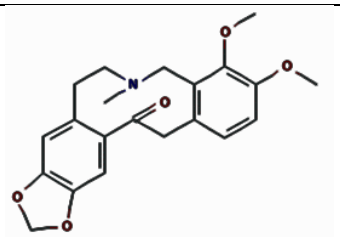
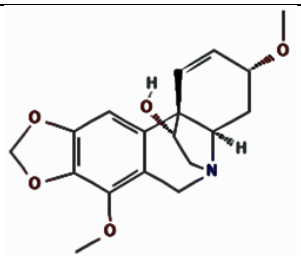
Internet 99. Štruktúra vitexinu - PubChem. Online. [cit. 27.4.2019]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280441#section=2D-Structure>

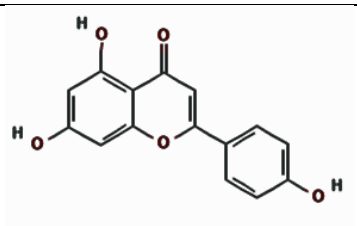
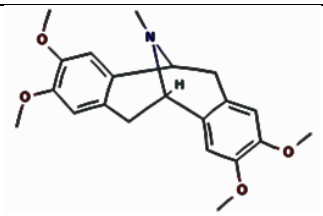
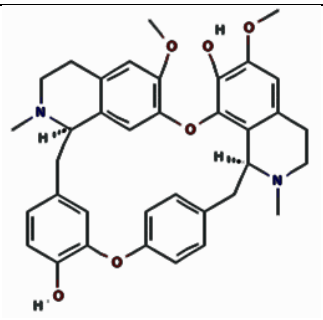
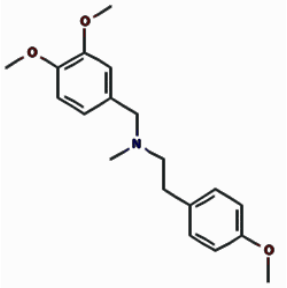
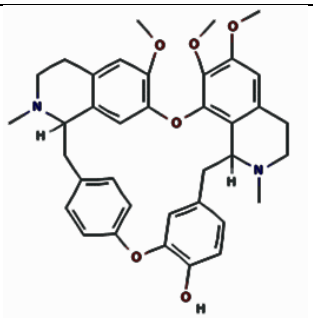
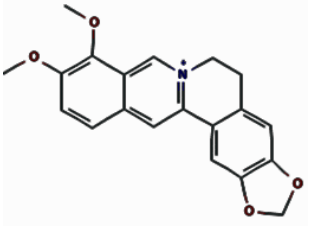
11. PRÍLOHY

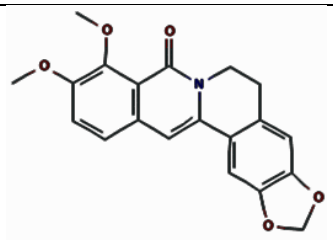
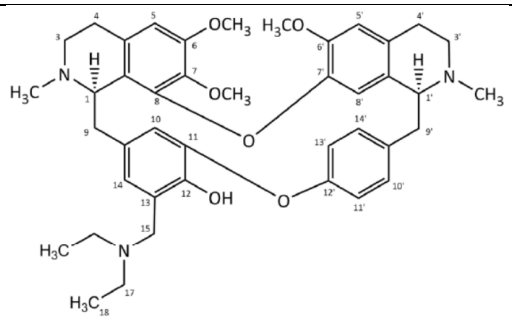
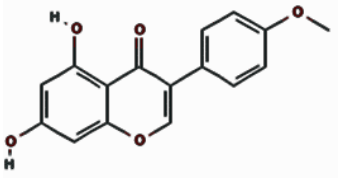
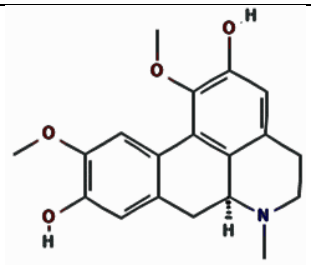
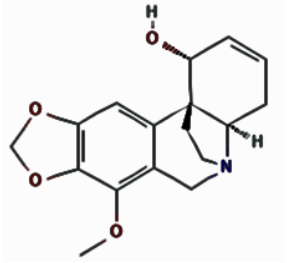
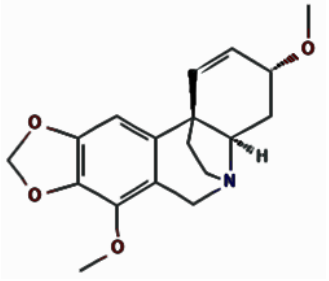
Príloha č.1

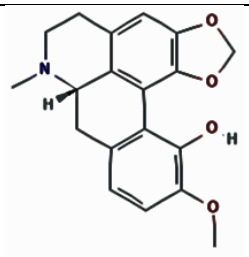
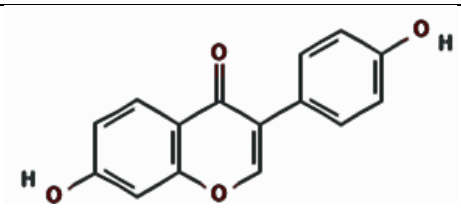
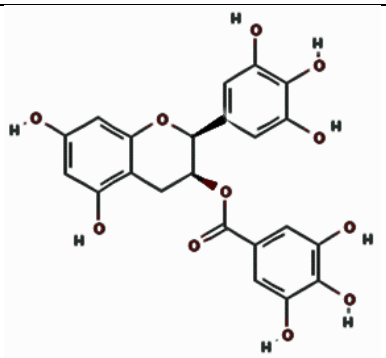
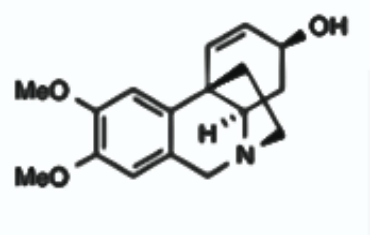
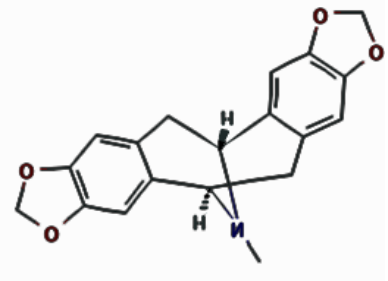
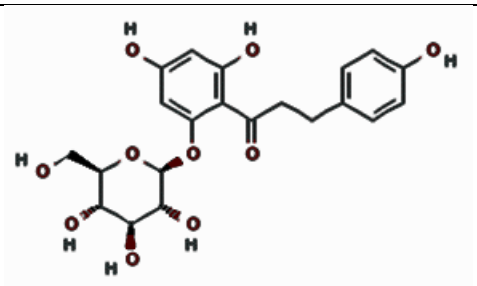
Štruktúry skúmaných zlúčenín ako potenciálnych inhibítorov

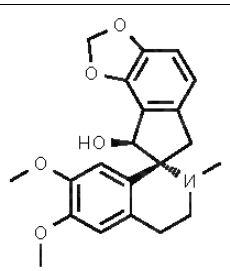
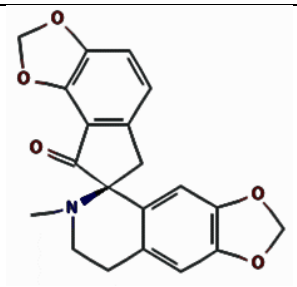
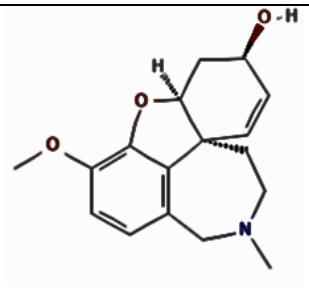
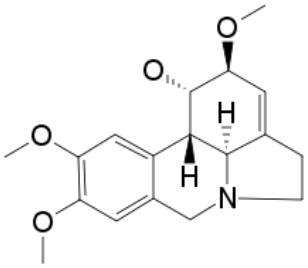
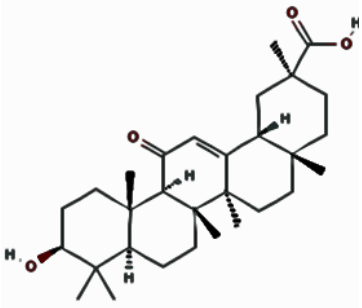
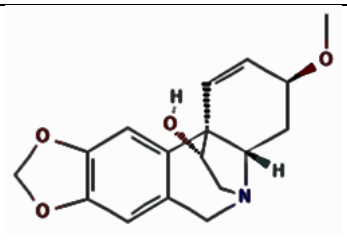
1-*O*-acetyllykorin, *Internet 5*	
2´-hydroxyflavanon, *Internet 6*	
3-hydroxyflavanon, *Internet 7*	
4´-hydroxyflavanon, *Internet 8*	
5- hydroxyflavanon, *Internet 9*	
7-hydroxyflavanon, *Internet 10*	

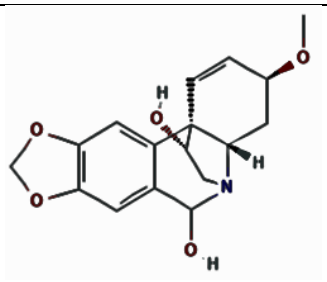
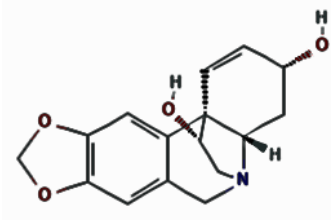
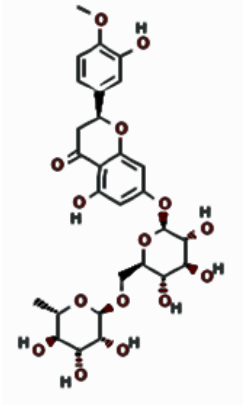
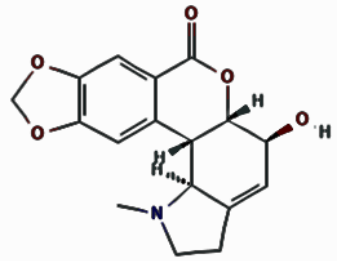
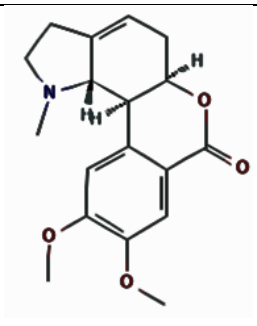
9-*O*-demethylgalantin, *Internet 11* Upravené	
Acetylbulbisin, *Internet 12*	
Acetylhaemantamin, *Internet 13*	
Acetylkaranin, *Internet 14*	
Acetyllambellin	
Allokryptopin, *Internet 15*	
Ambelin, *Internet 16*	

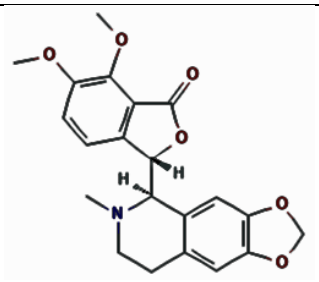
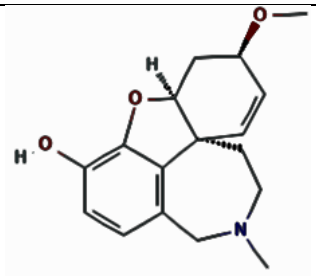
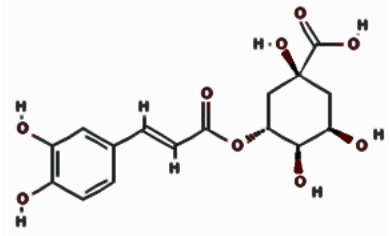
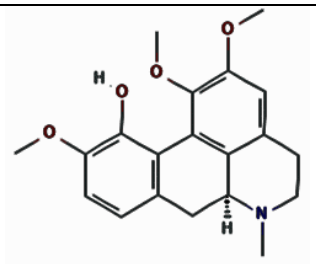
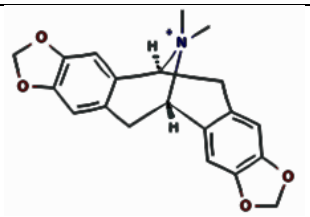
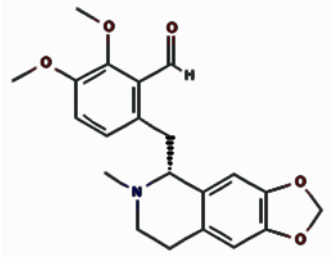
Apigenin, *Internet 17*	
Argemonin, *Internet 18*	
Aromolin, *Internet 19*	
Belladin, *Internet 20*	
Berbamin, *Internet 21*	
Berberin, *Internet 22*	

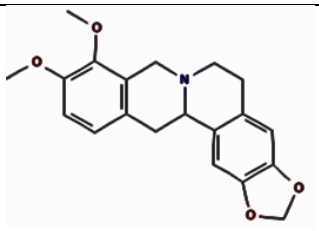
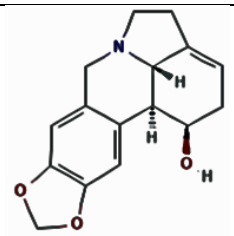
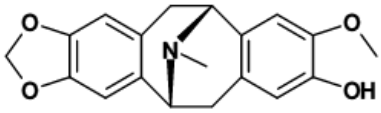
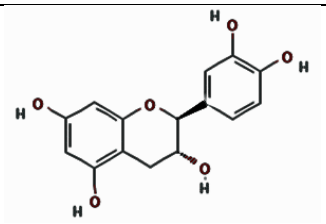
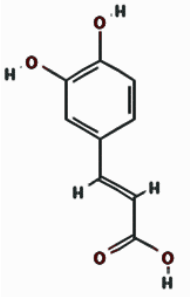
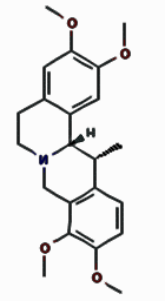
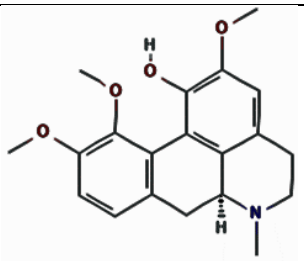
Berlambin, *Internet 23*	
Bersavin, *Internet 24*	
Biochanin A, *Internet 25*	
Boldin, *Internet 26*	
Bufanamin, *Internet 27*	
Bufanidrin, *Internet 28*	
Bufanizin	

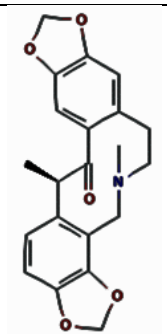
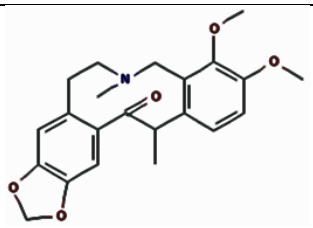
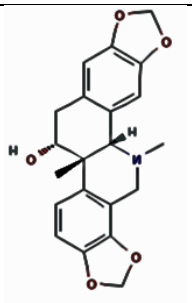
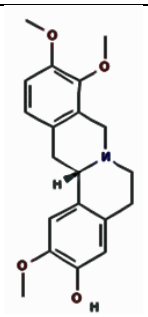
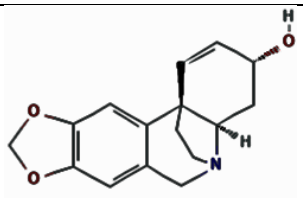
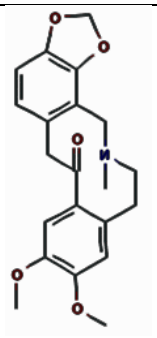
Bulbokapnin, *Internet 29*	
Daidzein, *Internet 30*	
Epigalokatechin galát, *Internet 4*	
Epimaritidin, *Internet 31*	
Escholitzin, *Internet 32*	
Floridzin, *Internet 33*	

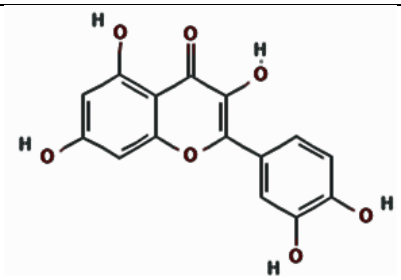
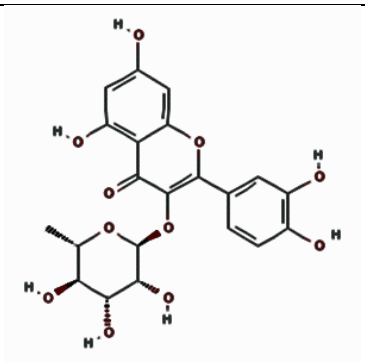
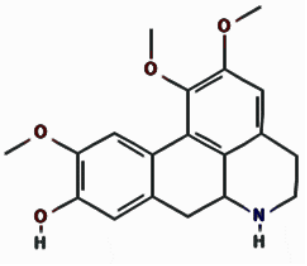
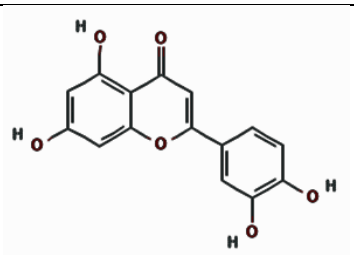
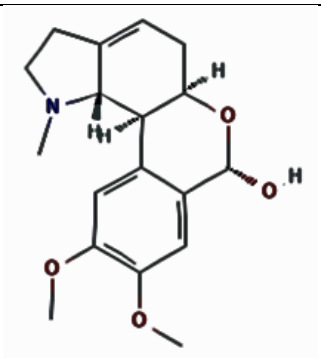
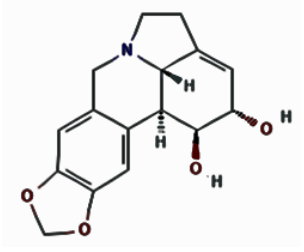
Fumaricin, *Internet 34*	
Fumarilin, *Internet 35*	
Galantamin, *Internet 36*	
Galantin, *Internet 37*	
Glycyrrhetinová kyselina, *Internet 38*	
Haemantamin, *Internet 39*	

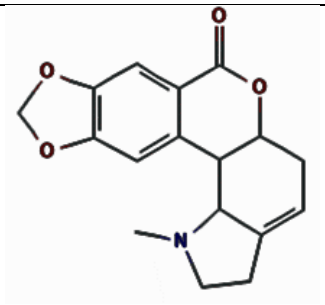
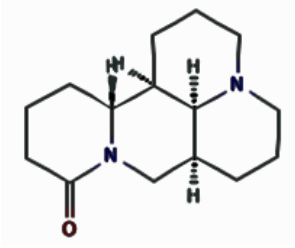
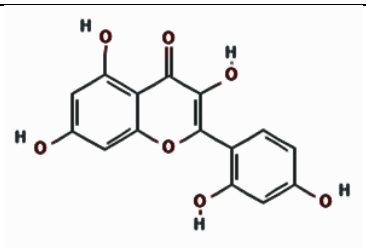
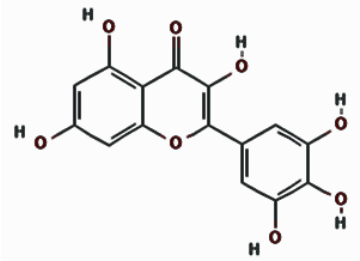
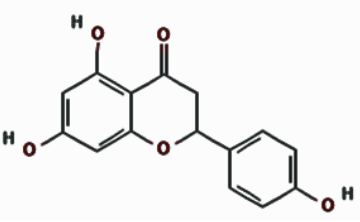
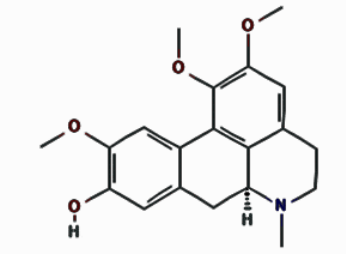
Haemantidin, *Internet 40*	
Hamayn, *Internet 41*	
Hesperidin, *Internet 42*	
Hippeastrin, *Internet 43*	
Homolykorin, *Internet 44*	

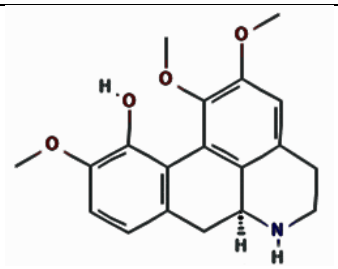
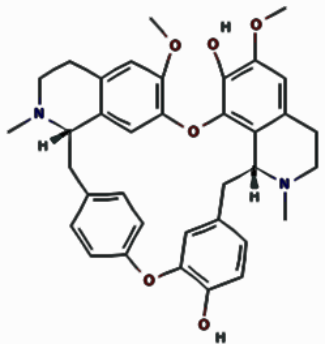
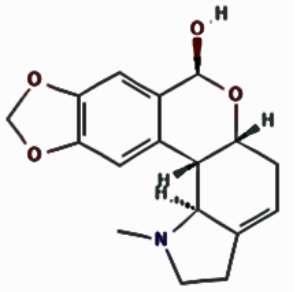
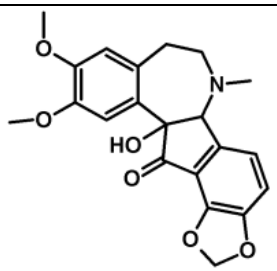
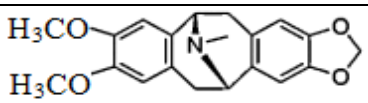
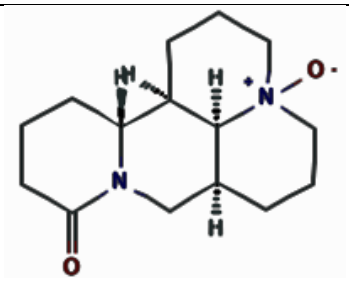
Hydrastin, *Internet 45*	
Chlidantin, *Internet 46*	
Chlorogenová kyselina, *Internet 47*	
Isokorydin, *Internet 48*	
Kalifornidin, *Internet 49*	
Kanadalin, *Internet 50*	

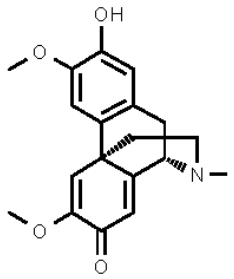
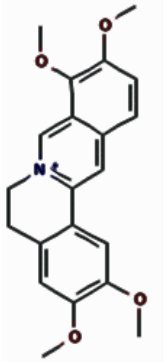
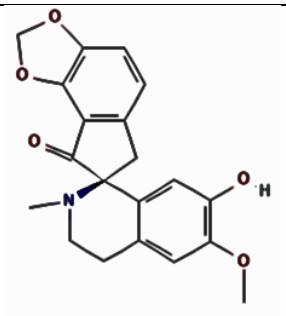
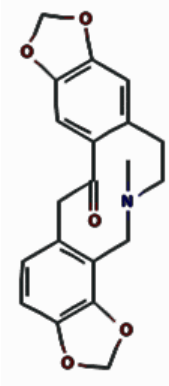
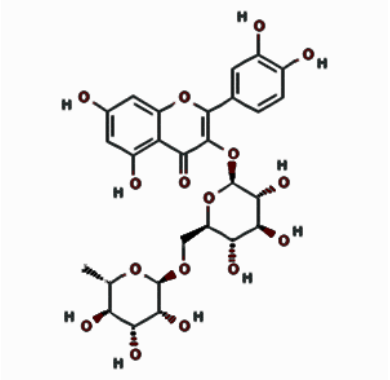
Kanadin, *Internet 51*	
Karanin, *Internet 52*	
Karyachin, *Internet 53*	
Katechin, *Internet 54*	
Kávová kyselina, *Internet 55*	
Korydalin, *Internet 56*	
Korydin, *Internet 57*	

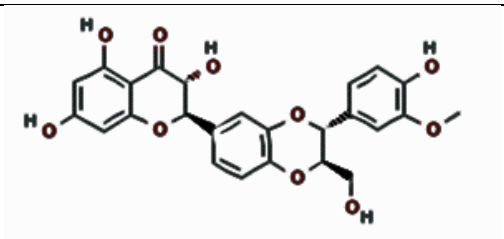
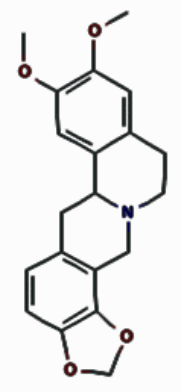
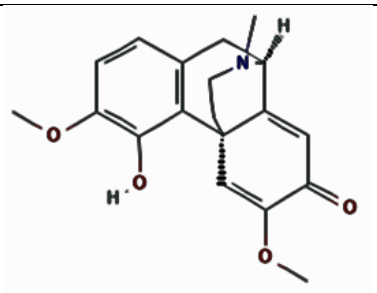
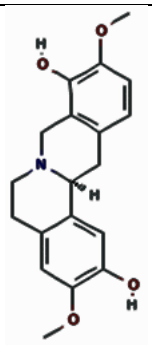
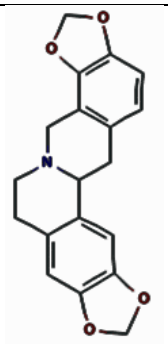
Korykavamin, *Internet 58*	
Korykavidin, *Internet 59*	
Korynolin, *Internet 60*	
Korypalmin, *Internet 61*	
Krinin, *Internet 62*	
Kryptopin, *Internet 63*	

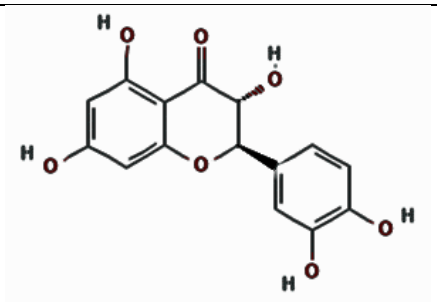
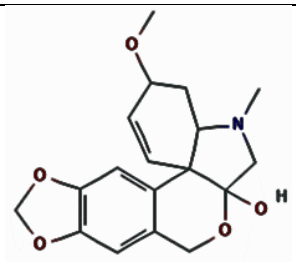
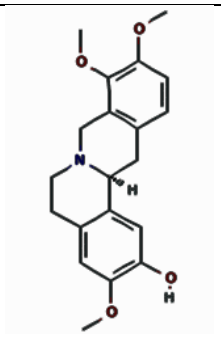
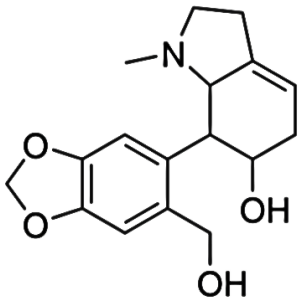
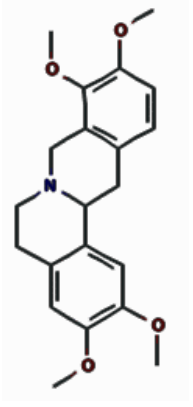
Kvercetin, *Internet 64*	
Kvercitrin, *Internet 65*	
Laurotetanin, *Internet 66*	
Luteolin, *Internet 67*	
Lykorenin, *Internet 68*	
Lykorin, *Internet 69*	

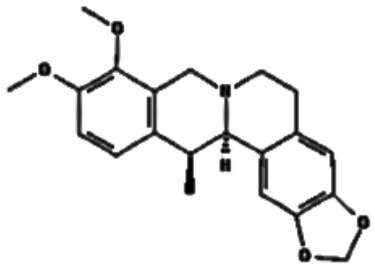
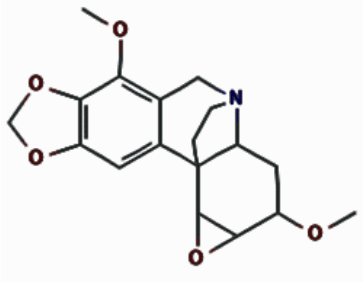
Masonin, *Internet 70*	
Matrin, *Internet 71*	
Morin, *Internet 72*	
Myricetin, *Internet 73*	
Naringenin, *Internet 74*	
N-methyllaurotetain, *Internet 75*	

Norisokorydin, *Internet 76*	
Obamegin, *Internet 77*	
Odulin, *Internet 78*	
O-methylfumarofin, *Internet 79*	
O-methylkaryachin, *Internet 80*	
Oxymatrin, *Internet 81*	

Pallidin, *Internet 82*	
Palmatin, *Internet 83*	
Parfumin, *Internet 84*	
Protopin, *Internet 85*	
Rutin, *Internet 86*	

Silibinin, *Internet 87*	
Sinaktin, *Internet 88*	
Sinoakutin, *Internet 89*	
Skoulerin, *Internet 90*	
Stylopin, *Internet 91*	

Taxifolin, *Internet 92*	
Tazzetin, *Internet 93*	
Tetrahydrokolumbamin, *Internet 94*	
Tetrahydromasonin, *Internet 95* Upravené	
Tetrahydropalmatin, *Internet 96*	

Thaliktrikavin, *Internet 97*	
Undulatin, *Internet 98*	
Vitexin, *Internet 99*