

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV VYBRANÝCH CYTOSTATIK NA AKTIVITU
CYTOSOLICKÝCH REDUKTAS KARBONYLOVÉ SKUPINY**

V MCF-7 LINII

Diplomová práce

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.
Školitel specialista: Mgr. Martina Gavelová, Ph.D.

Hradec Králové, 2008

Lenka Vildová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne 10.5.2008

.....

Lenka Vildová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Gavelové, Ph.D., Doc. Ing. Barboře Szotákové, PhD., Mgr. Romaně Novotné a Aleně Pakostové za jejich ochotu, cenné rady a významnou pomoc při získávání informací a dat pro tuto diplomovou práci. Děkuji také Mgr. Pavlu Krčmářovi, PhD. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za provedení QRT-PCR a pomoc při zpracování získaných výsledků.

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1. Buněčné kultury	9
2.1.1. Vývoj a definice.....	9
2.1.2. Kultivační podmínky	9
2.1.3. Primární kultury a buněčné linie.....	11
2.2. Cytostatika	12
2.2.1. Obecná charakteristika.....	12
2.2.2. Doxorubicin	16
2.2.3. Oracin.....	21
2.3. Reduktasy karbonylu	24
2.3.1. Obecná charakteristika a klasifikace.....	24
2.3.2. Aldo-ketoreduktasy (AKR).....	26
2.3.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	29
2.4. Nádorová rezistence.....	32
2.4.1. Definice.....	32
2.4.2. Mechanismus vzniku	33
2.4.3. Možnosti omezení rezistence.....	36
3. Cíl práce.....	38
4. Experimentální část.....	39
4.1. Materiál a chemikálie.....	39
4.2. Pomůcky a přístroje	39
4.3. Metodika práce	40
4.3.1. Kultivace buněčné linie MCF-7.....	40
4.3.2. Expozice buněk MCF-7 linie vybraným cytostatikům.....	42
4.3.3. Příprava cytosolu	44
4.3.4. Stanovení koncentrace bílkovin.....	45
4.3.5. Inkubace cytosolu s oracinem.....	47
4.3.6. Inkubace cytosolu s doxorubicinem	49
4.3.7. Inkubace cytosolu s oracinem a inhibitorem	50
4.3.8. Inkubace cytosolu s doxorubicinem a inhibitorem.....	52
4.3.9. Stanovení stereospecifity reduktas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk	53

4.3.10. Izolace celkové RNA	54
4.3.11. Kvantifikace mRNA metodou QRT-PCR	56
5. Výsledky měření	60
5.1. Stanovení koncentrace bílkovin	60
5.2. Vliv doxorubicinu a oracinu na aktivitu cytosolických reductas karbonylu	62
5.3. Identifikace reductas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk	68
5.4. Identifikace reductas doxorubicinu v cytosolu MCF-7	71
5.5. Stereospecifita reductas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk	74
5.6. Vliv doxorubicinu a oracinu na expresi vybraných genů v buňkách MCF-7 linie	76
6. Diskuse	78
7. Závěr	81
8. Seznam použitých zkratk	82
9. Použitá literatura	84

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Lenka Vildová

Titul, jméno, příjmení školitele: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Titul, jméno, příjmení školitele specialisty: Mgr. Martina Gavelová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vliv vybraných cytostatik na aktivitu cytosolických reductas karbonylové skupiny v MCF-7 linii**

Nádorová rezistence představuje hlavní problém chemoterapeutické léčby rakoviny. Jednou z možných příčin vzniku rezistence může být zvýšení enzymatické inaktivace cytostatik. V této studii jsme se zabývali vlivem antracyklinového antibiotika doxorubicinu a potenciálního cytostatika oracinu na aktivitu a expresi reductas karbonylu v cytosolu buněk MCF-7 linie izolované z lidského adenokarcinomu prsu. Tato cytostatika jsou biotransformována cestou redukce karbonylové skupiny na méně účinné metabolity. Zjistili jsme, že po krátké (48hod) expozici nízkým (nM) koncentracím vybraných cytostatik dochází ke statisticky výraznému nárůstu aktivity reductas v cytosolu buněk. Dále jsme se pokusili s využitím specifických inhibitorů definovat účast aldo-ketoreduktasy 1C3 (AKR1C3) a karbonylreduktasy 1 (CBR1) na redukcí výše uvedených cytostatik. Zvolené enzymy se přirozeně exprimují v prsní tkáni. Z naměřených výsledků vyplynulo, že AKR1C3 se nepodílí na redukcí vybraných cytostatik, zatímco CBR1 je hlavním enzymem biotransformace oracinu a spolu s dalšími enzymy se podílí na redukcí doxorubicinu. Expresí genů pro AKR1C3 a CBR1 byla hodnocena pomocí QRT-PCR. Zjistili jsme, že krátká expozice nízkým koncentracím doxorubicinu a oracinu nezpůsobila statisticky významný nárůst hladiny mRNA vybraných enzymů. Předpokládáme, že indukce CBR1 podílející se na redukcí doxorubicinu a oracinu v nádorové prsní tkáni je způsobována převážně netranskripčními mechanismy. Nalezení enzymů podílejících se na inaktivaci cytostatik v konkrétní nádorové tkáni a rovněž mechanismu vedoucímu ke zvýšení enzymové aktivity by mohlo více objasnit problematiku týkající se vzniku nádorové rezistence.

ABSTRACT

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

Title, Name, Surname of candidate: Lenka Vildová

Title, Name, Surname of tutor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title, Name, Surname of tutor-specialist: Mgr. Martina Gavelová, Ph.D.

Title of a diploma work: **Influence of selected cytostatic drugs on activity of cytosolic carbonyl reducing enzymes in MCF-7 cell line**

A major problem in cytostatic treatment of malignant tumors is the development of drug-resistance. One of the potential mechanisms of resistance is induction of drug-inactivating enzymes. The aim of the present study was to evaluate the effects of short-term exposure of MCF-7 cells to doxorubicin and oracin on the activities and expression of selected carbonyl reducing enzymes. Carbonyl reduction of these cytostatic drugs leads to 13-doxorubicinol (doxol) and 11-dihydrooracin (DHO), the major metabolites with lower antineoplastic potency compared to the parent drugs. We found that short-term (48 h) exposure of MCF-7 cells to low (nM) concentrations of doxorubicin or oracin caused a significant elevation of both cytostatics reduction rates. In order to identify principal enzyme(s) catalyzing the reduction of doxorubicin and oracin, we tested effects of selected inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3 and carbonyl reductase CBR1 on doxol and DHO formation. AKR1C3 and CBR1 are expressed in human breast cells. We found that the principal enzyme reducing both drugs was CBR1, while AKR1C3 seems not to play any important role in metabolism of either doxorubicin or oracin. To analyze the expression of AKR1C3 and CBR1 gene in control and drug-treated MCF-7 cells, relative quantification of mRNA using real-time RT-PCR was carried out. The exposure of MCF-7 cells to doxorubicin or oracin led to a non-significant increase of AKR1C3 and CBR1 mRNA levels. We assume that induction of CBR1 is caused by non-transcriptional mechanisms. In conclusion, identification of drug-inactivating enzymes in specific tumor tissue and mechanisms of their induction could contribute to explanation of drug-resistance.

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění provázejí lidstvo od pravěku, jak o tom svědčí archeologické nálezy. Dlouhou dobu tato onemocnění ale nebyla středem zájmu. Důvodem byl nižší výskyt nádorů ve srovnání s jinými chorobami, což bylo dáno kratší průměrnou délkou života. V současnosti jsou maligní nádorová onemocnění hlavní příčinou předčasného úmrtí. Incidence zhoubných nádorů u obou pohlaví v ČR i ve světě zaznamenává rostoucí trend. Vývoj úmrtnosti má stagnující charakter. Mezi nejčastěji diagnostikované nádory v ČR (vyjma dg. C44 – „jiný zhoubný novotvar kůže“) patří kolorektální karcinom, zhoubný nádor průdušnice a plic, karcinom prsu u žen a nádory prostaty u mužů [1]. Prevence vzniku nádorových onemocnění je stále nedokonalá, proto jsou hledány možnosti zlepšení současné protinádorové léčby. Hlavními způsoby léčby nádorových onemocnění jsou chemoterapie spolu s radioterapií a chirurgickým zásahem. Chemoterapie se v širším měřítku začala uplatňovat teprve v průběhu šedesátých let. Počáteční úspěchy chemoterapie vyvolaly vlnu nadšení. Postupně bylo ale zjišťováno, že úspěšnost léčby cytostatiky je limitována řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější patří výskyt závažných nežádoucích účinků a vývoj sekundární rezistence. Mechanismus vzniku nádorové rezistence je komplexní. Jednou z příčin vzniku nádorové rezistence, vedle zvýšeného efluxu cytostatika prostřednictvím transmembránových přenašečů a řady dalších mechanismů, se jeví zvýšení inaktivace cytostatika v nádorové buňce [2, 3]. Tato skutečnost podmiňuje snahu objasnit biotransformaci cytostatik v různých typech nádorů a zjistit vliv cytostatik na aktivitu biotransformačních enzymů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. BUNĚČNÉ KULTURY

2.1.1. Vývoj a definice

Vývoj buněčných kultur započal již koncem 19. století a v průběhu 20. století byly techniky zajišťující přežití a růst buněk odebraných jedinci postupně zdokonalovány. Za otce tkáňové kultur je považován Ross Harrison, který v roce 1907 na základě svých experimentů dokázal, že buňky jsou schopné přežívat a zachovávat si své charakteristické schopnosti i v prostředí *in vitro*, a stanovil obecnou techniku pro tkáňové kultury, která byla nadále zdokonalována [5]. V roce 1951 byla Georgem Geyem vyvinuta první lidská nádorová linie, HeLa, která je dosud značně používána [6, 7]. V současnosti jsou k dispozici buněčné linie prezentující většinu lidských nádorů. Buněčné kultury slouží ke studiu biochemických a molekulárně biologických procesů v normálních i nádorových buňkách [4].

Buněčnou kulturou se rozumí kultura tvořená nesloučenými buňkami. Spolu s orgánovými kulturami (tvořené celistvou tkání) jsou řazeny mezi tkáňové kultury. Počáteční kultura odebraná od jedince je nazývána primární kulturou, pasážírováním (ředěním) lze získat buněčnou linii. Jsou rozlišovány tzv. nesmrtelné buněčné linie, u nichž není počet dělení omezen, a konečné linie, jejichž buňky snesou jen omezený počet dělení [4].

2.1.2. Kultivační podmínky

Pro růst určité buněčné kultury musí být zajištěny požadované podmínky. Živiny jsou buňkám poskytovány prostřednictvím média s přídavkem nebo bez přídavku séra. Dále je nezbytné udržovat teplotu, pH, množství oxidu uhličitého a kyslíku v určeném rozmezí [4].

Dnes běžně používaná syntetická média vznikala v 50. letech 20. století. Tato základní média obsahují aminokyseliny, sacharidy, vitamíny a soli. Sérum a další složky, jako růstové faktory a hormony, jsou přidávány do základních médií, aby výsledné složení bylo optimální pro buněčný růst. pH média musí být upraveno na hodnotu ideálně kolem 7,4 [4].

Jedno z prvních médií bylo vytvořeno BME (basal medium) zásluhou Harryho Eagla, který usiloval o získání média vhodného pro normální i rakovinové buňky [8]. Toto médium bylo následně modifikováno, čímž vzniklo velké množství dodnes používaných médií. Jedním z nich je DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) obsahující 4krát vyšší koncentraci aminokyselin a vitamínů a 4,5krát vyšší koncentraci glukózy [9]. Mezi média obsahující širokou paletu komponent patří Medium 199, které vyvinul Morgan a spol. v roce 1950 [10].

Přidání séra do média podporuje růst buněk v kultuře. Sérové proteiny zahrnují hormony, růstové faktory, lipidy, transportní proteiny, enzymové kofaktory atd. [11]. Poměr jednotlivých složek séra se mění s věkem a zdravotním stavem zvířete, z tohoto důvodu jsou nejčastěji používána séra získaná z plodů a nově narozených telat. Dále jsou používána lidská a koňská séra. Koncentrace séra v médiu se pohybuje v závislosti na typu kultivovaných buněk od 5 do 20%. Vyšší koncentrace zpravidla přináší jen malý profit ve srovnání s narůstající cenou [4].

Přídavek séra do média přináší i řadu nevýhod. Poměr složek séra je v jednotlivých dodávkách rozdílný. Tyto rozdíly ve složení mohou vést ke změnám v řadě parametrů jako růst buněk, vazebnost a další. Ačkoli jsou séra kontrolována na obsah kontaminant, jsou v nich často přítomny virové partikule. Z těchto důvodů a se zohledněním ceny a větší reprodukovatelnosti studie byla vyvinuta média s přesně definovaným složením, bez nutnosti přídavku séra [4]. Jedna ze strategií, kterou prosazoval Sato s kolektivem, bylo přidání specifických složek (hormony, vazebné proteiny, lipidy, stopové prvky atd.) do základního média, druhá strategie podporovaná Hamem s kolektivem spočívá ve zvyšování koncentrace složek bazálního média. Sato při svých experimentech identifikoval některé faktory, které mají značný význam pro růst mnoha typů buněk v médiu [11, 12]. Jedná se o insulin, transferrin, seleničnany, epidermální růstový faktor, hydrokortison, sérový albumin a fibronectin. Mezi komponenty, které mají význam pro specifické buněčné linie patří fibroblastový růstový faktor, estrogen, glukagon, prostaglandiny a trijodthyronin. Hamova laboratoř vyvinula sérii médií MCDB, která poskytují definované a optimálně vyvážené prostředí podporující růst specifických typů buněk (např. MCDB 201 pro keratinocyty, MCDB 110 pro fibroblasty) [13].

Pro růst a diferenciaci většiny typů rakovinových buněk v kultuře je nutná interakce s podkladem. Výjimku tvoří hematopoetické nádorové linie a malé buňky rakoviny plic, které preferují růst v suspenzi buď jednotlivě nebo ve shlucích. Většina

nádorových linií tedy roste v monovrstvě na plastovém nebo skleněném podkladu. Nejrozšířenějším plastem je polystyren, dále polytetrafluorethylen. Adhezi buněk lze zvýšit potažením podkladu složkami extracelulární matrix. Často využívanými extracelulárními proteiny jsou kolagen, fibronectin a laminin. Pěstování buněk v monovrstvě je často nejjednodušší způsob kultivace, na druhé straně množství informací, které poskytuje růst buněk uvnitř kolagenové matrix v 3D prostoru, je větší, jelikož dochází k morfoloické a biochemické diferenciaci [14].

Pro optimální buněčný růst je důležité udržovat fyzikální podmínky v určitém rozmezí. Pro většinu savčích buněčných kultur je vhodná teplota $36,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Při nižších teplotách jsou ještě schopny růst, ovšem při teplotách kolem 40°C rapidně hynou. Kultivační média obsahují pufrovací systémy, které vyžadují přítomnost CO_2 v atmosféře, obvykle 5%. Většina nádorových buněk vyžaduje pH okolo 7,2-7,4. Jelikož dochází k postupnému okyselování média vlivem vedlejších produktů dýchání, je nutné médium pravidelně měnit (též z důvodu vyčerpání živin). Jednoduchou vizuální kontrolu pH zajišťuje fenolová červeň přidávaná do média. Vlhkost je důležitým faktorem ovlivňujícím vypařování vody z média, což vede ke zvyšování koncentrace solí. Vysoká koncentrace solí může způsobit lýzu buněk, proto musí být osmolalita média udržována v poměrně úzkém rozmezí [4].

2.1.3. Primární kultury a buněčné linie

Primární kultura získaná z daného jedince reprezentuje situaci v původní tkáni. Primárním materiálem může být jednak fragment tkáně v celku přiložený k substrátu nebo materiál získaný z nádorové tkáně, který je možné mechanicky nebo enzymaticky rozštěpit na jednotlivé buňky či jejich shluky. Běžně používané enzymy jsou trypsin a kolagenáza. Během kultivace může dojít postupně ke ztrátě heterogenity buněk, což může být v některých případech výhodné. Pokud v kultuře převládá typ buněk, který je pro další experimenty zajímavý, je vznik homogenní populace žádoucí. Pro vývoj buněčné linie je potom nutné, aby vznikla zcela homogenní populace. Nevýhodou je ztráta rozmanitosti mnohobuněčného nádoru s následnou absencí klíčových intracelulárních interakcí [4].

Buněčná linie může vzniknout jednak z primární kultury obsahující buňky se schopností neomezeného počtu dělení, nebo musí být buňky primární kultury transformovány. Transformaci lze vyvolat chemickou cestou nebo použitím viru.

Význam buněčných linií spočívá ve schopnosti sloužit jako obnovitelný zdroj buněčného materiálu pro opakující se studie. Buněčné linie mohou sloužit jako modely pro zkoumání vlastností nádorů, z nichž byly získány, např. genotypu a fenotypu, genetické exprese, citlivosti vůči lékům atd. [15]. S vzrůstajícím počtem pasáží může docházet ke ztrátě určitých rysů. Z důvodu zajištění obnovitelného zdroje buněčného materiálu lze buněčnou linii opakovaně zamrazovat s různým počtem pasáží [4].

Během kultivace prochází buněčná linie několika dobře definovanými fázemi růstu. Z počátku musí buňky rostoucí v monovrstvě přisednout k substrátu, navíc pokud byly podrobeny disagregaci působením proteolytických enzymů, potřebují čas pro reparaci, proto kultura roste relativně pomalu. Tento stav je nazýván lag fází. Poté dochází působením produkovaných růstových faktorů k zvýšení počtu dělících se buněk. Růst kultury je často exponenciální a mluvíme o log fázi. Pokud buňky pokryjí celý povrch substrátu, dochází ke zpomalení růstu kultury, je dosaženo tzv. saturační hustoty, která je pro buněčnou linii za daných podmínek charakteristická. Tato fáze je označena jako fáze plató. Přičemž bylo vyzorováno, že čím déle setrvávají buňky ve fázi plató před pasážováním, tím delší je následující lag fáze [4].

V současnosti je k dispozici velké množství buněčných linií, přesto stále vznikají nové. Je nutné zvážit, zda je výhodné vyvíjet novou buněčnou linii, když obdobná je již běžně dostupná. Mnoho linií je dobře charakterizováno a nově získaná data mohou být porovnávána s existující literaturou týkající se této linie. V některých situacích je samozřejmě vývoj nové buněčné linie žádoucí, např. v případě, že pro určitý typ nádoru není dostupná žádná nebo neúplně charakterizovaná buněčná linie. Vývoj nové nádorové linie je vhodný též, pokud došlo ke vzniku rezistence nádoru na nové léčivo [4].

2.2. CYTOSTATIKA

2.2.1. Obecná charakteristika

Maligní nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin předčasného úmrtí. Účinná prevence jejich vzniku je značně nedokonalá a včasná diagnostika je stále spíše výjimkou. Tím většího významu nabývá léčba zhoubných nádorů. Hlavními způsoby protinádorové léčby jsou chemoterapie spolu s radioterapií a chirurgickým zásahem.

Systematické klinické hodnocení léků s antitumorózním účinkem bylo zahájeno po druhé světové válce, kdy se začaly podávat alkylující látky (deriváty dusíkatého yperitu), a prvním úspěchem bylo navození přechodné remise u nemocných s lymfosarkomem rezistentním na radioterapii. Od té doby bylo identifikováno co do účinku a toxicity na 50 léčiv různých farmakologických skupin. Díky kombinované chemoterapii bylo dosaženo dlouhodobé kompletní remise u akutní lymfoblastové leukémie dětského věku, pokročilých maligních lymfomů a metastazujícího testikulárního karcinomu. V současnosti je terapeuticky ovlivnitelná řada maligních onemocnění i v pokročilém stavu. Nicméně většina nádorů, včetně nejčastěji se vyskytujících forem, může být chemoterapeuticky léčena pouze paliativně. K této skutečnosti přispívají faktory, které odpověď na farmakoterapii významně snižují a zhoršují prognózu onemocnění. Je to zejména poškození funkce eliminujícího orgánu (pro vysokou toxicitu cytostatika), vyšší věk (kdy bývá farmakologie cytostatik změněna) nebo mechanismy vývoje sekundární rezistence [16].

Zhoubné nádory se vyznačují infiltračním a destruktivním růstem, ztrátou původní funkce maligních buněk a nebezpečím tvorby metastáz. Příčinu selhání regulovaného růstu lze ve zkratce vyjádřit jako „kumulace četných genetických poruch“. Může přitom jít o genetické defekty, které indukují zvýšenou proliferaci a/nebo o genetické poruchy, které způsobují nedostatečnou eliminaci buněk s chybnou reduplikací DNA [17]. Chemoterapie ovlivňuje pouze proces buněčného dělení, na ostatní charakteristiky zhoubných nádorů nemá vliv. Cytostatika potlačují růst nádorů různými mechanismy – viz tab. 1.

Tab. 1. Rozdělení cytostatik dle mechanismu účinku [17]

Léčiva poškozující DNA	
- kovalentní vazbou na DNA (alkylující látky)	Cyklofosfamid
- uvolněním reaktivní platiny	Cisplatina
- interkalací	Doxorubicin
- inhibicí topoizomerázy II (epipodofylotoxiny)	Etoposid
- inhibicí topoizomerázy I	Topotekan
Látky ovlivňující syntézu DNA	
inhibice syntézy stavebních jednotek DNA	
- inhibice reductasy kyseliny dihydrolistové	Metotraxát
- inhibice ribonukleotidové reductasy	Hydroxykarbamid
zabudování falešných stavebních jednotek DNA	
- antimetabolity purinu	Azathioprin
- antimetabolity pyrimidinu	5-fluoruracil
Látky působící interakcí s mikrotubuly	
- inhibice polymerizace tubulinu	Vinblastin
- tvorba nenormálních mikrotubulů a inhibice depolymerizace (taxoidy)	Paclitaxel
Látky působící dalšími mechanismy	
- snížení plazmatické koncentrace asparaginu	Asparagináza
Látky ovlivňující regulační pochody organismu	
hormony, interferony, interleukiny, monoklonální protilátky	

Cílem cytostatické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek (dlouhodobou kompletní remisi) za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni. Tohoto cíle lze dosáhnout zvyšováním dávek (vysokodávková terapie). S vysokodávkovou (indukční, útočnou) cytostatickou léčbou se počítá zejména u malignit s horší prognózou a vyšším počtem rizikových faktorů predikujících selhání léčby. Musí však být zajištěna bezpečnost vysokodávkové cytostatické léčby, tj. prevence nežádoucích a toxických účinků (viz níže). Toxické účinky některých cytostatik jsou ireverzibilní a jejich incidence významně narůstá po překročení celkové (kumulativní) dávky (tj. dávky podané během léčebného cyklu), např. kardiomyopatie po antracyklinech, nefrotoxicita po cisplatině. U těchto cytostatik je nutné upravit dávkování tak, aby nebyla překročena kumulativní dávka. Zvýšit účinnost chemoterapie lze též kombinací více cytostatik nebo biochemickou modulací účinku cytostatika (kombinace cytostatika s léčivem bez cytostatických účinků, které zasahuje do biochemických dějů důležitých pro účinek cytostatika). Pro dosažení optimálního výsledku je často nutné chemoterapii kombinovat s chirurgickou léčbou a radioterapií. Podle vztahu chemoterapie k chirurgické léčbě rozlišujeme adjuvantní a neoadjuvantní chemoterapii. Adjuvantní

chemoterapie je definována jako cytostatická léčba po radikální chirurgické resekci, jejím cílem je eradikace všech stávajících mikrometastáz. Neoadjuvantní chemoterapie znamená chemoterapii preoperační, snižuje rozsah nádoru na ložisko, které lze následně resekovat. Účinnost a bezpečnost chemoterapie lze zvýšit volbou optimální cesty podání cytostatik a využitím cirkadiálních rytmů pro podporu výhodných vlastností cytostatik. Novou cestou je hledání a využití vztahu mezi cytostatickým účinkem a kinetikou cytostatik, které by sloužilo k předpovědi terapeutického i toxického účinku a také k odhadu individuálního dávkového režimu cytostatik [16].

Účinek cytostatik není specifický. K inhibici buněčného dělení dochází ve všech tkáních s vysokou proliferační rychlostí. Mezi rychle se vyměňující tkáně patří kostní dřeň, pohlavní žlázy, střevní sliznice a vlasové kořínky. Porucha funkce těchto tkání vede ke vzniku řady nežádoucích účinků (neutropenie, trombocytopenie, nauzea, zvracení, poškození ledvin, cystitida, neuropatie, kardiomyopatie, infertilita). Prakticky všechna cytostatika mohou působit teratogenně a některé (hl. alkylující látky) mohou vyvolat vznik sekundárního maligního bujení [16, 17]. K prevenci nežádoucích účinků cytostatik slouží podpůrná terapie – viz tab 2.

Tab. 2. Podpůrná terapie v prevenci nežádoucích účinků cytostatik [16, 18]

Nežádoucí účinek	Cytostatika	Prevence
nauzea, zvracení	všechna s rozdílnou intenzitou (zj. cisplatina, cyklofosfamid)	antagonisté 5-HT ₃ -receptorů, metoklopramid, alizaprid, event. v kombinaci s dexamethasonem
myelosuprese	všechna s rozdílnou intenzitou (zj. alkylující látky, merkaptopurin)	GM-CSF, G-CSF, erythropoetin, autologní kmenové buňky, amifostin
nefrotoxicita	methotrexát	leukovorin
	cisplatina	forsírovaná diuréza, hydratace, 3% roztok NaCl, amifostin
hemorhagická cystitida	cyklofosfamid, ifosfamid	mesna
kardiomyopatie	antracykliny	dexrazoxan
polyneuropatie	Vinca-alkaloidy	omezení dávek, pyridoxin, leukovorin, Org 2766, amifostin
ototoxicita	cisplatina	amifostin

Jednou z nejzávažnějších komplikací protinádorové léčby a příčinou jejího selhání je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytotoxických látek. Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při první léčbě. V tomto

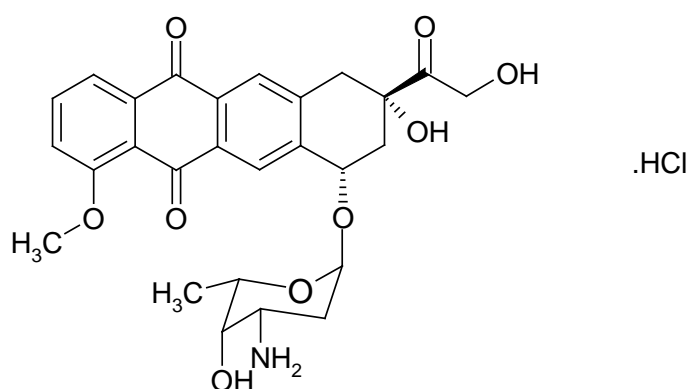
případě jde o tzv. přirozenou (primární) rezistenci. Získaná (sekundární) rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Mechanismy, kterými vzniká rezistence nádorových buněk na protinádorovou léčbu, jsou komplexnější povahy a možnosti omezení rezistence jsou dosud nedokonalé – dále viz kapitola 2.4.

2.2.2. Doxorubicin

2.2.2.1. Obecné vlastnosti a chemická struktura

Doxorubicin (adriamycin) je antracyklinové antibiotikum izolované z *Streptomyces peucetius* v roce 1969. Od svého zavedení do praxe se stal jedním z nejpoužívanějších cytostatik díky širokému spektru účinku [19].

Chemicky se jedná o (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxohexopyranosyl)oxy] - 6,8,11 - trihydroxy - 8 - (hydroxyacetyl) -1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion. Konjugovaný systém aglykonu je chromoforem pro viditelnou oblast, což způsobuje charakteristické červené zbarvení doxorubicinu. Využívá se ve formě hydrochloridu [19, 20].



Obr. 1. Strukturální vzorec doxorubicin-hydrochloridu [20]

Sumární vzorec doxorubicin-hydrochloridu: $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$

Molekulová hmotnost doxorubicin-hydrochloridu: M_r 579,99 [20]

2.2.2.2. Mechanismus účinku

Přesný mechanismus cytotoxického a antiproliferativního působení doxorubicinu není v současné době znám. Experimenty prokazují, že doxorubicin obdobně jako některá další cytostatika (př. epirubicin, idarubicin, mitoxantron, amsakrin, aktinomycin D) je schopen interkalace, která je podmíněna planární

molekulou těchto sloučenin. Interkalací rozumíme zasunutí molekuly cytostatika mezi páry bazí DNA, kde se v úsecích obsahujících guanin váže vodíkovými můstky. Výsledkem je inhibice replikace, transkripce a následné proteosyntézy. Ovšem koncentrace doxorubicinu nutné k uplatnění antiproliferativních účinků prostřednictvím těchto mechanismů se zdají být poněkud vyšší než jsou koncentrace dosažitelné v místě tumoru za klinických podmínek.

Při protinádorovém působení doxorubicinu se může uplatňovat též inhibiční účinek na topoizomerázu II. DNA topoizomerázy jsou nukleární enzymy, které mají zásadní význam pro hladký průběh replikace. Dvojspirála DNA prodělává torzi kolem vlastní osy, jež by vedla k „překroucení“ šroubovice a ke zlomu v řetězci. Topoizomeráza II vytváří komplex s oběma řetězci dvojspirály DNA a působí jejich přerušování a vzápětí opětovné spojení. Při blokádě její funkce nedochází k opětovnému spojení rozštěpených řetězců, čímž lze vysvětlit vznik zlomů v řetězci DNA při podání interkalačních látek. Tento účinek byl pozorován při koncentraci doxorubicinu, které je v rozmezí klinické léčebné dávky.

Na cytotoxickém působení doxorubicinu se může podílet také působení kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály vznikají po podání antracyklinů nejméně dvěma mechanismy. Při redukci chinonového kruhu vzniká semichinon, který reakcí s kyslíkem poskytuje superoxid. Druhou možností je vznik komplexu s ADP a železitými ionty. Tento komplex reaguje s kyslíkem za vzniku perferoxylového komplexu, který se rozpadá za uvolnění peroxidu vodíku. Kyslíkové radikály působí pak poškození nejrůznějších intracelulárních struktur (mitochondrií, sarkoplazmatického retikula) a buněčné membrány a jsou odpovědné za peroxidaci lipidů. Tímto mechanismem se vysvětluje též kardiotoxicita antracyklinů – viz kapitolu 2.2.2.5. Nežádoucí účinky.

Za protinádorový účinek doxorubicinu může být odpovědná též vazba cytostatika na bílkoviny a fosfolipidy buněčné membrány. Narušuje se tak struktura i funkce buňky, což vede k inhibici proliferace [16, 18, 19, 21].

2.2.2.3 Indikace

Spektrum nádorů citlivých k doxorubicinu je značně široké. V hematologii je doxorubicin součástí kombinací k léčbě nehodgkinských lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastové a myeloidní leukémie. Ze solidních nádorů patří mezi indikace karcinom prsu, ovaria, osteosarkom, sarkomy měkkých tkání, malobuněčný bronchogenní karcinom aj. [16, 21].

2.2.2.4. Dávkování a způsob aplikace

Dávkovací schéma doxorubicinu závisí na celkovém zdravotním stavu nemocného, způsobu aplikace a indikaci. Dávkování se dále liší dle léčebného režimu, ve kterém je lék používán (monoterapie, kombinace s jinými cytostatiky, kombinace chemoterapie, chirurgie a případně radioterapie a hormonální terapie).

Při intravenózním podání se dávka doxorubicinu vypočítává na základě plochy tělesného povrchu. V případě léčby solidních nádorů doxorubicinem v monoterapii je doporučená dávka 60-75mg/m² každé tři týdny, event. 10-20mg/m² každý týden (při tomto časovém harmonogramu by mohla být toxicita doxorubicinu nižší). Dávkování je nutné snížit u starších osob, osob s nízkým počtem leukocytů, event. dojde-li k poruše funkce jater. V terapii akutních leukemií se využívá různých schémat účinné kombinované chemoterapie. V této situaci je doporučená dávka doxorubicinu 75-90mg/m² (rozdělená do tří aplikací v průběhu tří po sobě následujících dnů = jeden cyklus) s minimálním intervalem deseti dnů mezi cykly. Z důvodu prevence kardiotoxicity by celková kumulativní dávka doxorubicinu neměla překročit 550mg/m².

Doxorubicin podávaný intravezikálně může být použit v léčbě superficiálních tumorů močového měchýře nebo v profylaxi recidiv nádorů po transuretrální resekci. Doporučená dávka doxorubicinu při lokálním intravezikálním podání je 30 až 50 mg ve 25-50 fyziologického roztoku (optimálně 1,0 mg/ml) v intervalech od jednoho týdne do jednoho měsíce podle toho, zda se jedná o podávání terapeutické nebo profylaktické. Celková resorpce doxorubicinu po intravezikální aplikaci je velmi nízká.

Během léčby je nutné přísné sledování pacienta s pečlivými kontrolami řady tělesných funkcí (krevní obraz, jaterní funkce, kardiální funkce). Na základě výsledků těchto testů je dávkování doxorubicinu upravováno. [21]

2.2.2.5. Farmakokinetika

Resorpce doxorubicinu z gastrointestinálního traktu neprobíhá. Protože jde o léčivo s mimořádným iritačním účinkem na tkáň, musí být podáváno intravenózně [21].

Na základě rychlého počátečního plazmatického poločasu (5 – 10 minut) a hodnot distribučního objemu v ustáleném stavu (20–30 l/kg) je zřejmé, že se doxorubicin rychle distribuuje do extravaskulárních kompartmentů. Přibližně ze 75% se

váže na bílkoviny krevní plazmy. V detekovaném množství neproniká hematoencephalickou bariérou [21].

Doxorubicin je metabolizován ve značném rozsahu, a to hlavně játry [21]. Biotransformace doxorubicinu se ubírá primárně cestou redukce karbonylové funkční skupiny. Hlavním metabolitem doxorubicinu je 13-doxorubicinol, který má ve srovnání s mateřským léčivem nižší stupeň protinádorové účinnosti [22, 23]. Na tvorbě 13-doxorubicinolu se podílí převážně aldehydreduktasa (EC 1.1.1.2) a karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184) [24, 23]. Redukce karbonylu vede ke zvýšení polaridy molekuly, což usnadňuje její vyloučení. Exkreci může předcházet konjugace 13-doxorubicinolu s glukuronovou kyselinou nebo glutathionem [22].

Biotransformace doxorubicinu zahrnuje také hydrolytické a redukční štěpení glykosidické vazby, při němž vznikají ve vodě málo rozpustné aglykony doxorubicinu a 13-doxorubicinolu a deoxyformy aglykonů. K odštěpení aminocukru dochází v mikrosomech působením NADPH-dependentní cytochrom P450 reductasy [21, 25, 26]. Chinonový skelet doxorubicinu podléhá dvou-elektronové redukci na hydrochinon. Tato reakce je katalyzována cytosolickou NAD(P)H-quinonreduktasou [27]. Za přítomnosti flavinových enzymů (tj. cytochrom P450 reductasa, NOS, NADH-dehydrogenasa) dochází k jedoelektronové redukci, při níž je tvořen reaktivní semichinon. Ten reaguje s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu $O_2^{\cdot-}$, přičemž se regeneruje chinon. Tento děj představuje jeden z mechanismů vzniku kyslíkových radikálů, které jsou hlavní příčinou kardiotoxicity antracyklinů [23, 28, 29]. Na vývoji kardiomyopatie se podílí rovněž metabolit 13-doxorubicinol, proto redukci karbonylu v poloze 13 postranního řetězce doxorubicinu nelze z globálního pohledu považovat za detoxifikační reakci [30, 31].

Řada studií naznačuje, že zvýšení biotransformace doxorubicinu v nádorové tkáni by mohl být jeden z mechanismů vzniku nádorové rezistence [2, 3].

Liposomální doxorubicin obsahuje doxorubicin v pegylovaných liposomech, tj. stabilizovaných vrstvou polyethylenglykolu. Tím je zaručeno pomalejší uvolňování účinné látky a její menší toxicita, při čemž protinádorová účinnost je zachována. Klinické zkušenosti ukázaly přesvědčivé léčebné výsledky u Kaposiho sarkomu, u karcinomu prsu, prostaty a ovaria. Výhodou přípravku je omezená kardiotoxicita a nižší myelotoxicita [18].

2.2.2.6. Nežádoucí účinky

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem doxorubicinu je kardiotoxicita. Etiopatogeneze kardiotoxicity je multifaktoriální. Antracykliny poškozují membránu myocytů, což má za následek zvýšený influx kalcia do buňky. Navíc inhibují koenzym Q₁₀, poškozují metabolismus karnitinu a působí depleci selenu. Patrně nejvýznamnějším faktorem je tvorba kyslíkových radikálů, které poškozují nejrůznější intracelulární struktury a vedou k degeneraci a zániku myocytu. Vzhledem k tomu, že je tkáň myokardu chudá na antioxidační enzymy (superoxiddismutasu, glutathionreduktasu), projeví se toxický účinek kyslíkových radikálů především zde [18]. Rozlišujeme kardiotoxicitu akutní, chronickou a pozdní. Akutní kardiotoxicita je přechodná, objevuje se bezprostředně po první dávce (během 24 hodin) a projevuje se arytmiemi a změnami na EKG. Obecně se nepovažuje za indikaci k ukončení léčby doxorubicinem. Chronická kardiotoxicita se projevuje kardiomyopatií, která může vést ke vzniku městnavé srdeční slabosti. Riziko vzniku městnavé srdeční slabosti prudce vzrůstá při překročení celkové kumulativní dávky 550 mg/m². Klinicky se manifestuje náhle (během prvního roku léčby, nejčastěji v průběhu 1-2 měsíců po poslední dávce) a rychle progreduje. Je poměrně rezistentní na léčbu. Pozdní kardiotoxicita se může manifestovat po více letech až desetiletích (4-20 let) od ukončení léčby. Projevuje se poruchami vodivosti a tachyarytmiemi. Poškození myocytů a dysfunkce komor mívá za následek pozdní dekompenzaci srdce. Tento typ kardiotoxicity byl popsán zejména u dětí, a to i v případech, kdy nebyla překročena celková kumulativní dávka. K prevenci kardiotoxicity doxorubicinu se používá dexrazoxan, který intracelulárně chelatuje ionty železa, čímž brání vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. Dexrazoxan podaný při zahájení léčby doxorubicinem (30 min pře cytostatikem) v poměru 10:1 nebo 20:1 statisticky významně snížil častost projevů kardiotoxicity u žen s pokročilým karcinomem prsu ve srovnání s placebo-skupinou (14-15% vs. 31%). Závažnému kardiálnímu poškození lze předejít pravidelným sledováním v průběhu léčby a následným dlouhodobým monitorováním po skončení chemoterapie [16, 18, 21].

Z dalších projevů toxicity je třeba uvést myelosupresi s neutropenií, případně trombocytopenií, závislou na dávce cytostatika. Obvykle se objeví za 7-10 dní a odeznívá do 19-24 dnů [16, 21]. K její prevenci je možno použít podpůrnou terapii – viz tab 2.

Mukozitida (především stomatitida, méně často ezofagitida) bývají častěji následkem dlouhodobější i.v. infúze. Léze v dutině ústní bývají spojovány

s vylučováním doxorubicinu do slin. Emetogenní účinek (ve 30-40 % případů) řadí antracykliny mezi střední až silné emetogeny. Nauzeu a zvracení lze podstatně zmírnit až odstranit antagonisty serotoninových (5-HT₃) receptorů. Vliv na trávicí ústrojí se může projevit anorexií, průjmy, event. tenezmy a záněty střevní sliznice [16, 21].

Alopecie (v 90-100% případů) je spojena s významnou ztrátou vlasů počínaje třetím týdnem po první dávce doxorubicinu. V současnosti není k dispozici žádný prostředek, kterým by bylo možno tomuto časnému vlivu zabránit [16, 21].

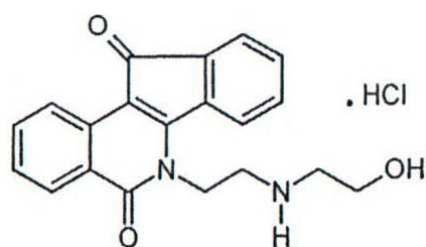
Ostatními projevy toxicity jsou tzv. recall fenomén, tj. zvýšené riziko postradiačních lézí (i obnova dříve vyhojených) v exponované oblasti v důsledku předchozí nebo současné radiační terapie, azoospermie a amenorea. Vzácněji se objevují hyperpigmentace, epidermolýza, artralgie [16, 21].

2.2.3. Oracin

2.2.3.1. Obecné vlastnosti a chemická struktura

Oracin je potenciální cytostatikum, v současné době ve druhé fázi klinického zkoušení. Byl syntetizován ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii v Praze.

Chemicky se jedná o 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno [1,2-*c*]isochinolin [32]. Oracin je látka oranžové barvy. Rozpustnost ve vodě je zvýšena tvorbou soli, využívá se hydrochlorid oracinu.



Obr. 2. Strukturní vzorec oracin-chloridu [32]

Sumární vzorec oracin-hydrochloridu: C₂₀H₁₉ClN₂O₃

Molekulová hmotnost oracin-hydrochloridu: Mr = 370,85.

2.2.3.2. Mechanismus účinku

Oracin zasahuje do řady buněčných pochodů, čímž je podmíněno jeho cytostatické působení proti širokému spektru nádorů. Vzhledem ke své planární molekule má oracin (obdobně jako antracyklinová antibiotika) schopnost interkalace, vedoucí k inhibici replikace a transkripce DNA a následnému snížení množství proteinů

v nádorových buňkách [33]. V testech *in vitro* byl zjištěn vliv oracinu na aktivitu topoizomerázy II (EC 5.99.1.3) izolované z EAC buněk (Ehrlich ascites carcinoma). K téměř 100% inhibici topoizomerázy II dochází při koncentracích oracinu 5-15 $\mu\text{mol/l}$ dle délky expozice [34]. Studie s buněčnou linií Burkittova lymfomu nasvědčuje tomu, že oracin působí jako inhibitor mitózy, pravděpodobně zásahem do G2-fáze buněčného cyklu [35]. Navíc oracin stimuluje aerobní spotřebu glukózy, v menší míře i tvorbu laktátu v nádorových buňkách a indukuje apoptózu (programovanou smrt buňky) [33].

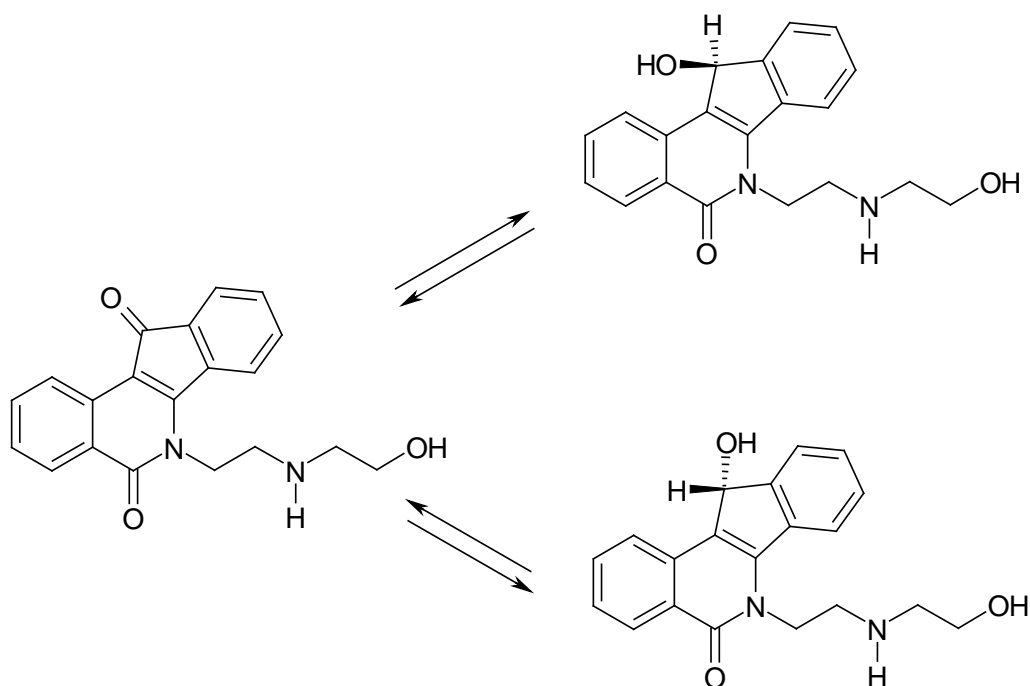
2.2.3.3. Potenciální indikace

Oracin potlačuje růst širokého spektra nádorů. V testech *in vitro* byl prokázán přímý cytotoxický účinek vůči buňkám pěti zvířecích tumorů. Protinádorové působení oracinu bylo dále zkoumáno v *in vivo* studiích na myších a potkanech při perorálním a parenterálním způsobu podání. Bylo použito deset rozdílných experimentálních nádorových modelů. Podání oracinu vedlo k prodloužení délky života potkanů s Zoshida retikulosarkomem a myši se sarkomem S37, leukemií L1210 a P388, Gardner lymfosarkomem a Ehrlicio karcinomem. V případě Gardner lymfosarkomu bylo dosaženo u většiny pokusných jedinců dlouhodobé remise již po první perorální dávce oracinu. Tyto výsledky byly ověřeny s pěti lidskými nádory v obdobných studiích [33].

Výhodou oracinu je možnost perorálního podání, kombinace několika mechanismů účinku (viz 2.2.3.2.), negativní výsledky Ames testu na mutagenitu [36], absence kardiotoxicity [37] (což je hlavní faktor limitující dávkování antracyklinů), velmi nízká hepatotoxicita a příznivá farmakokinetika (rychlá absorpce po perorálním podání a rychlá eliminace).

2.2.3.4. Biotransformace

V návaznosti na stanovení biologické účinnosti a řady výhodných vlastností oracinu byla intenzivně zkoumána biotransformace tohoto potenciálního cytostatika. *In vitro* a *in vivo* studie odhalily, že hlavním metabolitem oracinu u běžných laboratorních druhů zvířat (myš, potkan, morče, králík, pes) [38, 39, 40] i v lidské jaterní tkáni [41] je 11-dihydrooracin (DHO), 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin. Tento chirální metabolit vzniká redukcí prochirální karbonylové skupiny v pozici C11 molekuly oracinu. Viz Obr. 3.



Obr. 3. Redukce oracinu vedoucí ke vzniku (+)-DHO a (-)-DHO [42]

Redukce oracinu u všech sledovaných druhů probíhala v cytosolické i mikrosomální frakci. Inkubace oracinu s jaterními mikrosomy a následně cytosolem potkanů ukázala, že větší množství DHO je tvořeno za anaerobních podmínek a za použití NADP(H) jako kofaktoru [43, 44]. Na základě indukčních a inhibičních studií byly identifikovány konkrétní enzymy redukující oracin v jednotlivých frakcích. V jaterních mikrosomech potkanů se na biotransformaci oracinu podílí převážně 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 (11 β -HSD1, EC 1.1.1.146) a dále v menší míře cytochrom P4501A [45]. 11 β -HSD1 je mikrosomální enzym odpovědný za reversibilní oxidoredukci glukokortikoidů a vzhledem ke schopnosti katalyzovat redukcí nesteroidních karbonylových sloučenin hraje důležitou roli v detoxifikaci řady xenobiotik [83, 84]. Následující studie s purifikovanou 11 β -HSD1 izolovanou z jaterní tkáně myši [46] a z lidské jaterní tkáně [47] potvrdily klíčovou úlohu 11 β -HSD1 v redukcí oracinu v mikrosomech. Rozdíly ve stereospecifitě (uvedeno níže) a kinetice reakce při použití celé mikrosomální frakce a purifikované 11 β -HSD1 nasvědčují, že na redukcí oracinu v mikrosomech se podílí ještě další enzym [46]. Hlavním enzymem odpovědným za tvorbu DHO v jaterním cytosolu potkanů byla na základě citlivosti ke quercitrinu (99% inhibice) stanovena karbonylreduktasa (CBR, EC 1.1.1.184) [45]. CBR jsou cytosolické enzymy se širokou substrátovou specifikou. Katalyzují redukcí

řady endogenních (prostaglandiny, steroidy) a exogenních (polycyklické aromatické uhlovodíky) karbonylových sloučenin. V lidském jaterním cytosolu byla prokázána účast aldo-ketoreduktasy 1C1(AKR1C1), v menší míře pak AKR1C2, AKR1C4, na redukci oracinu [42]. Jedná se o cytosolické enzymy označované též jako 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasy (EC 1.1.1.213). Endogenními substráty AKR1C1-4 jsou pohlavní hormony [58]. Kvantitativní rozdíly v tvorbě (+) a (-)-DHO při použití celé cytosolické frakce a purifikovaných AKR1C1-4 (uvedeno níže) dokazují existenci dalšího enzymu, katalyzujícího redukci oracinu v cytosolu lidské jaterní tkáni [42].

Redukce oracinu vede k tvorbě (+)-DHO a (-)-DHO. Stereospecifita redukce oracinu (tj. přednostní tvorba jednoho z enantiomerů) se u jednotlivých živočišných druhů může lišit. V případě myši, potkana a psa vzniká větší množství (+)-DHO, zatímco u morčete a králíka převládá (-)-DHO [40]. V lidském organismu je tvořeno přibližně stejné množství obou enantiomerů, ačkoli stereospecifita redukce oracinu v jaterním cytosolu a mikrosomech je rozdílná. V cytosolu je tvořeno 88-90% (+)-DHO, zatímco poměr enantiomerů v mikrosomech je vyrovnaný [41]. Purifikace enzymů redukujících oracin v lidské jaterní tkáni umožnila určit stereospecifitu těchto enzymů. Cytosolické AKR1C vykazují značnou stereospecifitu tvorby DHO. AKR1C1 vytváří 97% (+) enantiomeru, AKR1C2 a AKR1C4 pak téměř 100% [42]. V případě mikrosomální 11 β -HSD1 vyniká (+) a (-)-DHO v poměru 24:76 [47].

2.3. REDUKTASY KARBONYLU

2.3.1. Obecná charakteristika a klasifikace

Karbonyl redukující enzymy hrají důležitou roli v metabolismu mnoha endogenních i exogenních aldehydů a ketonů. Katalyzují oxidoredukční přeměny steroidů, prostaglandinů, monosacharidů a mastných kyselin, ovlivňují řadu dalších biologických procesů - odpověď organismu na stres, neurotransmisi, mutagenezi, karcinogenezi a podílí se na detoxifikaci xenobiotik [24, 48, 50, 51, 52, 53]. Redukce karbonylu xenobiotik, jakožto první fáze jejich biotransformace, vede k tvorbě příslušných alkoholů. Tyto polárnější metabolity jsou následně vyloučeny, event. jejich exkreci předchází konjugace (druhá fáze biotransformace). Jedná se o ochranný mechanismus organismu před potenciale nebezpečnými exogenními látkami. V případě léčiv je ovšem do jisté míry nežádoucí, jelikož redukce karbonylu vede

převážně k inaktivaci léčiva (př. warfarin, haloperidol) [48]. Při chemoterapii je zvýšená aktivita příslušných redukčních enzymů v nádorových buňkách jednou z příčin vývoje nádorové rezistence [2, 3]. Na druhé straně, pokud redukcí karbonylu vznikají aktivní metabolity, dochází k prodloužení účinku parentního léčiva (naltrexon, naloxon, pentoxifilin) či k aktivaci proléčiva (propranolol, alprenol, metyrapon, chloralhydrát) [48, 52]. Z těchto důvodů je v současnosti prováděna řada studií se snahou objasnit metabolické cesty léčiv a zároveň vliv léčiv na aktivitu biotransformačních enzymů. Neméně důležité jsou studie zaměřené na identifikaci karbonyl redukujících enzymů, které se podílí na rozvoji patologických stavů, a následný vývoj specifických inhibitorů. Potenciálními cílovými strukturami se jeví jednak enzymy účastníci se endogenního metabolismu (např. 3α -HSD, 17β -HSD katalyzující aktivaci pohlavních hormonů u hormon-dependentních forem nádorů prsu a prostaty; aldosareduktasa podílející se na vzniku komplikací diabetu; 11β -HSD typ 1 katalyzující aktivaci glukokortikoidů při metabolickém syndromu) a dále enzymy patogenních agens (např. pteridinreduktasa *Leishmania* sp.; β -ACPreduktasa (beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase), enoyl-ACPreduktasa *M. tuberculosis*; trihydroxynaftalenreduktasa *Magnaporthe grisea*) [50, 54].

Karbonyl redukující enzymy byly postupně identifikovány v mnoha tkáních a u široké škály živočišných druhů, proto byl často identický enzym označen několika čísly enzymového nomenklaturního systému – viz tab. 4 a 5.

Na základě struktury proteinů (vycházející ze sekvence genů) jsou dnes enzymy redukující karbonyl členěny do čtyř nadrodin: dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR, medium-chain dehydrogenases/reductases), aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR, short-chain dehydrogenases/reductases) a chinonreduktasy [50]. Přehled lidských karbonyl redukujících enzymů je uveden v následující tabulce – viz tab. 3.

Tab. 3. Některé vlastnosti lidských karbonyl-redukujících enzymů [52]

Nadrodina	Počet izoenzymů	Počet amk	Lokalizace	Kofaktor	Komponenty aktivního místa
MDR	7	370	Cytosol	NADH	Zn, His Scr
AKR	13	280-320	Cytosol	NAD(P)H	Tyr, Asp, Lys, His
SDR	39	270	Cytosol Mikrosomy Mitochondrie	NAD(P)H	Tyr, Lys, Ser
Chinon-reduktasy	2 (NQO1, NQO2)	280	Cytosol	NAD(P)H (NQO1) RNH ¹ (NQO2)	FAD, His, Tyr

¹ RNH, dihydronicotinamid riboside

2.3.2. Aldo-ketoreduktasy (AKR)

2.3.2.1. Obecná charakteristika a nomenklatura

Nadrodinu AKR tvoří NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy, které jsou zapojeny v řadě biologických procesů. Byly nalezeny u obratlovců, bezobratlých, rostlin, prvoků, hub, eubakterií a archebakterií, což naznačuje, že se jedná o prastarou nadrodinu enzymů [55]. AKR jsou převážně monomerní enzymy o 320 aminokyselinových zbytcích [55]. Jako multimery se vyskytují enzymy rodin AKR2, AKR6 a AKR7 [56]. Typickým strukturním znakem AKR je $(\alpha/\beta)_8$ soudek. V molekule AKR byly nalezeny tři konzervativní sekvence. Sekvence LxxxGxxxPxxGxG se nachází na N-konci proteinu, sekvence GxxxxDxAxxY (obsahující konzervativní Asp a Tyr) a LxxxxxxxxDxxxxH (obsahující konzervativní His) pak obě v aktivním centru enzymu. Dále se v aktivním místě vyskytuje neměnný Lys [55]. Aktivní místo AKR tedy obsahuje katalytickou tetradu Tyr (55), Lys (84), Asp (50), His (117) – pozice aminokyselin konkrétně pro AKR1C9 (3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa z jaterní tkáně potkana) [56]. V primární struktuře existuje řada dalších homologních míst vyskytujících se u více než poloviny AKR.

Označování AKR se řídí nomenklaturním systémem navrženým Jezem a Penningem v roce 2001. Obecný formát názvu obsahuje symbol ‚AKR‘, arabskou číslici označující rodinu, písmeno indikující podrodinu a arabskou číslici pro jednotlivý enzym. Systém je založen na porovnávání sekvence aminokyselin, přičemž v rámci rodiny je požadována 40% shoda v aminokyselinové sekvenci, v rámci podrodiny pak 60%. Při více než 97% shodě v sekvenci aminokyselin se předpokládá, že se jedná o

alely téhož genu. Výjimkou jsou případy, kde mají enzymy odlišnou enzymatickou aktivitu, jsou kódovány cDNA obsahující odlišný 3'-untranslated region (UTR) nebo mají příslušné geny různou strukturu a/nebo odlišnou chromozomální lokalizaci. Pokud je u dvou různých organismů identifikována shodná sekvence aminokyselin je k názvu AKR připojeno malé písmeno [55]. V případě multimerů je doporučeno uvést složení a stechiometrii (např. AKR7A1 : AKR7A4 (1:3) označuje tetramer daného složení) [56]. Pro odlišení proteinu a genu, jsou názvy genů psány kurzívou.

Nadrodina AKR v současnosti obsahuje 153 proteinů v 15 rodinách [56]. Před zavedením nomenklaturního systému založeného na porovnávání aminokyselinové sekvence byly AKR označovány dle substrátové specifity – viz Tab. 4. Tímto způsobem mohlo být jednomu enzymu přiděleno více názvů, což vedlo ke vzniku nejasností.

Tab. 4. Alternativní názvy některých členů nadrodiny AKR [55]

Rodina/podrodina/enzym	Alternativní název	EC no.
AKR1A1-3	Aldehyde reductase	1.1.1.2
AKR1B1-6	Aldose reductase	1.1.1.21
AKR1C1	20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD)	1.1.1.149
	Dihydrodiol dehydrogenase 1 (DD1)	1.3.1.20
AKR1C2	3 α -HSD typ III	1.1.1.213
	DD2	1.3.1.20
AKR1C3	3 α -HSD typ II	1.1.1.213
	DDx	1.3.1.20
	17 β -HSD typ V	1.1.1.62
AKR1C4	Chlordecone reductase	1.1.1.125
	3 α -HSD typ I	1.1.1.213
	DD4	1.3.1.20
AKR1D1-3	Δ^4 -3-ketosteroid-5 α -reductase	1.3.99.6
AKR1E	Mouse liver keto-reductase	
AKR2B	Xylose reductase	
AKR4A	Chalcone polyketide reductase	
AKR4B2-3	Codeinone reductase	1.1.1.247
AKR5C-E	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	1.1.1.125
AKR6	Shaker channel β -subunit	
AKR7	Aflatoxin aldehyde reductase	
AKR8	Pyridoxal reductase	

2.3.2.2. AKR1C3

Enzymy AKR1C jsou NADPH-dependentní cytosolické monomerní oxidoreduktasy. Humání AKR1C vykazují 86% shodu v sekvenci aminokyselin, přesto jednotlivý členové mají odlišné biochemické vlastnosti. Mezi substráty lidských AKR1C patří steroidní hormony, prostaglandiny, trans-dihydrodioly polycyklických aromatických uhlovodíků, žlučové kyseliny a řada endogenních a xenobiotických aldehydů a ketonů [57]. Spolu s enzymy z nadrodiny SDR regulují množství aktivních steroidů v cílových tkáních vzájemnou přeměnou aktivních a neaktivních forem. Steroidní hormony zasahují do řady buněčných procesů (reprodukce, vývoj, homeostáza) prostřednictvím genové transkripce (vazbou na jaderné receptory) nebo ovlivněním dalších signálních kaskád v buňce (modulace receptoru spřaženého s iontovým kanálem – GABA-A rcp, receptorů spjatých s G-proteinem, tyrozinkinas...). AKR1C se podílejí též na katabolismu steroidů v játrech. Spolu s 5 α - a 5 β -reduktasami katalyzují tvorbu 5 α / β -3 α / β -tetrahydrosteroidů, které následně podléhají konjugaci a jsou vyloučeny. Enzymy patřící do podrodiny AKR1C jsou pluripotentní a jejich fyziologická role je dána tkáňovou specifikou a dostupností substrátů v dané tkáni [58].

AKR1C3 je primárně exprimována v prsní tkáni a prostatě, dále pak v játrech, plicích, tenkém střevě, nadledvinách, mozku, děloze a varlatech [57, 59, 60].

Tento enzym byl poprvé popsán jako 3 α -HSD typ II a je identický s 17 β -HSD typ V, DDX a prostaglandin F_{2 α} syntázou. AKR1C3 vykazuje převážně 17 β -HSD aktivitu, katalyzuje redukci androstendionu na aktivní testosteron v prostatě ($k_{cat}/K_M = 42 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) a estronu na aktivní 17 β -estradiol v prsní tkáni. 3 α -HSD aktivita AKR1C3 je podstatně nižší, k_{cat}/K_M pro redukci aktivního dihydrotestosteronu na 3 α -androstanediol je $6 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (tuto reakci v prostatě katalyzuje hlavně AKR1C2). AKR1C2 a 1C3 mají tedy důležitou funkci v regulaci hladiny androgenů v prostatě a AKR1C3 též v regulaci hladiny estrogenů v prsní tkáni. Jelikož androgeny hrají roli při vzniku rakoviny prostaty a benigní hyperplazie prostaty a zvýšená hladina 17 β -estradiolu je spojována s vývojem rakoviny prsu, zdá se, že inhibitory AKR1C3 by mohly představovat alternativní terapii těchto chorob [58].

AKR1C3 vykazuje 11-ketoreduktasovou aktivitu a katalyzuje tak redukci PGD₂ na PGF_{2 α} . PGD₂ je chemicky nestabilní a za normálních okolností podléhá neenzymatické přeměně na PGJ₂ a následně na 15-deoxy- $\Delta^{12, 14}$ prostaglandin J₂ (15 Δ -PGJ₂). 15 Δ -PGJ₂ je přirozeným ligandem jaderného receptoru PPAR γ

(peroxisome proliferator-activated receptor- γ). AKR1C3 prostřednictvím změny katabolismu PGD₂ ve prospěch PGF_{2 α} působí jako supresor buněčné diferenciaci regulované přes jaderné receptory. Tuto funkci AKR1C3 objasnil Desmond a spol., který zjistil, že zvýšená exprese AKR1C3 v HL-60 buňkách (buněčná linie myeloidní leukemie) vede ke snížení buněčné diferenciaci navozené přirozenými induktory diferenciaci (all-trans reinoic acid = ATRA; 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃). Dále ověřil, že inhibitory AKR1C3, popř. nadbytek PGD₂ nebo PGJ₂, navozují zvýšení ATRA indukované diferenciaci, která je opět utlumena po přidání antagonisty PPAR γ (GW 9662). Dle těchto údajů by AKR1C3 mohla představovat potenciální cíl při léčbě nádorového bujení [61].

Inhibitory AKR1C3 by mohly najít uplatnění při léčbě hormon-dependentních forem rakoviny prostaty, prsu, endometria a dalších nádorových onemocnění, jak již bylo řečeno výše. V současné době jsou využívány při inhibičních studiích pro odlišení AKR1C3 od dalších karbonyl redukujících enzymů. Mezi inhibitory AKR1C3 řadíme α -methylskořicovou kyselinu (inhibice enzymů podrodiny AKR1C) a NSAID (př. indometacin, flufenamová kyselina) [62].

2.3.3. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

2.3.3.1. Obecná charakteristika

SDRs tvoří početnou, funkčně heterogenní nadrodinu enzymů. Účastní se metabolismu řady eobiotik i xenobiotik. Konkrétní funkce některých enzymů nebyla doposud objasněna. Většina enzymů je řazena dle EC klasifikace mezi oxidoreduktasy, ale SDR nadrodina obsahuje též lyasy a izomerasy [63]. Vyskytují se v cytosolu, mikrosomech i mitochondriích. Byly nalezeny u prokaryot i eukaryot, včetně člověka [48].

V současnosti je popsána primární struktura více než tři tisíc a terciární struktura cca 30 členů této nadrodiny [54]. SDR obsahují okolo 250 - 350 aminokyselinových zbytků. Shoda v sekvenci aminokyselin jednotlivých členů SDR nadrodiny je nízká, 15-30%, což svědčí o časném oddělení během evoluce. Společným strukturním znakem SDR je Rossmannův záhyb (s centrálním β -listem obklopeným α helixem), který je součástí vazebného místa kofaktoru. Rossmannův záhyb obsahuje sekvenci Gly(X)₃GlyXGly vyskytující se na N-konci proteinu přibližně v pozici 12 (všechna konkrétní čísla jsou vztažena k 3 β /17 β -HSD). Tato sekvence spolu se sekvencí Asn-

Asn-Ala-Gly okolo pozice 86-89 udržují strukturu centrálního β -listu, která je nezbytná pro vazbu kofaktoru. Na samotné interakci s kofaktorem se pak podílí konzervativní aminokyselinové zbytky: Asp(60), Ala(88), Thr(188) and pravděpodobně Pro nebo Gly z Pro-Gly motivu okolo pozice 180. V aktivním centru SDR se nachází vysoce konzervativní tetráda tvořená aminokyselinovými zbytky Asn(111)-Ser(139)-Tyr(152)-Lys(156) [54, 63]. Na základě specifických sekvenčních motivů byly SDR rozděleny do pěti rodin: Classical, Extended, Intermediate, Divergent a Complex. Dle struktury koenzym-vázajícího místa jsou classical SDR členěny dále do sedmi podrodin a extended SDR do třech podrodin [64].

SDR jsou NAD(P)H-dependentní enzymy. Většina enzymů rodiny classical SDR využívá NADP(H), zatímco NAD(H) je preferován enzymy z rodiny extended SDR [64].

Významnými členy SDR nadrodiny jsou karbonylreduktasy (CBR) a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11 β -HSD). Alternativní názvy těchto enzymů jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5. Alternativní názvy CBR a 11 β -HSD [52]

Enzym	Alternativní název	EC no.
CBR	Xenobiotic ketone reductase with pH 6,0 activity Prostaglandin 9-ketoreductase Human placental NADP-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	1.1.1.184
11 β -HSD	11 β -reductase 11-oxoreductase	1.1.1.146

2.3.3.2. Karbonylreduktasy (CBR)

Karbonylreduktasy (sekundární alkohol:NADP⁺ oxidoreduktasy, EC 1.1.1.184) patří na základě své struktury do nadrodiny SDR. CBR jsou NADPH-dependentní, většinou monomerní, cytosolické enzymy s širokou substrátovou specifitou. Katalyzují redukci karbonylové skupiny prostaglandinů, steroidů, pterinů, biogenních aminů, chinonů odvozených od polycyklických aromatických uhlovodíků a řady léčiv (např. antracyklinů). CBR zprostředkovávají hlavně redukční reakce, které jsou v mnoha případech ireverzibilní. Ale umožňují též oxidaci sekundárních alkoholů a hydrochinonů s využitím NADP⁺ [24].

Pro odlišení CBR od dalších karbonyl redukujících enzymů jsou používány aromatické ketony jako substráty nebo specifické inhibitory. Mezi inhibitory CBR patří flavonoidy (rutin, quercetin, quercitrin), indomethacin, furosemid a disulfiram [24].

CBR byly detekovány u mnoha organismů od bakterií, kvasinek, rostlin, hmyzu a ryb až po savce (např. člověk, králík, potkan, myš, morče, opice, prase, pes). Byly purifikovány z řady tkání zahrnující játra, plíce, srdce, ledviny, mozek, varlata, vaječníky a nadledvinky [24].

CBR aktivita v nádorové tkáni byla popsána jen v několika málo studiích. Nejvýhodnější je porovnání aktivity CBR v nádorové a normální tkáni od jednoho jedince. Schlager a Powis měřili CBR aktivitu v nádorové i normální tkáni získané z prsu, střeva, ledviny, jater, plic a žaludku. Nádorová tkáň střeva ($n = 24$) a plic ($n = 31$) vykazovala 3krát a 6krát vyšší průměrnou CBR aktivitu. Nebyla zjištěna souvislost mezi aktivitou CBR a užíváním alkoholu či nikotinu [65]. Lopez de Cerain a spol. provedli párové studie na CBR aktivitu pro nádor plic ($n = 17$) a prsu ($n = 12$). V normální plicní tkáni byla průměrná CBR aktivita 15,2 nmol/min/mg s rozmezím 2,1 – 47,9. Průměrná CBR aktivita v nádorové tkáni byla 50 nmol/min/mg s rozmezím 10,7 – 248. Patnáct vzorků nádorové tkáně plic (88%) vykazovalo zvýšení CBR aktivity oproti normální tkáni. Nebyla nalezena statisticky významná korelace mezi histologickým typem nádoru a CBR aktivitou. CBR aktivita v nádorové tkáni prsu byla zvýšena oproti normální tkáni v sedmi vzorcích (tj. 58%). Ani zde nebyla nalezena souvislost mezi CBR aktivitou a histologickým typem nádoru či přítomností progesteronových nebo estrogeních receptorů [66].

CBR redukuje 13-keto-antracykliny na 13-hydroxysloučeniny, které mají nižší protinádorový efekt [23, 24]. Ax a spol. zjistili, že nádorové buňky rezistentní k daunorubicinu (selektce rezistentních buněk bylo dosaženo růstem buněk při postupně se zvyšující koncentraci daunorubicinu) mají zvýšenou hladinu mRNA pro enzymy redukující karbonylovou skupinu (aldosareduktasa, dihydrodiolreduktasa, CBR). Nejsilnější indukční vliv byl zaznamenán u CBR, 60% nárůst mRNA. Přídavek verapamilu do kultivačního média inhiboval zvýšení exprese P-glykoproteinu a MRP (multidrug resistance associated protein), které jsou odpovědné za eflux daunorubicinu. Na základě těchto dat bylo navrženo, že rezistence k daunorubicinu byla vyvolána zvýšením exprese CBR [3].

Forrest a Gonzales zkoumali účast CBR na vývoji kardiotoxicity po podání antracyklinů s využitím transgenních myší, které vykazovaly zvýšenou expresi lidské

CBR. Tvorba doxorubicinolu (doxol) po podání doxorubicinu (dox) byla u transgenních myší výrazně rychlejší a celkové množství léčiva v srdeční tkáni bylo 4krát vyšší u transgenních myší (převážně ve formě doxol) ve srovnání s kontrolními (převážně dox). Zvýšení hladiny sérové kreatinkinasy po jednorázovém podání dox u transgenních myší o 60% oproti kontrolním naznačuje, že zvýšená exprese CBR vede ke zvýšenému poškození srdeční svaloviny (akutní kardiotoxicita). Tyto závěry byly potvrzeny analýzou srdeční tkáně pod elektronovým mikroskopem (ve vzorcích získaných z transgenních myší, kterým byl podán dox, byla patrná degenerace myofibril). Dlouhodobé podávání dox vedlo u transgenních myší k úmrtí po pěti týdnech, zatímco kontrolní myši přežívaly 12 týdnů. Tyto výsledky korespondují se snížením T vlny na EKG u transgenních myších po čtyřech týdnech, na rozdíl od kontrolních variant, u kterých došlo k rozšíření T vlny, ale nikoli snížení. Pitvou byla odhalena dilatace síně a tekutina v hrudní dutině u transgenních myší, což potvrzuje, že příčinou smrti bylo městnavé srdeční selhání. Tato data ukazují, že lidské CBR hrají důležitou roli ve vývoji akutní i chronické kardiotoxicity po podání antracyklinů [24].

2.4. NÁDOROVÁ REZISTENCE

2.4.1. Definice

Důležitý faktor limitující úspěšnost chemoterapie je rezistence. Rezistenci lze definovat jako primární necitlivost nebo druhotnou ztrátu citlivosti nádorových buněk k cytostatiku. U normálních buněk se rezistence k chemoterapii nevyvíjí. Pro vzácné případy snížené citlivosti (rezistence) normálních buněk k cytostatiku (při zachovalé citlivosti maligních buněk) se vyhrazuje termín selektivní toxicita, která by naopak byla velmi žádoucí.

Maligní buněčné populace mohou být vůči chemoterapii rezistentní již při první léčbě. V tomto případě jde o tzv. přirozenou rezistenci. Přirozená (primární) rezistence je většinou relativní, tj. nádorové buňky určitého histopatologického typu jsou necitlivé na některá cytostatika (např. karcinom mammy na aktinomycin D), kdežto jiné typy nádorů jsou na stejné cytostatikum citlivé (Wilmsův nádor).

Získaná (sekundární) rezistence vzniká až v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost cytostatické léčby se snižuje. Při ztrátě citlivosti k určitému cytostatiku může však být zachována citlivost k jiným

cytostatikům. Zkřížená rezistence je zvláštní případ rezistence, kdy při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká současně rezistence na jiné, většinou strukturálně příbuzné cytostatikum. Neplatí to však absolutně, protože v některých případech nejeví ani velmi příbuzná cytostatika zkříženou rezistenci (vinblastin – vinkristin), a naopak byly popsány případy zkřížené rezistence mezi cytostatiky lišícími se jak strukturálně, tak i mechanismem účinku. Takový typ rezistence se označuje jako pleiotropní (mnohočetná) léková rezistence (multidrug resistance, MDR). MDR vysvětluje případy necitlivosti některých nádorů k alternativním léčebným režimům, obsahujícím nové druhy cytostatik nepoužitých v původní léčbě [67].

2.4.2. Mechanismus vzniku

Mechanismu vzniku rezistence bývá komplexní povahy. Nejčastěji je vázán na změny farmakokinetiky, změny cytokinetiky buněčné populace a metabolické a funkční změny buňky [67].

Změny farmakokinetiky jsou nejméně významné. Je to např. snížená resorpce cytostatika, rychlejší biotransformace nebo urychlené vylučování [67].

Změny cytokinetiky nastávají s narůstající populací nádoru, kdy větší část buněk přechází do klidového stavu G_0 , v němž je citlivost k chemoterapii omezená. S přibývajícím velikostí buněčné populace nádoru vznikají spontánní mutace buněk, jež jsou příčinou vzniku rezistentních buněčných klonů. Léčba totiž zničí jen citlivou frakci buněk a dochází k selekci rezistentní populace [67].

Nejčastěji rezistenci způsobují strukturální nebo funkční změny buňky. Může být snížená koncentrace či aktivita enzymů nutných pro konverzi cytostatika na účinnou látku. Tak např. merkaptopurin musí být aktivován pyrofosfatase na merkaptopurin ribonukleotid. Buňky s nízkou koncentrací pyrofosfatasy jsou k merkaptopurinu rezistentní [67].

Jindy může rezistenci způsobit zvýšená koncentrace enzymů. Tento jev je důsledkem zvýšení exprese příslušného genu (tzv. transkripční mechanismus enzymové indukce), snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA (netranskripční mechanismy enzymové indukce) [68]. Důležitou roli v indukci exprese genů, které se přímo podílejí na biotransformaci xenobiotik, hrají nukleární receptory PXR (Pregnane X receptor) a CAR (Constitutive androstane receptor). PXR a CAR náleží do „ligandem aktivované“ rodiny transkripčních faktorů. Bývají označovány jako sirotčí (orphan)

nukleární receptory, protože na rozdíl od dalších zástupců nukleárních receptorů (př. receptor pro vitamin D, glukokortikoidní receptor, estrogenní receptor) nebyl dosud identifikován fyziologický ligand, který by primárně působil prostřednictvím PXP nebo CAR. Mezi exogenní ligandy PXP patří i některá cytostatika (př. paclitaxel) [69]. Bylo zjištěno, že v buňkách rezistentních na methotraxát je až 20krát vyšší koncentrace dihydrofolátreduktasy. Za této situace je aktivita enzymu blokována cytostatikem nedostatečně a buňka se stává rezistentní. Často je rezistence způsobena zvýšenou koncentrací glutathionu v buňce, který na sebe váže cytostatika a působí jejich inaktivaci [67, 70]. Na vzniku rezistence vůči antracyklinům (ANT) se podílí zvýšená inaktivace těchto cytostatik prostřednictvím redukčních enzymů. Bylo zjištěno, že přidávání postupně se zvyšující subletální koncentrace daunorubicinu do živného média lidských buněk karcinomu pankreatu (senzitivních a rezistentních linií) vede k indukci reduktas ANT-karboxylu ve všech subcelulárních frakcích. Bez antracykliny navozené indukce nebyla redukce v mikrosomální frakci vůbec detekovatelná. Ze srovnání koncentračně závislé enzymové indukce mezi liniemi senzitivních a rezistentních buněk vyplynulo, že senzitivní buňky jsou až do koncentrace 0,1 µg/ml ANT vnímavější vůči ANT-indukci. Vysvětlením může být fakt, že rezistentní buňky využívají i jiné mechanismy k eliminaci intracelulárních ANT (P-gp...), zatímco senzitivní buňky jsou závislé na inaktivaci prostřednictvím redukce karboxylu. Při koncentraci 1 µg/ml ANT už senzitivní buňky vykazovaly morfologické alterace a sníženou životaschopnost, zatímco v rezistentních buňkách dosahovala inaktivace ANT maxima [2].

Může být též porušena intracelulární distribuce cytostatika vazbou na lyzosomy, nebo je omezen průnik cytostatika buněčnou membránou. Rezistenci působí rovněž zvýšená intenzita opravy DNA [67].

Zvláštním mechanismem vzniká mnohočetná léková rezistence (MDR). MDR je způsobena nahromaděním fosfoglykoproteinu – glykoproteinu P (P-gp, p 170) v buněčné membráně, což má za následek urychlené vypuzování cytostatika z buňky. P-gp patří do rodiny tzv. transportérových proteinů ABC (ATP-binding cassette), které fyziologicky chrání buňky před toxiny zevního prostředí jejich aktivním vypuzením z buňky. P-gp je produktem genu lokalizovaného na 7. chromosomu (MDR-gen). Exprese MDR-genu je u různých druhů nádorů různě vyjádřená. Nejvyšší bývá u kolorektálních karcinomů a u karcinomů jater, ledvin a pankreatu. Pro určení amplifikace MDR-genu existuje řada molekulárně biologických metod, které umožňují odhadnout stupeň rezistence nádoru k plánované chemoterapii [67, 71]. Do rodiny ABC

proteinů patří rovněž MRP (multidrug related protein, p190). Výrazně zvýšená amplifikace MRP-genu byla zjištěna u bronchogenního karcinomu, karcinomu štítné žlázy a karcinomu prsu, což vedlo k rezistenci nádorů vůči chemoterapii. Rezistenci k etopozidu, vinkristinu a daunorubicinu působí nadměrná exprese TAP (transporter of antigenic peptides), rovněž z rodiny ABC proteinů [67, 70].

Tab 6. Výskyt MDR u jednotlivých cytostatik [67, 71]

MDR častá	MDR vzácná
Aktinomycin D	Bleomycin
Daunorubicin	Karmustin
Doxorubicin	Chlorambucil
Etopozid	Cisplatina
Mitoxantron	Cyklofosfanid
Taxol	Cytosin arabinosid
Tenipozid	5-fluorouracil
Trimetrexát	Ifosfamid
Vinblastin	Melfalan
Vinkristin	6-merkaptopurin
Vindesin	Methotrexát
	Topotekan

Na vzniku rezistence se může podílet též LRP (lung resistance protein, p110) patřící do skupiny zvané MVP (major vaults proteins). „Vaults“ jsou dutá ribonukleoproteinová tělíška v jádře a vezikulách cytoplazmy zprostředkovávající transport různých látek z jádra do cytoplazmy a mimo buňku. Vysoká koncentrace LRP byla zjištěna v buňkách karcinomu kolorekta, ledviny a pankreatu a vysvětluje malou citlivost těchto nádorů k chemoterapii [67, 70].

Rezistence může být způsobena též zvýšenou koncentrací proteinu bcl-2, který je mohutným inhibitorem apoptózy. Přítomnost bcl-2 sice neblokuje průnik cytostatika do buněk, ani poškození DNA cytostatikem, ale buňky nezanikají a po odeznění účinku cytostatika mohou opět proliferovat [67].

Rezistence k chemoterapii se přisuzuje též alteraci genů z rodiny p53 [67]. Protein p53 (produkt tumor supresorového genu p53) je transkripční faktor, jehož exprese je aktivována poškozením DNA. Protein p53 zablokuje buněčný cyklus do doby, než je poškození DNA reparováno. Selže-li reparační proces, p53 indukuje apoptózu [72].

2.4.3. Možnosti omezení rezistence

Ze současných znalostí mechanismů vzniku rezistence lze odvodit některé zásady, jejichž dodržáním můžeme alespoň částečně čelit vzniku rezistence. Zejména je nutno zajistit účinnou koncentraci cytostatika v cílové tkáni, zahájit léčbu co nejdříve, dodržovat intervaly podávání chemoterapie tak, aby léčba neposkytla časový prostor pro vznik mutací, podávat současně cytostatika s rozdílnými mechanismy účinku a kombinace cytostatik během léčby střídat. Některé typy rezistence lze ovlivnit též farmakologicky – viz Tab. 7 [67].

Tab 7. Některé látky používané k překonání rezistence nádorových buněk k chemoterapii [67]

Látky omezující rezistenci	Předpokládaný mechanismus účinku	Prokázaná účinnost
Verapamil Nifedipin Prenylamin Trifluoperazin Dexniguldipin Cyklosporin A PSC-833 VX-710	Kompetice s P-gp a omezení MDR	Vinkristin Vinblastin Doxorubicin Podofylotoxiny
Buthionin sulfoximin	Inhibice glutathionu	Melfalan, cisplatina
Afidicolin, β -lapachol	Inhibice DNA polymerasy, inhibice ligas (= inhibice opravy DNA)	Cisplatina, alkylační látky
Amfotericin B	Nejasný, snad vliv na permeabilitu membrán	Daktinomycin
Tamoxifen, reserpin	nejasný	antracykliny

Rezistenci způsobenou nahromaděním P-gp lze omezit pomocí chemosenzitorů (MDR modulátorů) – látek obnovujících vnímavost MDR buněk k protinádorové léčbě (viz tab 7) [67, 71]. MDR modulátory kromě přímé vazby na P-gp zasahují do metabolismu lipidů – v MDR rezistentních buňkách blokuje konverzi ceramidů na glykosylceramidy. Glykosylceramidy jsou prekurzory pro syntézu glykosfingolipidů a podílí se i na regulaci buněčné proliferace. Naopak ceramidy mohou aktivovat transkripční faktory – nukleární faktor kappa B (NF- κ B) a aktivátor proteinu-1 (AP-1). Mají tedy klíčovou úlohu v signalizaci apoptózy. Na základě těchto pozorování autoři konstatují, že zvýšená schopnost některých nádorových buněk konvergovat toxické

ceramidy na netoxické glykosylceramidy a následná přítomnost zvýšeného množství glykosylceramidů v buňce jsou rozhodujícími činiteli MDR [73, 74].

3. CÍL PRÁCE

1. Zjistit vliv doxorubicinu a oracinu na aktivitu redukčních enzymů podílejících se na metabolizaci těchto cytostatik v cytosolu buněk MCF-7 linie.

2. Určit konkrétní reductasy karbonylové skupiny doxorubicinu a oracinu v cytosolu MCF-7 buněk využitím specifických inhibitorů.

3. Stanovit expresi genů vybraných reductas v buňkách ovlivněných cytostatiky a v buňkách kontrolních.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Buněčná linie MCF-7 - A. M. Soto, C. Sonnenschein (Tufts University, Boston, MA)

Doxorubicin - Pharmacia (Upjohn, Itálie)

Doxorubicinol – Toronto Research Chemical Inc. (North York, Ontario, Kanada)

Oracin, (+)-DHO, (-)-DHO - VÚFB (Praha, ČR)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) pufr, set pro stanovení bílkovin s BCA (bicinchonic acid), NADPH, α -methylskořicová kyselina, quercitrin, DMSO (dimethylsulfoxid) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

FBS (fetal bovine serum), gentamicin sulfát – Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

BSA (bovine serum albumin) – Fluka (Prague, ČR)

RNeasy® Mini Kit – Qiagen GmbH, Hilden, Německo

TaqMan® Gene Expression Assay – Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

Běžné chemikálie čistoty p.a.

4.2. POMŮCKY A PŘÍSTROJE

Pomůcky:

Sterilní kultivační lahve, sterilní pipety, elektrický pipetník, sterilní pasterky , kádinky, automatické pipety, sterilní pipetovací špičky, Petriho misky, Bürkerova komůrka, špachtle, mikroskopavky, nádoba na led, centrifugační kyvety, stojánek na kyvety, mikrotitrační destička, multikanálové pipety, stopky, vialky, inserty, rukavice, váženka, navažovací kopistka

Přístroje a zařízení:

laminární box - BioAir AURA 2000 M.A.C.

mikroskop - Nikon Eclipse TS 100

CO₂ inkubátor – HeraCell

vodní lázeň - Memmert

zamrazovací kontejner - NALGENE, Sigma C1562

mrazicí box (-80°C) - HeraFreeze

analytické váhy - Scaltec SBC 22
centrifuga - Heraeus Biofuge Stratos
ultrazvukový homogenizátor - Sonopuls Bandelin HD 2070
ultracentrifuga - Sorvall OTD Combi - rotor TST 60.4
čtečka absorbance - Biorad Microplate Reader 550
inkubátor - Eppendorf Thermomixer Comfort
třepačka - IKA MS2 Minishaker
centrifuga - Eppendorf 5810R
koncentrátor - Eppendorf Concentrator 5301
ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex
kapalinový chromatograf - HP 1100 series LC systém (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)
PCR cykler – LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)

4.3. METODIKA PRÁCE

4.3.1. Kultivace buněčné linie MCF-7

Buněčná linie MCF-7 je transformovaná buněčná linie z lidského karcinomu prsu. Buňky byly kultivovány v DMEM s obsahem fenolové červeně a NaHCO_3 . Kultivační médium bylo obohaceno 5% inaktivovaného FBS (inaktivace séra se provádí při 57 °C po dobu 30 min) a 10 mM HEPES. Z důvodu dlouhodobější kultivace bylo do kultivačního média přidáno antibiotikum gentamicin (5 ml/l média). Médium bylo sterilizováno bakteriální filtrací.

Pasážování buněčné linie bylo prováděno 2x týdně v pondělí (1:19) a v pátek (1:14). V případě potřeby byly buňky zamrazeny v 10% DMSO.

Pasážování adherentních buněk (MCF-7 linie)

Pasážováním dochází k naředění konfluentních buněk tak, aby měly dostatek místa pro další dělení. K požadovanému dílu (tj. ředění) buněk v kultivační lahvi se přidává kultivační médium.

Postup:

Po uzavření byla kultivační lahev vyndána z inkubátoru a bylo slito médium. Buňky byly 2krát opláchnuty sterilním pufrem PBS (při kultivaci v lahvích 75 cm² –

2krát cca 6 ml, při kultivaci v lahvích 25 cm² - 2krát cca 4 ml). Tímto byl odstraněn vápník, což je nezbytné pro správnou funkci enzymu trypsin-EDTA (T-E) (čím lépe opláchnuté buňky, tím kratší je enzymatické působení a úspěšnější pasáž). Dále byl sterilně přidán T-E (0,25%, 37°C), dávkování opět záviselo na velikosti lahve (lahvev 75 cm² – 1 ml, lahvev 25 cm² – 0,5 ml). Kultivační lahve byla uzavřena, kýváním bylo docíleno rovnoměrného rozprostření T-E na dně lahve. Po přenesení lahve do termostatu probíhalo enzymatické uvolňování adherentních buněk zhruba po dobu 5 minut. Mikroskopicky bylo možné kontrolovat stav buněk. V okamžiku, kdy měla většina buněk kulovitý tvar, resp. vytvářela suspenzi – byly buňky prudkým pohybem setřepány do spodní části lahve.

V co nejkratší době bylo sterilně přidáno médium předeřáté na 37°C (do lahve 75 cm² - cca 4 ml, do lahve 25 cm² - cca 2 ml), čímž bylo zastaveno působení T-E. Buněčná suspenze byla zhomogenizována opakovaným nasátím a vypuštěním z pipety. Rychlé setřepání a přidání média zpravidla zabránilo vzniku shluků buněk – v ideálním případě by byla získána jednobuněčná suspenze.

Část buněčné suspenze byla ponechána v kultivační lahvi (př. při pasáži 1:14, byla v lahvi ponechána 1/15 buněčné suspenze), zbytek bylo možné využít pro experimenty. K buňkám v lahvi bylo přidáno kultivační médium, množství média záviselo na velikosti lahve (pro kultivaci v 75 cm² lahvích byl výsledný objem cca 13 ml, pro 25 cm² lahve 5 ml). Kýváním byly buňky rovnoměrně rozprostřeny po dně kultivační lahve, lahve byla umístěna do inkubátoru a byl povolen uzávěr.

Zamražení buněčné linie pro dlouhodobé uchování v tekutém dusíku

Při zamrazování se buněčná suspenze obohatí o sérum FBS (10%) a DMSO (10%) a podrobí se gradientovému zmrazování (-1°C/min). Po zmražení je možno buňky dlouhodobě uchovávat v tekutém dusíku.

Postup:

Buňky v suspenzi získané pasáží byly naředěny tak, aby v 1,2 ml média byl počet buněk odpovídající cca 80-90% konfluenci na ploše 25 cm², tj. cca 3-5 mil/ml. Buněčná suspenze se napipetuje po 1,2 ml do připravených a popsanych zamrazovacích zkumavek o objemu 1,5 ml. Při zamrazování buněk kultivovaných v 75 cm² lahvi, bylo možno při 80-90% konfluenci zamrazit cca 3 ampule.

Následně bylo přidáno 150 µl sterilního FBS a nakonec 150 µl sterilního DMSO. Zamrazovací zkumavka byla uzavřena a buněčná suspenze několikrát

promíchána (DMSO je toxické, důkladným promícháním se dosáhne 10% roztoku v celém objemu zkumavky – 150 μ L/1,5 ml).

Ihned po přidání FBS a DMSO byly zkumavky umístěny do zamrazovacího kontejneru, který byl naplněný isopropanolem. Kontejner byl co nejrychleji umístěn do mrazícího boxu (-80°C), kde probíhá gradientové zamrazování.

Nejdříve za 2 hodiny (obvykle druhý den) bylo možno zamražené buněčné suspenze ve zkumavkách přenést do tekutého dusíku pro dlouhodobé uchování.

Rozmražení buněčné linie dlouhodobě uchované v tekutém dusíku

Postup:

Do připravené kultivační lahve 25 cm² bylo napipetováno sterilně 8 ml kultivačního média. Opakovaně bylo pipetou nabíráno médium z kultivační lahve a přidáváno opatrně do zkumavky, tím docházelo k rychlému tání a současnému ředění buněk. Následně byla rozpuštěná suspenze postupně přenesena do kultivační lahve. Buněčná suspenze byla v kultivační lahvi protřepáním zhomogenizována a následně umístěna do termostatu.

Po adherenci buněk (min. za 6 hodin, resp. druhý den) bylo vyměněno médium a následovala rutinní kultivace.

4.3.2. Expozice buněk MCF-7 linie vybraným cytostatikům

Pro zjištění vlivu doxorubicinu a oracinu na aktivitu redukčních enzymů účastnících se metabolismu těchto cytostatik v cytosolu buněk MCF-7 linie byly buňky kultivovány v přítomnosti výše uvedených cytostatik.

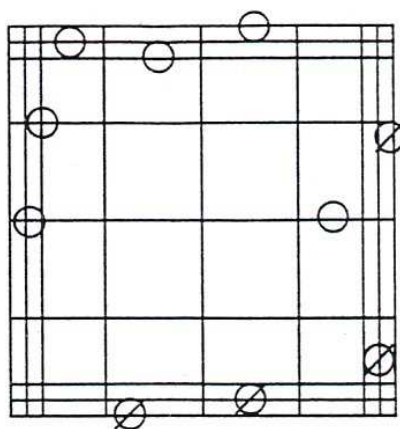
Koncentrace cytostatik a délka expozice byly určeny na základě výsledků testu cytotoxicity (Neutral Red uptake test) prováděného na katedře biochemických věd FAF UK Janou Hladíkovou. Tento test je založen na schopnosti zdravých buněk hromadit ve svých lysozomech vitální barvivo neutrální červeň. Při fyziologickém pH je toto barvivo neutrální a pasivně prostupuje buněčnou membránou. Lysozomy udržují pH nižší než okolní cytoplazma. Neutrální červeň vstupující do lysozomu získává náboj, a proto neprostupuje zpět do cytoplazmy. Udržování protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobí zvýšení propustnosti membrány a uvolnění zadržené neutrální červeně.

Testy cytotoxicity byly zopakovány pro ověření citlivosti buněk MCF-7 linie a následně zvolena 48 hodinová expozice při koncentracích cytostatik: 50 nM doxorubicin, 100 nM oracin.

Postup:

Před vlastní expozicí byly buňky nasazeny do Petriho misek (\varnothing 60 mm). Na jednu Petriho misku je doporučeno nasatit 400 tisíc buněk ve 4 ml média. Pomocí Bürkerovy komůrky byla zjištěna koncentrace buněk v buněčné suspenzi získané pasážováním a následně byla suspenze naředěna kultivačním médiem DMEM na požadovanou koncentraci.

Před nanesením buněčné suspenze do Bürkerovy komůrky byla suspenze naředěna 10krát (20 μ l buněčné suspenze + 180 μ l nesterilního PBS) a důkladně promíchána. Do každé poloviny komůrky byla napipetována naředěná suspenze ze samostatného odběru. Pod mikroskopem byly spočteny buňky ležící uvnitř deseti čtverců komůrky včetně těch buněk, které se dotýkaly horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců. Buňky na dolním a pravém rozhraní se nepočítaly – viz Obr. 4.



Obr. 4. Čtverec Bürkerovy komůrky o délce strany 1 mm. Počítají se buňky uvnitř čtverce a na horním a levém mezihraní (O), nepočítají se buňky na dolním a pravém mezihraní (\emptyset) [82].

Koncentrace buněk v neředěné suspenzi byla vypočtena dle vzorce:

$$C = \bar{x} \cdot 4 \cdot 10^4 \cdot 10$$

C..... počet buněk v 4 ml neředěné suspenze

\bar{x} průměrný počet buněk v 1 čtverci (tj. v 0,1 μ l)

$4 \cdot 10^4$...přepočet na 4 ml

10 zředění

Naředěná buněčná suspenze byla napipetována na sterilní Petriho misky po 4 ml a následovala 48 hodinová inkubace v termostatu.

Na základě testů cytotoxicity byla pro expozici zvolena koncentrace doxorubicinu 50 nM a oracinu 100 nM. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky cytostatik (3,448 mM vodný roztok doxorubicinu, 4 mM vodný roztok oracinu). Zásobní roztoky byly naředěny kultivačním médiem na potřebnou koncentraci (250 nM roztok doxorubicinu, 500 nM roztok oracinu). Ke 4 ml média v Petriho misce byl přidán 1 ml expozičního média, čímž bylo dosaženo výsledných koncentrací cytostatik. V kontrolních variantách byl přidán 1 ml kultivačního média. Následovala 48 hodinová inkubace v termostatu.

Byly provedeny dva nezávislé pokusy (A, B). Materiál z pokusu A byl použit pro následující biotransformační studie s oracinem, materiál z pokusu B pro studie s doxorubicinem.

4.3.3. Příprava cytosolu

Pro identifikaci redukčních enzymů účastnících se metabolismu oracinu a doxorubicinu v cytosolu a zjištění vlivu těchto cytostatik na aktivitu reduktas bylo nutné izolovat cytosolickou frakci z MCF-7 buněk kontrolních a exponovaných cytostatikům.

Principem přípravy subcelulárních frakcí je rozrušení buněčné struktury a následné oddělení cytosolu od mikrosomů frakční ultracentrifugací.

Postup:

Petriho misky s buňkami MCF-7 linie byly vyndány z inkubátoru a bylo z nich slito živné médium. Ihned po odstranění média byly misky položeny na drcený led a dvakrát opláchnuty 1,5 ml vychlazeného PBS pufru. Po odsátí PBS pufru bylo na

každou Petriho misku napipetováno 0,5 ml vychlazeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Buňky byly ze dna misek špachtlí seškrábnuty a vzniklá suspenze byla přenesena pipetou vždy ze dvou Petriho misek do jedné mikrozkušavky. Stojánek s popsanými mikrozkušavkami byl po celou dobu v ledové lázni. Mikrozkušavky byly uzavřeny a odstředěny v centrifuze Biofuge (250 g, 4°C, 10 min). Poté byl supernatant odsán pipetou a mikrozkušavky s buňkami byly zamrazeny na -80°C.

Před vlastní izolací cytosolu byly vzorky opět rozmrazeny (v chladícím boxu v ledové lázni). K peletě (sedimentu) bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Obsah mikrozkušavek byl resuspendován sonikací (do každé mikrozkušavky umístěné v ledové lázni byl na 25 s ponořen hrot ultrazvukového homogenizátoru Sonopuls asi 1 cm pod hladinu). Poté byly mikrozkušavky opět uzavřeny a centrifugovány v centrifuze Biofuge (20 000 g, 4°C, 20 min). Po stočení byl supernatant v chladícím boxu odpipetován do předem vychlazených kyvet pro ultracentrifugu Sorvall, vždy ze tří mikrozkušavek od dané varianty do jedné kyvety. Kyvety pak byly vloženy do pouzder a uzavřená pouzdra byla upevněna k rotoru ultracentrifugy Sorvall. Po ultracentrifugaci (105 000 g, 2°C, 67 min) byla pouzdra přenesena do chladícího boxu, byly z nich vyjmuty kyvety a supernatant (cytosol) rozpipetován po 300 µl do popsaných mikrozkušavek. Sediment na dně kyvety byl po přidání 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 s 20% (v/v) glycerolu sonikován. Resuspendovaná směs (mikrosomy) byla po 200 µl rozpipetována do popsaných mikrozkušavek.

Takto připravené cytosolické i mikrosomální frakce byly uchovávány v papírové krabičce za stavu hlubokého zmrazení při teplotě -80°C až do doby, kdy byly použity pro měření aktivity redukčních enzymů (v našem případě pouze enzymů cytosolických) a pro stanovení koncentrace bílkovin.

Cytosol byl izolován z MCF-7 buněk inkubovaných s doxorubicinem (50 nM), oracinem (100 nM) a z kontrolních MCF-7 buněk.

4.3.4. Stanovení koncentrace bílkovin

Aktivita enzymů je vždy vztahována k určitému množství proteinů (větš. 1 mg), proto je nutné určit koncentraci bílkovin v připraveném vzorku cytosolu.

Byla použita metoda BCA stanovení bílkoviny.

Principem této metody je reakce proteinů s měďnatými ionty (Cu^{2+}) v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^+ ionty, které vytvářejí v prostředí o pH kolem 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninovou kyselinou). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu se proměřuje při vlnové délce 562 nm [75].

Koncentrace proteinů ve sledovaném vzorku byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Tato závislost je lineární a byla zjištěna proměřením absorbancí šesti připravených standardních roztoků o známé koncentraci bílkoviny. Jako standardní bílkovina byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Standardní roztoky byly připraveny z výchozího 1% roztoku BSA a destilované vody – viz Tab. 8.

Tab. 8. Složení roztoků pro kalibrační křivku.

Označení roztoku	Konc. BSA v roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	1% roztok BSA [μl]	Destilovaná voda [μl]
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Postup:

Každý vzorek cytosolu byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:3 a 1:5. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 10 μl vzorku bílkovin (naředěný cytosol či standardní roztoky pro kalibrační křivku). U slepého vzorku bylo místo bílkovin nanášeno 10 μl destilované vody. Každá varianta byla nanášena v triplicátu, v případě kalibrační přímky v tetraplikátu. Dále byl do jamek nanášen pracovní roztok C, který byl připraven v čas potřeby smícháním komerčně dodávaných roztoků A a B v poměru 50:1.

- Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Po promíchání složek v jamkách byla destička 30 minut inkubována při 37°C. Hodnoty absorbance byly změřeny při 562 nm na čtečce Biorad, Microplate Reader, model 550 (použit filtr číslo 3). Jako nulová absorbance byla na přístroji nastavena hodnota absorbance destilované vody. Výsledná hodnota absorbance byla průměrem z 3

(4) naměřených hodnot, od nichž byla odečtena průměrná absorbance slepého vzorku. Při výpočtu výsledné koncentrace proteinů ve vzorcích cytosolu byla použita získaná rovnice kalibrační přímky a zohledněno předchozí zředění vzorku.

4.3.5. Inkubace cytosolu s oracinem

Oracin je redukčními enzymy konvertován na 11-dihydrooracin (DHO) [41]. Po inkubaci cytosolu s oracinem a koenzymem NADPH bylo zjišťováno množství DHO vzniklého během oxidoredukční reakce v reakční směsi za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Z množství vzniklého DHO byla stanovena specifická enzymová aktivita reduktas. Byly sestrojeny křivky závislosti specifické enzymové aktivity na koncentraci přidaného substrátu (oracinu) a vypočteny hodnoty V_{max} (maximální rychlost) a K_m (Michaelisova konstanta). Michaelisova konstanta vyjadřuje koncentraci substrátu, při které je rychlost reakce rovna polovině rychlosti maximální. Na základě získaných údajů byla porovnána aktivita reduktas v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky.

Postup:

Nejprve byl připraven zásobní roztok oracinu (15 mM vodný roztok) a postupným proředováním získána koncentrační řada: 15; 3; 1,5; 0,3; 0,15; 0,03 mM vodný roztok oracinu. V čas potřeby byl připraven 6 mM vodný roztok NADPH. Roztoky a cytosol byly během měření uchovávány v ledové lázni. Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z vodných 0,1 M roztoků Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 .

Reakční směs měla celkový objem 150 μ l. Složení inkubační směsi vyjadřuje následující tabulka.

Tab.9. Složení reakční směsi

Složení reakční směsi	
6 mM vodný roztok NADPH	25 μ l
Vodný roztok oracinu dané koncentrace (event. dest. voda pro slepý pokus 1)	50 μ l
Cytosol (event. pufr pro slepý pokus 2)	75 μ l

Do označených mikrozkušavek bylo nejprve napipetováno uvedené množství roztoku NADPH (výsledná koncentrace NADPH v reakci byla 1 mM). Poté byl přidán

roztok oracinu, vždy tři mikrozkušavky pro danou koncentraci oracinu (výsledná koncentrace oracinu v reakci byla 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mM). Směs byla preinkubována při teplotě 37°C cca 5 minut. Vlastní enzymová reakce byla odstartována přidáním 75 µl cytosolu a promícháním na vortexu (30 s interval). Následovala 60 minutová inkubace při 37°C. Inkubace byla ukončena přidáním 40 µl konc. amoniaku a ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni.

Následujícím krokem byla extrakce lipofilních látek ze směsi do octanu ethylnatého. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,9 ml octanu ethylnatého a poté byly mikrozkušavky 2 minuty intenzivně protřepávány na třepačce. Pro oddělení vodné a octanové fáze byly vzorky centrifugovány (5 000 otáček/min, 3 min). Horní octanová vrstva (800 µl) byla pipetou přenesena do označených vialek. Extrakty pak byly odpařeny v koncentrátoru do sucha (při 45°C asi 20 min). Suché vzorky byly uchovávány v chladu a temnu.

Před vlastním provedením HPLC analýzy byly vzorky rozpuštěny ve 250 µl mobilní fáze (pro rychlejší rozpuštění použit ultrazvuk) a poté přepipetovány do insertů. Mobilní fázi tvořila směs 10 mM hexansulfonanového pufru a acetonitrilu v poměru 3:1 v/v.

Pro kapalinovou chromatografii na přístroji Agilent 1100 byla použita kolona BDS Hypersil C18 (250 x 4 mm). Nástřik na kolonu byl 50 µl vzorku z celkového připraveného množství 250 µl. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 1,5 ml/min. Analýza probíhala za tlaku 19,5-20 MPa a při teplotě 25°C. Retenční čas DHO byl 2,6 min. Jednotlivé složky vzorku separované v koloně byly detekovány fluorescenčním detektorem (Ex 340 nm, Em 418 nm).

Pro inkubaci s oracinem byl použit cytosol z expozice A.

Množství DHO v [ng] stanovené v nastříkovaném objemu vzorku bylo (po korekci provedené na základě hodnot ze slepých vzorků) přepočteno na celých 250 µl a dále převedeno na nmol ($M_r(\text{DHO}) = 372,85 \text{ g/mol}$). Z množství DHO vytvořeného za 1 minutu byla stanovena enzymová aktivita, která byla vyjádřena v [pmol DHO/min], a specifická enzymová aktivita v [pmol DHO/min/mg bílkoviny]. Pro výpočet specifické enzymové aktivity bylo třeba stanovit koncentraci bílkovin v cytosolu.

Rozdíly v hodnotách enzymové aktivity a specifické enzymové aktivity cytosolu ovlivněného cytostatiky oproti kontrolnímu cytosolu byly statisticky zpracovány pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu s hladinou významnosti 0,05.

4.3.6. Inkubace cytosolu s doxorubicinem

Doxorubicin je redukčními enzymy konvertován na 13-doxorubicinol [22]. Po inkubaci cytosolu s doxorubicinem a koenzymem NADPH bylo zjišťováno množství doxorubicinolu vzniklého během oxidoredukční reakce v reakční směsi za využití HPLC. Z množství vytvořeného doxorubicinolu byla stanovena specifická enzymová aktivita reduktas. Byly sestrojeny křivky závislosti specifické enzymové aktivity na koncentraci přidaného substrátu (doxorubicinu) a vypočteny hodnoty V_{max} a K_m . Na základě získaných údajů byla porovnána aktivita reduktas v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky.

Postup:

Nejprve byla ze zásobního roztoku doxorubicinu (3,448 mM vodný roztok) postupným proředováním získána koncentrační řada: 3; 1,5; 0,75; 0,3; 0,15; 0,075; 0,03 mM vodný roztok doxorubicinu. V čas potřeby byl připraven 6mM vodný roztok NADPH . Roztoky a cytosol byly během měření uchovávány v ledové lázni. Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z vodných 0,1 M roztoků Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 .

Reakční směs měla celkový objem 150 μ l. Složení inkubační směsi vyjadřuje následující tabulka.

Tab.10. Složení inkubační směsi

Složení reakční směsi	
6 mM vodný roztok NADPH	25 μ l
Vodný roztok doxorubicinu dané koncentrace (event. dest. voda pro slepý pokus 1)	50 μ l
Cytosol (event. pufr pro slepý pokus 2)	75 μ l

Do označených mikrozkupek bylo nejprve napipetováno uvedené množství roztoku NADPH (výsledná koncentrace NADPH v reakci byla 1 mM). Poté byl přidán roztok doxorubicinu, vždy tři mikrozkupek pro danou koncentraci doxorubicinu (výsledná koncentrace doxorubicinu v reakci byla 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 mM). Směs byla preinkubována při teplotě 37°C cca 5 minut. Vlastní enzymová reakce byla odstartována přidáním 75 μ l cytosolu a promícháním na vortexu

(30 s interval). Následovala 60 minutová inkubace při 37°C. Inkubace byla ukončena přidáním 150 µl Na₂HPO₄ pH 8,4 a ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni.

Následujícím krokem byla extrakce lipofilních látek do směsi chloroformu a 1-heptanolu (9:1). Ke každému vzorku bylo přidáno 1,2 ml této směsi a poté byly mikrozkušavky 15 minut intenzivně protřepávány na třepačce. Pro oddělení vodné a organické fáze byly vzorky centrifugovány (5 000 otáček/min, 5 min). Spodní organická vrstva (1200 µl) byla pipetou přenesena do označených mikrozkušavek. Dále bylo přidáno 150 µl o-fosforečné kyseliny (pH 1,7) a 1 minutu intenzivně protřepáváno na třepačce. Horní fáze (cca 100 µl) byla přenesena do vialek s inzertem. Vzorky byly uchovávány v chladu a temnu a nejpozději druhý den byla provedena HPLC analýza.

Mobilní fázi tvořila směs 50 mM sodnofosfátového pufru (pH 4) a acetonitrilu v poměru 3:1 v/v. Pro kapalinovou chromatografii na přístroji Agilent 1100 byla použita kolona Supelco Discovery C18 (150 x 4 mm) a předkolona Supelco Discovery C18 (20 x 4 mm). Nástřik na kolonu byl 25 µl vzorku. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 1,5 ml/min. Analýza probíhala za tlaku 19,5-20 MPa a při teplotě 25°C. Jednotlivé složky vzorku separované v koloně byly detekovány fluorescenčním detektorem (Ex 480 nm, Em 560 nm).

Pro inkubaci s doxorubicinem byl použit cytosol z expozice B.

Výstupem HPLC analýzy při stanovování doxorubicinolu byla molární koncentrace [nmol/ml]. Bylo vypočteno látkové množství doxorubicinolu (nmol) v celkovém množství o-fosforečné kyseliny (150 µl). Z množství doxorubicinolu vytvořeného za 1 minutu (po korekci provedené na základě hodnot ze slepých vzorků) byla stanovena enzymová aktivita, která byla vyjádřena v [pmol/min], a specifická enzymová aktivita v [pmol/min/mg bílkoviny]. Pro výpočet specifické enzymové aktivity bylo třeba stanovit koncentraci bílkovin v cytosolu.

Rozdíly v hodnotách enzymové aktivity a specifické enzymové aktivity cytosolu ovlivněného cytostatiky oproti kontrolnímu cytosolu byly statisticky zpracovány pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu s hladinou významnosti 0,05.

4.3.7. Inkubace cytosolu s oracinem a inhibitorem

Oracin je redukčními enzymy přeměňován na 11-dihydrooracin [41]. Pro určení konkrétních enzymů podílejících se na metabolizaci oracinu v cytosolu MCF-7 buněk byly použity specifické inhibitory vybraných enzymů. Studie byla zaměřena na

cytosolické enzymy AKR1C3 a CBR1. Specifickým inhibítorem AKR1C3 je α -methylskořicová kyselina [62], CBR1 pak quercitrin [24].

Postup:

Nejprve byl připraven zásobní roztok oracinu (5 mM vodný roztok) a zásobní roztoky inhibitorů (500 mM roztok α -methylskořicové kyseliny v DMSO, 500 mM roztok quercitrinu v DMSO). Postupným proředování zásobních roztoků inhibitorů (nejprve ředit v DMSO, poté redestilovanou vodou, aby bylo zachováno stejné množství DMSO ve všech vzorcích) byly připraveny koncentrační řady: 12,5 mM – 0,05 μ M roztok inhibitoru. V čas potřeby byl připraven 10 mM vodný roztok NADPH. Roztoky a cytosol byly během měření uchovávány v ledové lázni. Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z vodných 0,1 M roztoků Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 .

Reakční směs měla celkový objem 150 μ l. Složení inkubační směsi vyjadřuje následující tabulka.

Tab.11. Složení reakční směsi

Složení reakční směsi	
10 mM vodný roztok NADPH	15 μ l
5 mM vodný roztok oracinu (event. dest. voda pro slepý pokus 1)	30 μ l
Roztok inhibitoru dané koncentrace (event. 2,5 % roztok DMSO pro neinhibovanou reakci)	30 μ l
Cytosol (event. pufr pro slepý pokus 2)	75 μ l

Do označených mikrozkuvek bylo nejprve napipetováno uvedené množství roztoku NADPH (výsledná koncentrace NADPH v reakci byla 1 mM), poté byl přidán roztok oracinu (výsledná koncentrace oracinu v reakci byla 1 mM). Nakonec byl vždy do třech mikrozkuvek napipetován roztok inhibitoru o dané koncentraci (výsledná koncentrace inhibitoru byla 2,5 mM – 0,01 μ M). Dále se postupovalo dle návodu pro inkubaci cytosolu s oracinem (viz kapitolu 4.3.5.).

Pro každý inhibitor a každou cytosolickou frakci (buňky ovlivněné 50 nM doxorubicinem, 100 nM oracinem a buňky kontrolní) byly provedeny 2 pokusy, první sloužil k odhadnutí afinity inhibitoru a enzymu (zvolen velký rozptyl koncentrací inhibitoru), druhý k podrobnějšímu prověření závislosti specifické enzymové aktivity na koncentraci inhibitoru (doplněny další koncentrace inhibitoru).

Rozdíly v hodnotách specifické enzymové aktivity cytosolu při použití inhibitorů a v případě neinhibované reakce byly statisticky zpracovány pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu s hladinou významnosti 0,05.

4.3.8. Inkubace cytosolu s doxorubicinem a inhibitorem

Doxorubicin je redukčními enzymy přeměňován na 13-doxorubicinol [22]. Pro určení konkrétních enzymů podílejících se na metabolizaci doxorubicinu v cytosolu MCF-7 buněk byly použity specifické inhibitory vybraných enzymů. Studie byla zaměřena na cytosolické enzymy AKR1C3 a CBR1. Specifickým inhibitorem AKR1C3 je α -methylskořicová kyselina [62], CBR1 pak quercitrin [24].

Postup:

Zásobní roztok doxorubicinu (3,448 mM vodný roztok) byl naředěn 50 mM fosfátovým pufrům na koncentraci 3 mM. Dále byly připraveny zásobní roztoky inhibitorů (500 mM roztok α -methylskořicové kyseliny v DMSO, 500 mM zásobní roztok quercitrinu v DMSO). Postupným proředováním zásobních roztoků inhibitorů byly získány koncentrační řady: 5 mM – 0,05 μ M vodné roztoky inhibitorů. Při ředění je nutné zajistit stejný obsah DMSO ve všech vzorcích. V čas potřeby byl připraven 7,5 mM vodný roztok NADPH. Roztoky a cytosol byly během měření uchovávány v ledové lázni. 0,1 M Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z vodných 0,1 M roztoků Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 .

Reakční směs měla celkový objem 150 μ l. Složení inkubační směsi vyjadřuje následující tabulka.

Tab.12. Složení reakční směsi

Složení reakční směsi	
7,5 mM vodný roztok NADPH	20 μ l
3 mM vodný roztok doxorubicinu (event. dest. voda pro slepý pokus 1)	25 μ l
Roztok inhibitoru dané koncentrace (event. 2,5 % roztok DMSO pro neinhibovanou reakci)	30 μ l
Cytosol (event. pufr pro slepý pokus 2)	75 μ l

Do označených mikrozkušavek bylo nejprve napipetováno uvedené množství roztoku NADPH (výsledná koncentrace NADPH v reakci byla 1 mM), poté byl přidán

roztok doxorubicinu (výsledná koncentrace doxorubicinu v reakci byla 0,5 mM). Dále byl přidán roztok inhibitoru, vždy do třech mikroskopických roztoků dané koncentrace (výsledná koncentrace inhibitoru byla 1 mM – 0,01 μ M). Dále se postupovalo dle návodu pro inkubaci cytosolu s doxorubicinem (viz kapitola 4.3.6.)

Pro každý inhibitor a každou cytosolickou frakci (buňky ovlivněné 50 nM doxorubicinem, 100 nM oracinem a buňky kontrolní) byly provedeny 2 pokusy, první sloužil k odhadnutí afinity inhibitoru a enzymu (zvolen velký rozptyl koncentrací inhibitoru), druhý k podrobnějšímu prověření závislosti specifické enzymové aktivity na koncentraci inhibitoru (doplněny další koncentrace inhibitoru).

Rozdíly v hodnotách specifické enzymové aktivity cytosolu při použití inhibitorů a v případě neinhibované reakce byly statisticky zpracovány pomocí neparametrického Mann-Whitney U-testu s hladinou významnosti 0,05.

4.3.9. Stanovení stereospecifity reduktas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk

Redukce prochirální karbonylové skupiny v poloze 11 postraního řetězce oracinu vede k tvorbě (+)-DHO a (-)-DHO [41]. Pro stanovení stereospecifity reduktas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk byla použita HPLC separace enantiomerů 11-dihydrooracinu. Byla zjišťována stereospecifita reduktas v cytosolické frakci kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky jednak bez použití specifických inhibitorů a dále při koncentracích inhibitorů, které již způsobovaly signifikantní pokles specifické enzymové aktivity (tj. 1, 10, 100, 500 μ M quercitrin, 1000 μ M α -metylskořicová kyselina).

Postup:

Při inkubaci cytosolu s oracinem, popř. s oracinem a inhibitorem bylo postupováno podle návodů uvedených v kapitole 4.3.5. a 4.3.7.

Před vlastním provedením HPLC analýzy byly získané vzorky rozpuštěny ve 250 μ l mobilní fáze (pro rychlejší rozpuštění použit ultrazvuk) a poté přepipetovány do insertů. Mobilní fázi tvořila směs 0,3M chloristanu sodného a acetonitrilu v poměru 69:31 v/v. Pro kapalinovou chromatografii na přístroji Agilent 1100 byla použita kolona Chiracel ODR (250 x 4,6 mm). Nástřik na kolonu byl 50 μ l vzorku z celkového připraveného množství 250 μ l. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,5 ml/min. Analýza probíhala za tlaku 4,7 MPa a při teplotě 25°C. Jednotlivé složky

vzorku separované v koloně byly detekovány fluorescenčním detektorem (Ex 340 nm, Em 418 nm).

Výstupem HPLC analýzy bylo množství jednotlivých enantiomerů v %.

4.3.10. Izolace celkové RNA

Nasazení buněk a expozice vybraným cytostatikům předcházející izolaci celkové RNA

Před vlastní expozicí byly buňky nasazeny do Petriho misek (\varnothing 60 mm). Koncentrace buněk byla 400 tisíc buněk/4 ml (tj. na 1 Petriho misku). Následovala 48 hodinová inkubace v termostatu. Poté se živné médium odsálo pasterkou a napipetovaly se 4 ml média s příslušným cytostatikem, resp. 4 ml čistého média pro kontrolní měření. Médium s požadovanou koncentrací cytostatika (50 nM doxorubicin, 100 nM oracin) bylo získáno ze zásobních roztoků cytostatik (1mM doxorubicin, 4mM oracin) postupným proředováním. Následovala 48 hodinová inkubace v termostatu. Každá varianta (buňky kultivované s doxorubicinem, oracinem, kontrolní buňky) byla připravena v triplikátu.

Izolace celkové RNA z buněk MCF – 7 linie

Při manipulaci s RNA je třeba pracovat opatrně a rychle, aby nebyla RNA kontaminována a následně inaktivována ribonukleasami. Ribonukleasy (RNasy) jsou velmi stabilní a vysoce aktivní enzymy nevyžadující kofaktory, které štěpí molekulu RNA. Proto je při práci s RNA důležité, aby byly všechny roztoky a materiál, které přijdou do styku se zpracovávaným vzorkem, zbaveny RNas. Ruce a prachové částice jsou nejčastějšími zdroji kontaminace, proto je nutné při manipulaci se vzorkem používat rukavice a často je vyměňovat [76].

Pro izolaci kompletní RNA z hepatocytů byl použit RNeasy® Mini Kit, postupovalo se dle přiloženého manuálu. Princip izolace spočívá v rozrušení buněčných membrán pomocí detergentů (guanidiniové soli), selektivním navázání RNA na silikagelovou membránu kolony a následném postupném promývání kolony specifickými pufrů. Přečištěná RNA je nakonec eluována RNase-free vodou. Tato izolační metoda je založena na faktu, že RNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch, zatímco ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a je

možno je odstranit odstředěním. RNA je pak snadno eluována z membrány přidáním vody či vhodného pufru bez chaotropních solí [77].

Vazebná kapacita použité kolony byla 100 µg RNA, čímž bylo limitováno množství počátečního materiálu, které nesmí přesáhnout $1 \cdot 10^7$ buněk (v 60 mm misce je cca $2,5 \cdot 10^6$ buněk). Při přeplnění kolony by došlo k snížení výtěžku a čistoty. Zachyceny jsou molekuly delší než 200 bazí.

Postup:

S ohledem na vazebnou kapacitu kolony byl pro izolaci RNA použit materiál vždy ze dvou Petriho misek od každé varianty – tj. 2 Petriho misky s buňkami inkubovanými s doxorubicinem, resp. oracinem a 2 Petriho misky s kontrolními buňkami.

Izolace RNA byla provedena za laboratorní teploty.

Před lýzou buněk bylo důkladně odsáto živné médium. Neodstraněné médium by znesnadňovalo lýzu buněk a ředilo lyzát, zároveň by negativně ovlivňovalo podmínky pro navázání RNA na membránu. Oba tyto jevy by snižovaly výtěžek RNA. Pro kompletní odstranění média byly buňky 2krát opláchnuty 1 ml roztoku PBS pufru.

Byla provedena přímá lýza buněk na Petriho misce - k buňkám bylo napipetováno 600 µl pufru RLT s přídavkem β-merkapt ethanolu (10 µl/ml pufru). Kýváním bylo dosaženo zakrytí celého povrchu monovrstvy. Po zgelovatění byly rozrušené buňky špachtlí seškrábnuty ze dna a lyzát (650 µl) byl přepipetován do mikrocentrifugační zkumavky. Promícháním na vortexu byly odstraněny viditelné buněčné shluky.

Vzorek byl zhomogenizován ultrazvukem. Z důvodu nalezení shluků ve vzorku byl dodatečně použit ultrazvukový trn. Nedokonalá homogenizace by vedla ke snížení výtěžků a ucpávání kolony.

K lyzátu byl přidán stejný objem (tj. 650 µl) 70% etanolu a obsah zkumavky byl promíchán pipetováním.

Na kolonku (pro každou testovanou variantu jedna kolonka) umístěnou ve 2 ml sběrné zkumavce bylo nanášeno 650 µl vzorku z dané varianty. Poté byly zkumavky jemně uzavřeny a provedena centrifugace (11 tis. rpm/15s). Tento postup byl zopakován ještě 3krát (na jednu kolonu bylo tedy nanášeno celkem 4krát 650 µl vzorku).

Sběrné zkumavky byly použity znovu v dalším kroku.

Na každou kolonku bylo napipetováno 700 μ l pufru RW1, proběhla centrifugace 15 s na 11 tis. rpm. Tento krok byl zopakován ještě jednou. V tomto kroku je eluována DNA.

Kolony byly přeneseny do nových 2 ml sběrných zkumavek. Na každou kolonu bylo pipetováno 500 μ l pufru RPE (před prvním použitím je nutno pufr RPE naředit ethanolom 96-100% v poměru 1:4). Následovala centrifugace 15 s na 11 tis. rpm. Sběrné zkumavky byly použity znovu v dalším kroku.

Na každou kolonu se napipetovalo dalších 500 μ l pufru RPE, centrifugovalo 2 min na 11 tis. rpm a poté 1 min na maximum, aby membrána vyschla.

Kolonky byly přeneseny do 1,5 ml sběrných zkumavek. Přímo na membránu bylo připipetováno 30 μ l RNase-free vody. Poté následovala centrifugace 1 min na 11 tis. rpm, při níž se eluovala RNA. Jelikož očekávaný výtěžek byl větší než 30 μ g, byla eluce 30 μ l RNasa free vody provedena do stejné sběrné zkumavky ještě jednou.

Tímto postupem bylo tedy získáno 60 μ l roztoku RNA od každého vzorku. Izolovaná RNA byla zmrazena při teplotě -80°C až do dalšího zpracování.

4.3.11. Kvantifikace mRNA metodou QRT-PCR

Pro kvantifikaci mRNA, která byla izolována z buněk MCF-7 linie ovlivněných cytostatiky a z buněk kontrolních, byla využita kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (QRT-PCR).

Vlastní polymerasové řetězové reakci předcházela reverzní transkripce. Termostabilní polymerasy využívané v PCR totiž nemohou jako templát využívat vlákno RNA. Při reverzní transkripci je podle mRNA izolované z buněk syntetizována komplementární DNA pomocí virové reverzní transkriptasy. Takto získaná DNA je označována jako c-DNA (copy-DNA). Oproti molekule DNA obsahuje molekula c-DNA sekvence bez intronů. Molekula c-DNA slouží jako templát pro PCR [78, 72].

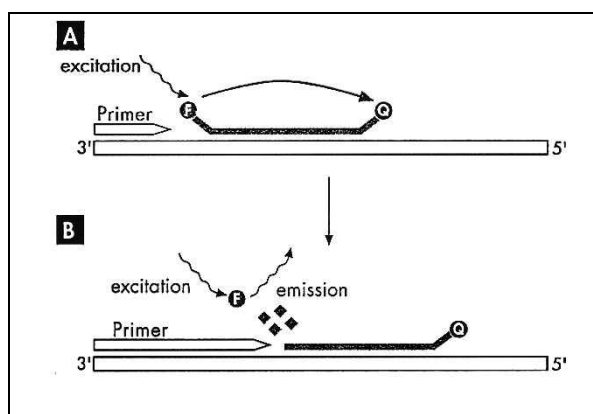
Základními složkami reakční směsi PCR jsou kromě cílových amplifikovaných nukleových kyselin také jednořetězcové oligonukleotidy o délce 20-25 párů bazí (primery, sondy), jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), Mg^{2+} ionty, vhodný reakční pufr a termostabilní enzym Taq polymerasa (z termofilní bakterie *Thermobacillus aquaticus*).

PCR probíhá ve třech reakčních krocích – denaturace, annealing a extenze:

- **Denaturace.** V první fázi PCR dochází při teplotě nad 92°C k denuraci dvouvláknové DNA - štěpení relativně slabých vazeb mezi bazemi a vznik dvou jednotlivých vláken DNA.
- **Annealing.** Ve druhém kroku je teplota snížena a primery a sondy v reakční směsi jsou navázány na komplementární úseky cílové DNA. Jelikož jsou primery krátké a v nadbytku nasednou spíše než komplementární vlákno. Navázání primerů je podmínkou pro činnost DNA polymerasy. Optimální teplotu annealingu je nutné hledat experimentálně, pohybuje se v rozmezí 40-60°C.
- **Extenze.** Ve třetím kroku Taq polymerasa syntetizuje komplementární vlákna od 3'-konce primerů. Optimální teplota pro činnost Taq polymerasy je obvykle 72°C.

PCR probíhá v termocykleru ve 20-50 opakujících se cyklech [79].

QRT-PCR umožňuje zaznamenat produkty reakce bezprostředně po jejich vzniku v každém jednotlivém cyklu. Pro provedení byl použit TaqMan® Gene Expression Assay, který obsahoval TaqMan sondy. Jedná se o dvojité značené sondy, na jejichž 5'konci je navázán nosič fluorescence (fluorofor) a na 3'konci zhášecí fluorescence (quencher dye). Dokud je nosič v dosahu působení zhášecí, není naměřena žádná fluorescence (viz obr. 5A). Během elongace nově syntetizovaného řetězce je sonda štěpena 5'→3' exonukleasovou aktivitou Taq DNA polymerasy, nosič fluorescence se dostává mimo dosah působení zhášecí a to vede k detekci fluorescence (viz obr. 5B). Intenzita fluorescenčního záření roste s počtem cyklů, je úměrná počtu namnožené c-DNA [80].



Obr. 5. Schématické znázornění principu dvojité značené sondy v QRT-PCR. (F) fluorofor; (Q) zhášecí

Pro zjištění ovlivnění exprese cílového genu je nutné vyhodnotit také expresi tzv. housekeepingového genu. Housekeepingové geny jsou exprimovány ve všech buňkách, kódují proteiny nezbytné pro přežití všech typů buněk (většinu strukturálních

proteinů, ribosomální proteiny, enzymy metabolických drah). Expresi housekeepingových genů v buňce je konstantní, a to i za přítomnosti látek ovlivňujících genovou expresi (induktorů a inhibitorů) [77].

QRT-PCR byla provedena v cykleru LightCycler. Byly zaznamenávány změny intenzity fluorescence v závislosti na počtu proběhlých cyklů. Výstupem měření jsou hodnoty C_T . Pro vyhodnocení získaných dat byla použita metoda relativní kvantifikace popisující změny v expresi sledovaných genů v MCF-7 buňkách ovlivněných cytostatiky v porovnání s kontrolními buňkami. Vhodnou metodou pro analýzu relativních změn v genové expresi je $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoda [81]. Nejprve je třeba zjistit hodnotu $\Delta\Delta C_T$ dle vzorce:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ AKR1C3}} - C_{T \text{ PBGD}})_{\text{ovl. varianta}} - (C_{T \text{ AKR1C3}} - C_{T \text{ PBGD}})_{\text{kontrola}}$$

C_Tvýstup z QRT-PCR

AKR1C3 (CBR1).....sledovaný gen AKR1C3 (event. CBR1)

PBGD.....housekeepingový gen pro porfobilinogendeaminázu

Takto získaná hodnota $\Delta\Delta C_T$ se dosadí do vzorce [81]:

$$x = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Hodnota x u kontrol je rovna 1,00. U vzorků by měla být hodnota x alespoň dvakrát vyšší, aby bylo možno považovat rozdíl v expresi sledovaného genu v ovlivněných MCF-7 buňkách za statisticky významný [82].

Postup:

QRT-PCR byla zrealizována na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, kde je tato metoda již dobře zavedena a optimalizována. Pro vlastní QRT-PCR byl použit TaqMan® Gene Expression Assay, který obsahoval FAMTM dye labeled TaqMan® MGB sondy a specifické PCR primery pro geny AKR1C3 a CBR1 ve 20násobné koncentraci vzhledem ke koncentraci v reakci (finální koncentrace sondy 250 nM, primerů 900 nM). Nejprve byl z jednotlivých složek (MgCl₂, roztok TaqMan sond a primerů, reverzní transkriptasa, nukleotidy, polymerasa, RNase-free voda) připraven Master Mix. Do PCR kapilár bylo napipetováno vždy 18 μ l Master Mixu a poté přidány 2 μ l vzorku izolované RNA. Celkový objem v PCR kapiláře činil 20 μ l.

QRT-PCR proběhla v LightCycleru, který využívá pro excitaci vlnovou délku $\lambda = 470\text{nm}$. Ve vzorku nejprve proběhla reverzní transkripce (20 min, 50°C), při které byla dle mRNA nasyntetizována c-DNA. PCR byla zahájena počátečním inkubačním krokem k aktivaci HotStarTaq DNA polymerasy (15 min, 95°C). Poté se střídaly fáze denaturace (0,5 s, 95°C) a kombinovaný krok annealing/extenze (60 s při 60°C). c-DNA byla amplifikována v 45 cyklech.

5. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

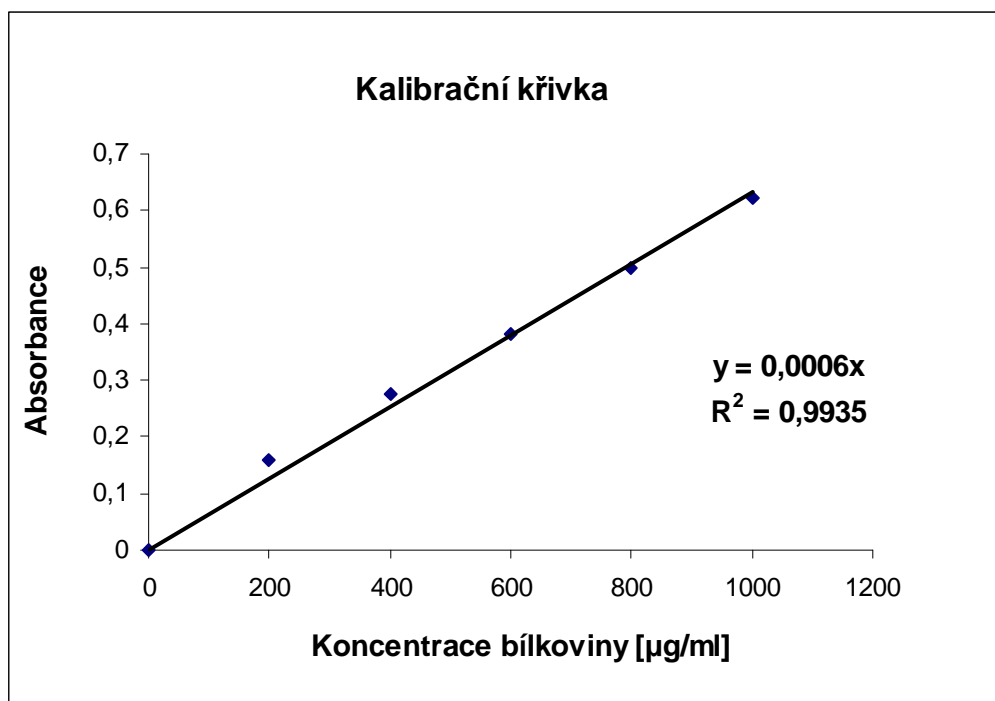
5.1. STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

Při zjišťování koncentrace bílkovin v cytosolu získaném z MCF-7 buněk ovlivněných cytostatiky a buněk kontrolních bylo postupováno podle výše uvedeného návodu. (viz kapitola 4.3.4.)

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny - viz Tab. 13, Obr. 6.

Tab. 13. Průměrné hodnoty absorbance $A \pm S.D.$ (směrodatná odchylka) kalibračních roztoků.

Označení	Konc. BSA [$\mu\text{g/ml}$]	$A \pm S.D.$
1	0	$0 \pm 0,002$
2	200	$0,159 \pm 0,068$
3	400	$0,275 \pm 0,009$
4	600	$0,380 \pm 0,005$
5	800	$0,499 \pm 0,012$
6	1000	$0,622 \pm 0,012$

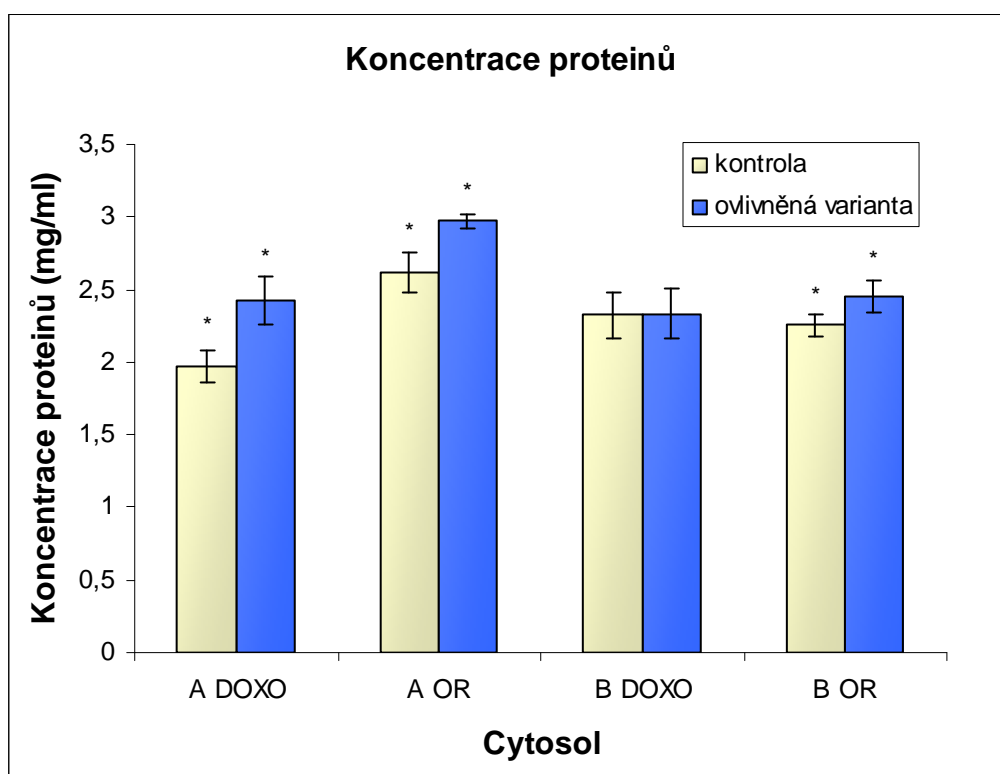


Obr. 6. Závislost absorbance na koncentraci bílkoviny

Rovnice kalibrační přímky je $y = 0,0006x$ s hladinou spolehlivosti $R^2 = 0,9935$. Z průměrných hodnot absorbance jednotlivých vzorků a z parametrů rovnice přímky byly vypočítány koncentrace bílkovin v připravených vzorcích cytosolu – viz Tab 14. Cytosol byl izolován z MCF-7 buněk inkubovaných s cytostatiky (50 nM doxorubicinem, 100 nM oracinem) a z buněk kontrolních. Byly provedeny dva nezávislé pokusy (A, B). Koncentrace bílkovin v jednotlivých cytosolických frakcích z buněk ovlivněných cytostatiky byly srovnávány s koncentracemi bílkovin v kontrolním cytosolu – viz Obr. 7.

Tab. 14. Koncentrace proteinů ve vzorcích cytosolu

Vzorek	Průměr ± S.D. [mg/ml]
A kontrola 1	1,973 ± 0,110
A 50 nM doxorubicin	2,428 ± 0,166
A kontrola 2	2,614 ± 0,135
A 100 nM oracin	2,970 ± 0,054
B kontrola 1	2,323 ± 0,153
B 50 nM doxorubicin	2,330 ± 0,173
B kontrola 2	2,255 ± 0,080
B 100 nM oracin	2,451 ± 0,106



Obr. 7. Grafické vyjádření koncentrace bílkovin [mg/ml] ve vzorcích cytosolu

Statisticky významný nárůst bílkovin v cytosolu byl zaznamenán po 48 hodinové inkubaci MCF-7 buněk s doxorubicinem (50 nM) v pokusu A a s oracinem (100 nM) v obou nezávislých pokusech. V pokusu B po inkubaci s doxorubicinem (50 nM) bylo množství bílkovin v ovlivněné a kontrolní variantě srovnatelné. Z důvodu malé citlivosti není možné touto metodou prokázat indukci enzymů v důsledku expozice cytostatikům. Koncentrace bílkovin byla využita při výpočtu specifické enzymové aktivity.

5.2. VLIV DOXORUBICINU A ORACINU NA AKTIVITU CYTOSOLICKÝCH REDUKTAS KARBONYLU

Aktivita reduktas karbonylu byla zjišťována inkubací cytosolu s oracinem, event. doxorubicinem, přičemž množství vzniklých metabolitů bylo stanoveno pomocí HPLC. Postupovalo se dle výše uvedených návodů (viz kapitoly 4.3.5. a 4.3.7.).

Z množství DHO, event. DOXOL byla vypočtena specifická enzymová aktivita reduktáz karbonylové skupiny oracinu (Tab. 15) a doxorubicinu (Tab. 16).

Následně byla porovnána aktivita redukčních enzymů v cytosolu buněk ovlivněných cytostatiky a buněk kontrolních. Byly sestrojeny křivky závislosti specifické enzymové aktivity na koncentraci přidaného substrátu (oracinu – Obr. 8, doxorubicinu – Obr. 9).

Pomocí transformace dle Lineweavera a Burka byly vypočteny kinetické parametry probíhajících reakcí - V_{max} (maximální rychlost) a K_m (Michaelisova konstanta), uvedeny v tabulce Tab. 17 a 18.

Tab. 15. Specifická enzymová aktivita reduktas oracinu

Vzorek cytosolu	Koncentrace oracinu [mM]	Množství DHO* [nmol] v 250µl	Specifická enzymová aktivita** [pmol DHO/min/mg proteinu]
A Kontrola 1	0,01	0,243	27,93 ± 3,75
	0,05	1,754	201,62 ± 20,45
	0,1	2,013	231,33 ± 8,40
	0,5	2,107	242,19 ± 15,35
	1	2,16	248,29 ± 2,75
A Doxorubicin (50 nM)	0,01	0,318	28,50 ± 3,67
	0,05	2,654	237,84 ± 6,49
	0,1	3,146	281,90 ± 10,91
	0,5	3,152	282,42 ± 10,42
	1	3,125	280,02 ± 16,48
A Kontrola 2	0,01	0,356	32,13 ± 2,72
	0,05	2,01	181,31 ± 2,52
	0,1	2,724	245,66 ± 24,33
	0,5	2,799	252,48 ± 7,06
	1	2,856	257,63 ± 6,02
A Oracin (100 nM)	0,01	0,511	38,87 ± 3,10
	0,05	2,999	228,08 ± 5,16
	0,1	3,779	287,37 ± 11,58
	0,5	3,89	295,86 ± 9,63
	1	3,947	300,16 ± 23,61

* Látkové množství vzniklého DHO bylo zjištěno dosazením do vzorce:

$$n = \frac{m \times 5}{Mr_{DHO}}$$

n.....látkové množství DHO [nmol]

m.....hmotnost DHO [ng] v 50 µl vzorku

5.....přepočet z nasřikovaných 50 µl na celkových 250 µl vzorku

M_rmolární hmotnost DHO [372,85 g/mol]

Hodnoty enzymové aktivity byly získány dosazením do vzorce:

$$\text{enzym.aktivita} = \frac{n}{60} \times \frac{1000}{75}$$

Enzymová aktivita[pmol/min]

n.....látkové množství DHO [pmol]

60.....přepočet n DHO vytvořeného za 1 hod na n DHO vytvořené za 1min

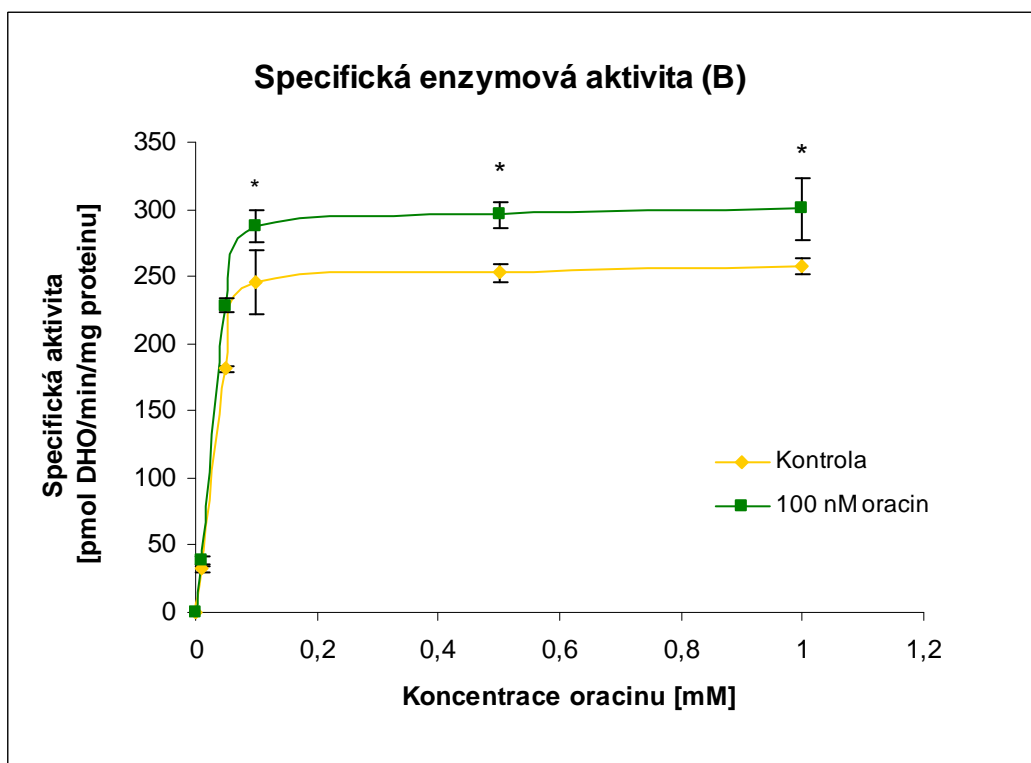
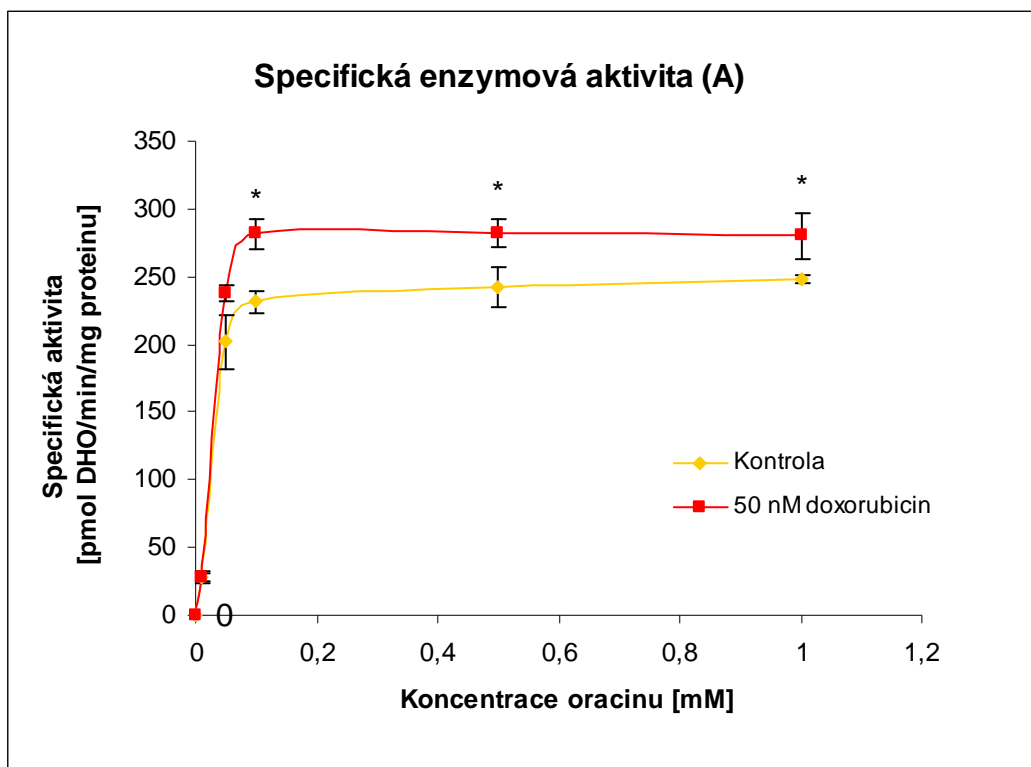
1000/75.....přepočet ze 75 µl na 1 ml cytosolu

** Hodnoty specifické enzymové aktivity byly získány dosazením do vzorce:

$$\text{spec.enzym.aktivita} = \frac{\text{enzym.aktivita}}{\text{konc. proteinu}}$$

Specifická enzym. aktivita....[pmol/min/mg proteinu]

Konc. proteinu.....[mg/ml]



Obr. 8A, B. Graf závislosti specifické enzymové aktivity reduktas oracinu na koncentraci oracinu v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky (50 nM doxorubicin (A), 100 nM oracin (B))

Tab. 17. Hodnoty Vmax a Km charakterizující redukcí oracinu v cytosolu buněk kontrolních a buněk ovlivněných cytostatiky

Vzorek cytosolu	V max [pmol DHO/min/mg bí]	K _M [mM]
A kontrola 1	266,98	0,026
A 50 nM doxorubicin	309,68	0,025
A kontrola 2	277,98	0,030
A 100 nM oracin	324,54	0,028

Tab. 16. Specifická enzymová aktivita reduktas doxorubicinu

Vzorek cytosolu	Koncentrace doxorubicinu [μM]	Koncentrace DOXOL [nmol/ml] (průměr)	Specifická enzymová aktivita [pmol/min/mg proteinu]
B Kontrola 1	10	0,454	8,14 ± 0,06
	25	0,537	9,63 ± 0,16
	50	0,700	12,54 ± 0,69
	100	0,995	17,84 ± 0,22
	250	1,322	23,70 ± 0,37
	500	1,497	26,82 ± 0,65
	1000	1,708	30,62 ± 1,64
B Doxorubicin (50 nM)	10	0,456	9,27 ± 0,05
	25	0,583	11,85 ± 0,43
	50	0,784	15,93 ± 0,33
	100	1,111	22,59 ± 0,40
	250	1,570	31,90 ± 0,22
	500	1,703	34,61 ± 1,62
	1000	1,728	35,12 ± 2,08
B Kontrola 2	10	0,454	6,26 ± 0,01
	25	0,572	7,88 ± 0,29
	50	0,899	12,38 ± 1,01
	100	1,234	16,99 ± 1,31
	250	1,417	19,52 ± 1,88
	500	1,600	22,04 ± 2,76
	1000	1,882	25,92 ± 3,62
B Oracin (100 nM)	10	0,455	6,51 ± 0,01
	25	0,614	8,79 ± 0,27
	50	0,886	12,68 ± 0,81
	100	1,418	20,29 ± 0,74
	250	1,905	27,25 ± 2,19
	500	2,147	30,71 ± 4,07
	1000	2,604	37,25 ± 3,00

Látkové množství vzniklého DOXOL bylo zjištěno dosazením do vzorce:

$$n = \frac{c}{V}$$

n..... látkové množství DOXOL [nmol]

c.....molární koncentrace DOXOL [nmol/ml]

V.....celkový objem získaného vzorku [0,15 ml]

Hodnoty enzymové aktivity byly získány dosazením do vzorce:

$$\text{enzym.aktivita} = \frac{n}{60} \times \frac{1000}{75}$$

Enzymová aktivita ...[pmol/min]

n.....látkové množství DOXOL [pmol]

60.....přepočet n DOXOL vytvořeného za 1 hod na n DOXOL vytvořené za 1 min

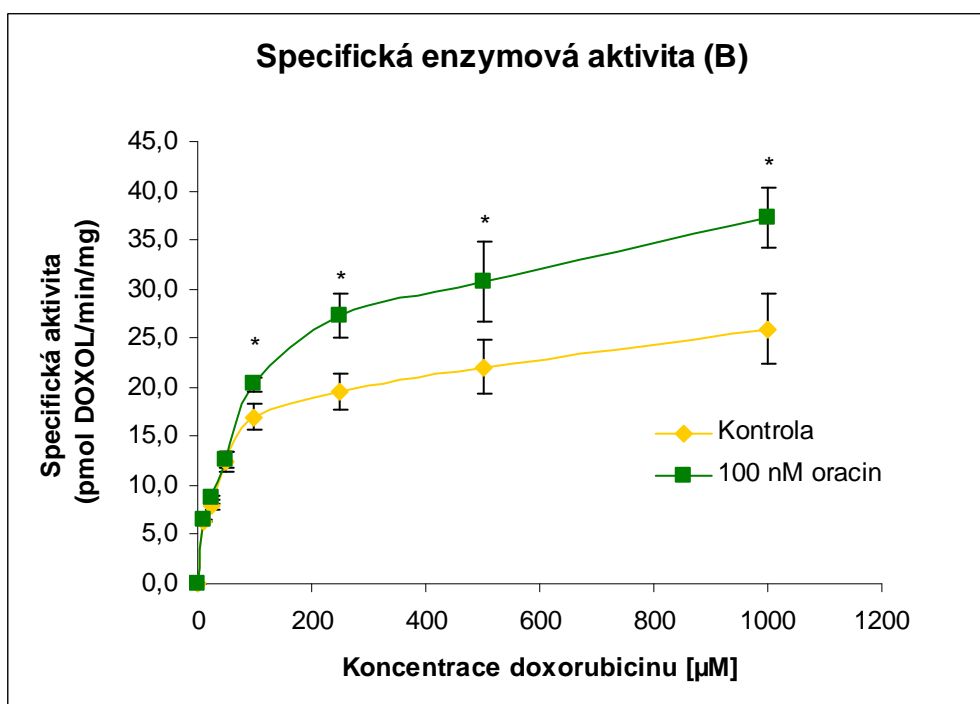
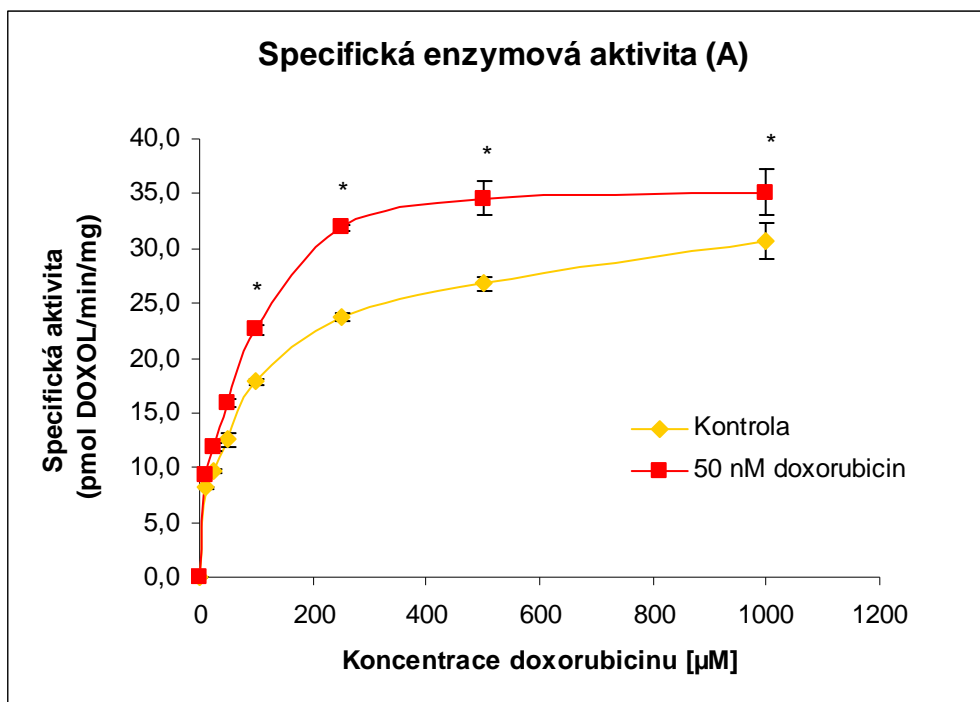
1000/75.....přepočet ze 75 μ l na 1ml cytosolu

* Hodnoty specifické enzymové aktivity byly zjištěny dosazením do vzorce:

$$\text{spec.enzym.aktivita} = \frac{\text{enzym.aktivita}}{\text{konc. proteinu}}$$

Specifická enzym. aktivita....[pmol/min/mg proteinu]

Konc. proteinu.....[mg/ml]



Obr. 9A, B. Graf závislosti specifické enzymové aktivity reduktas doxorubicinu na koncentraci doxorubicinu v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky (50 nM doxorubicin (A), 100 nM oracin (B))

Tab. 18. Hodnoty V_{max} a K_M charakterizující redukci doxorubicinu v cytosolu buněk kontrolních a buněk ovlivněných cytostatiky

Vzorek cytosolu	V_{max} [pmol DOXOL/min/mg]	K_M [μ M]
B kontrola 1	30,76	62,59
B 50 nM doxorubicin	37,75	57,13
B kontrola 2	25,26	50,71
B 100 nM oracin	38,53	92,96

Výše uvedená data ukazují statisticky významný nárůst specifické enzymové aktivity v cytosolu buněk ovlivněných doxorubicinem a oracinem. Krátkodobá (48 hod.) expozice buněk MCF-7 linie nízkým (nM) koncentracím uvedených cytostatik tedy vede k indukci cytosolických reductas oracinu a doxorubicinu.

5.3. IDENTIFIKACE REDUKTAS ORACINU V CYTOSOLU MCF-7 BUNĚK

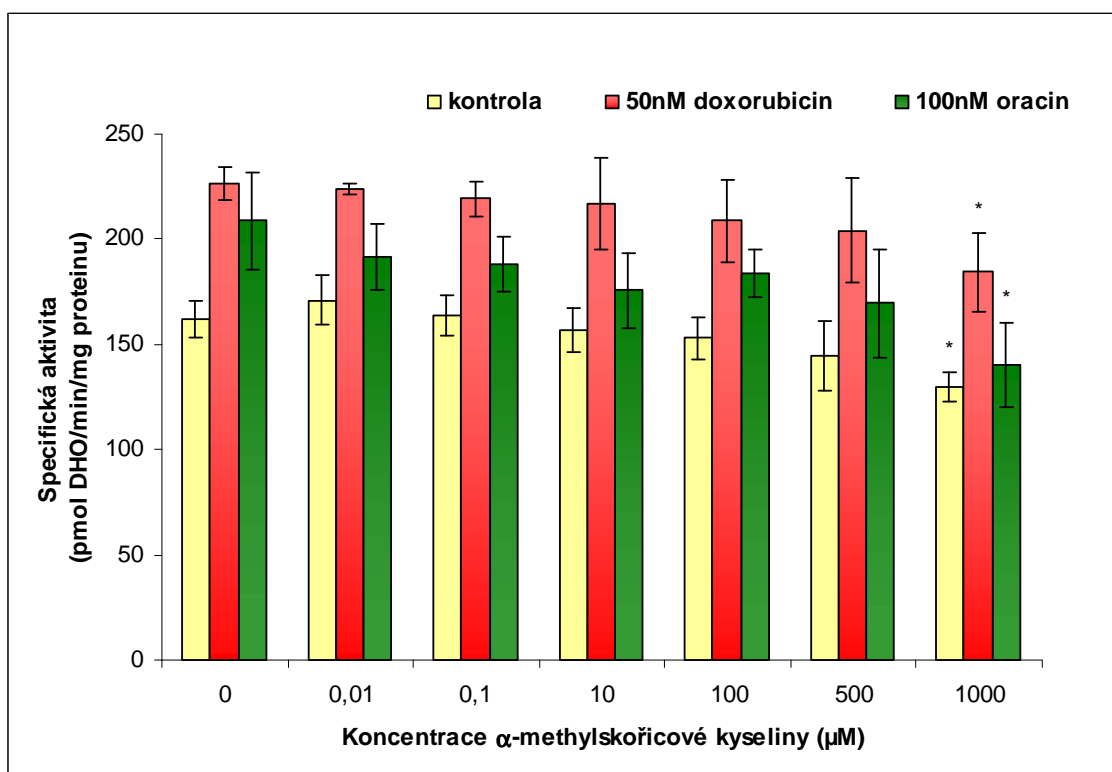
Pro určení konkrétních enzymů podílejících se na redukci oracinu na 11-dihydrooracin v cytosolu MCF-7 buněk byly provedeny inhibiční studie. Postupovalo se dle výše uvedeného návodu (viz kapitolu 4.3.6.).

Byla stanovena specifická enzymová aktivita reductas oracinu v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky při vzrůstající koncentraci vybraných inhibitorů α -methylskořicové kyseliny a quercitrinu v reakční směsi - viz Tab. 19 a 20.

Závislost specifické enzymové aktivity na koncentraci příslušného inhibitoru byla vynesena do grafu – viz Obr. 10 a 11.

Tab. 19. Vliv α -methylskořicové kyseliny na redukci oracinu

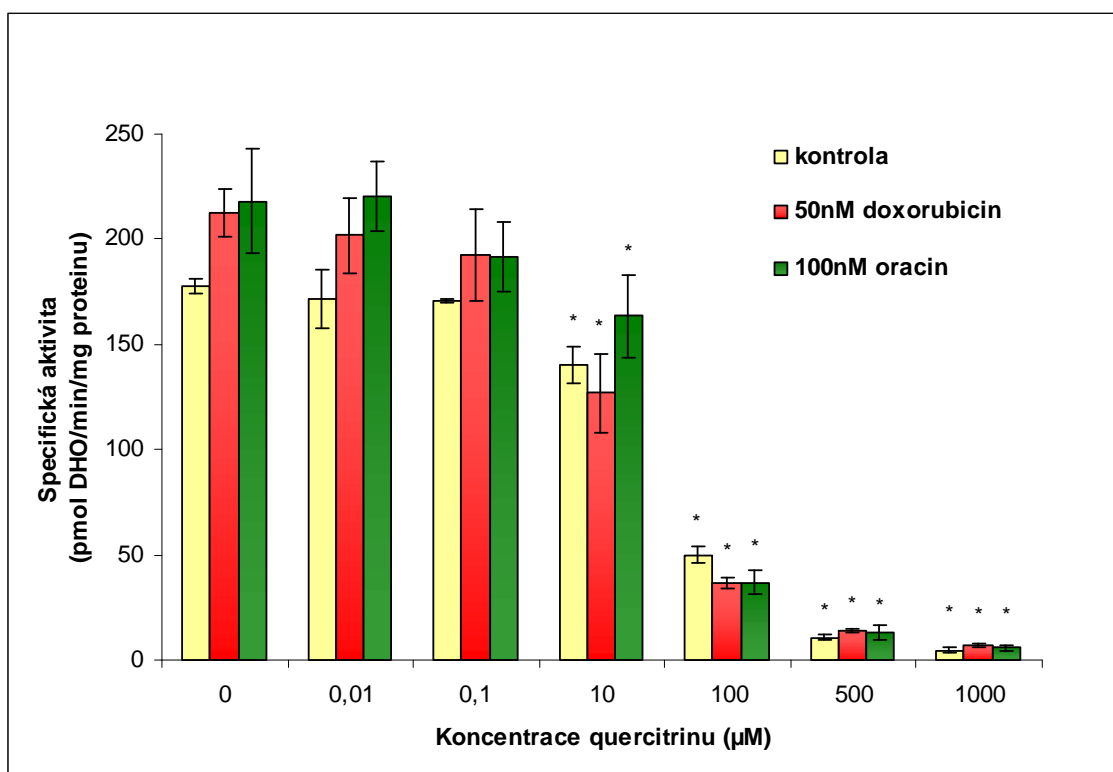
Koncentrace α -methylskořicové kyseliny [μ M]	Specifická enzymová aktivita [pmol DHO/min/mg]		
	kontrola	50nM doxorubicin	100nM oracin
0	162,23 \pm 8,79	226,51 \pm 8,14	208,71 \pm 23,12
0,01	171,06 \pm 11,52	224,00 \pm 2,40	191,68 \pm 15,44
0,1	163,91 \pm 9,82	219,10 \pm 8,05	188,24 \pm 13,13
10	156,57 \pm 10,48	216,91 \pm 22,07	175,60 \pm 17,84
100	152,88 \pm 9,69	208,69 \pm 19,59	183,99 \pm 11,32
500	144,59 \pm 16,82	204,02 \pm 24,84	169,81 \pm 25,65
1000	129,68 \pm 6,72*	184,55 \pm 18,79*	140,37 \pm 19,95*



Obr. 10. Závislost specifické enzymové aktivity reduktas oracinu na koncentraci α -methylokořicové kyseliny

Tab. 20. Vliv quercitrinu na redukci oracinu

Koncentrace quercitrinu [μM]	Specifická enzymová aktivita [pmol DHO/min/mg]		
	kontrola	50nM doxorubicin	100nM oracin
0	177,38 \pm 3,49	212,31 \pm 11,36	218,20 \pm 24,68
0,01	171,35 \pm 13,88	201,84 \pm 18,10	220,33 \pm 16,72
0,1	170,65 \pm 0,89	192,62 \pm 21,86	191,41 \pm 16,50
10	140,51 \pm 8,61*	126,90 \pm 18,57*	163,50 \pm 19,49*
100	49,79 \pm 3,87*	36,68 \pm 2,74*	36,80 \pm 5,49*
500	10,83 \pm 1,05*	13,82 \pm 1,06*	12,78 \pm 3,34*
1000	4,71 \pm 1,08*	7,23 \pm 0,95*	5,87 \pm 1,20*



Obr. 11. Závislost specifické enzymové aktivity reduktas oracinu na koncentraci quercitrinu

Bylo zjištěno, že přidání α -methylskořicové kyseliny do reakce nemá vliv na množství vzniklého DHO, což znamená, že enzym AKR1C3 se nepodílí na redukcí oracinu v cytosolu MCF-7 buněk. Statisticky významný pokles specifické enzymové aktivity při vysoké koncentraci α -methylskořicové kyseliny (1 mM) je způsoben inhibicí jiných cytosolických enzymů, při této koncentraci již není inhibice specifická.

Quercitrin již při koncentraci 10 μ M způsobil statisticky významný pokles specifické enzymové aktivity. Ve vyšších koncentracích dochází k téměř úplné inhibici redukce oracinu. Na základě těchto údajů lze konstatovat, že enzym CBR1 je hlavním enzymem metabolizujícím oracin v cytosolu MCF-7 buněk.

5.4. IDENTIFIKACE REDUKTAS DOXORUBICINU V CYTOSOLU MCF-7

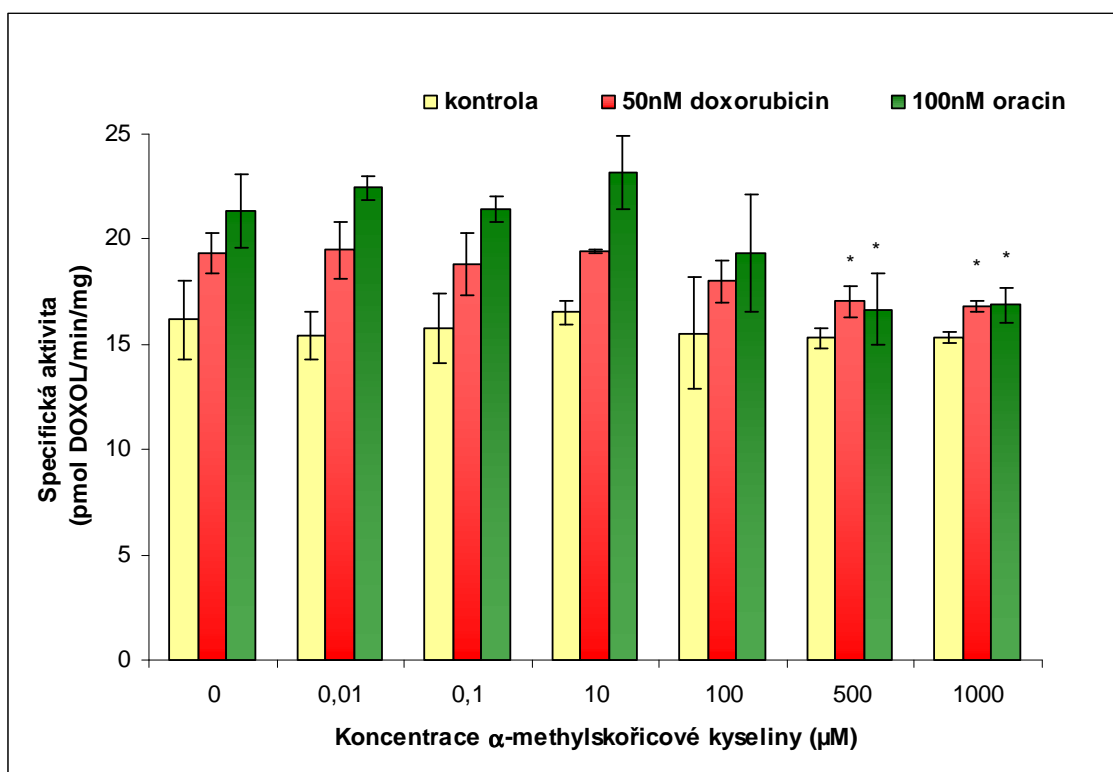
Pro určení konkrétních enzymů podléjících se na redukci doxorubicinu na 13-doxorubicinol v cytosolu MCF-7 buněk byly provedeny inhibiční studie. Postupovalo se dle výše uvedeného návodu (viz kapitolu 4.3.8.).

Byla stanovena specifická enzymová aktivita reductas doxorubicinu v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky při vzrůstající koncentraci inhibitoru (α -methylskořicové kyseliny, quercitrinu) v reakční směsi - viz Tab. 21 a 22.

Závislost specifické enzymové aktivity na koncentraci příslušného inhibitoru byla vynesena do grafu – viz Obr. 12 a 13.

Tab. 21. Vliv α -methylskořicové kyseliny na redukci doxorubicinu

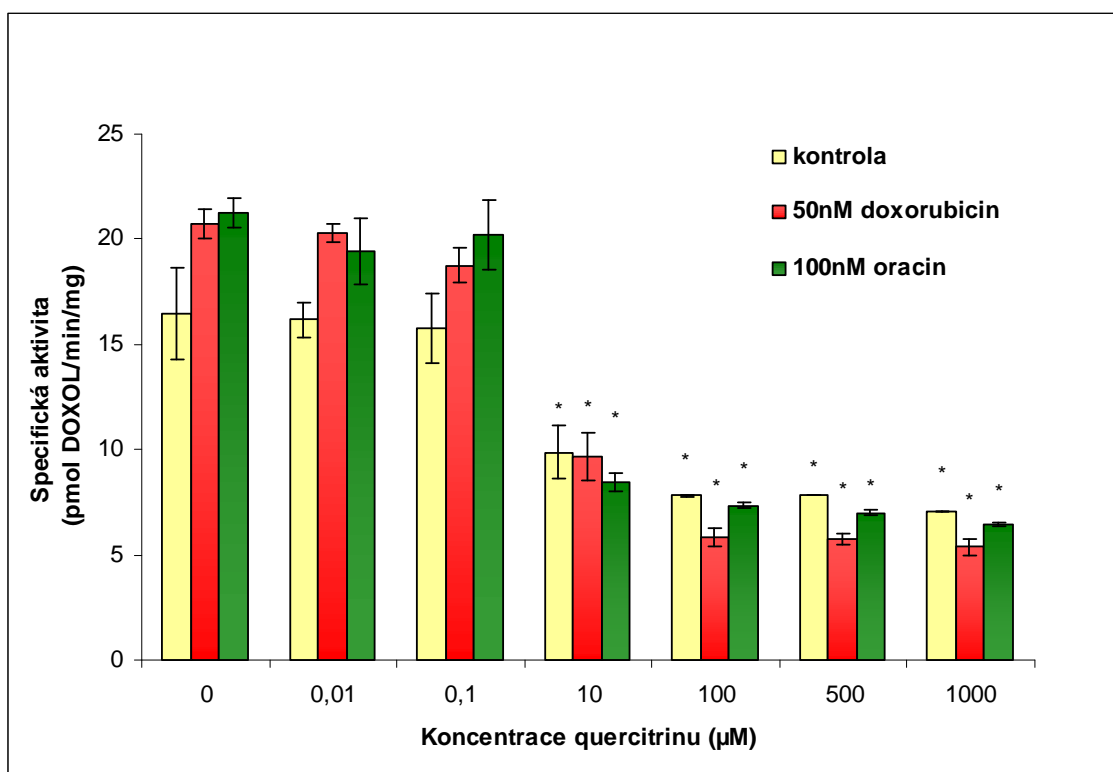
Koncentrace α -methylskořicové kyseliny [μ M]	Specifická enzymová aktivita [pmol DOXOL/min/mg]		
	kontrola	50nM doxorubicin	100nM oracin
0	16,19 \pm 1,87	19,33 \pm 0,94	21,36 \pm 1,72
0,01	15,43 \pm 1,13	19,47 \pm 1,38	22,46 \pm 0,57
0,1	15,78 \pm 1,63	18,79 \pm 1,49	21,45 \pm 0,61
10	16,52 \pm 0,57	19,42 \pm 0,07	23,19 \pm 1,74
100	15,52 \pm 2,65	18,00 \pm 1,02	19,35 \pm 2,76
500	15,31 \pm 0,49	17,05 \pm 0,73*	16,67 \pm 1,73*
1000	15,33 \pm 0,27	16,82 \pm 0,27*	16,88 \pm 0,83*



Obr. 12. Závislost specifické enzymové aktivity reduktas doxorubicinu na koncentraci α -methylskořicové kyseliny

Tab. 22. Vliv quercitrinu na redukci doxorubicinu

Koncentrace quercitrinu [μM]	Specifická enzymová aktivita [pmol DOXOL/min/mg]		
	kontrola	50nM doxorubicin	100nM oracin
0	16,48 ± 2,15	20,76 ± 0,69	21,26 ± 0,72
0,01	16,19 ± 0,82	20,30 ± 0,42	19,43 ± 1,57
0,1	15,76 ± 1,66	18,76 ± 0,86	20,20 ± 1,66
10	9,87 ± 1,29*	9,66 ± 1,14*	8,45 ± 0,41*
100	7,82 ± 0,04*	5,84 ± 0,47*	7,33 ± 0,13*
500	7,83 ± 0,01*	5,74 ± 0,24*	7,01 ± 0,11*
1000	7,05 ± 0,00*	5,36 ± 0,40*	6,47 ± 0,08*



Obr. 13. Závislost specifické enzymové aktivity reduktas doxorubicinu na koncentraci quercitrinu.

Výše uvedená data ukazují, že přidání α -methylskořicové kyseliny do reakce nemá vliv na množství vzniklého doxorubicinolu, což znamená, že enzym AKR1C3 se nepodílí na redukci doxorubicinu v cytosolu MCF-7 buněk. Statisticky významný pokles specifické enzymové aktivity při vysoké koncentraci α -methylskořicové kyseliny je způsoben inhibicí jiných cytosolických enzymů, při této koncentraci již není inhibice specifická.

Quercitrin způsobil statisticky významný pokles specifické enzymové aktivity již při koncentraci 10 μ M. I při vyšších koncentracích quercitrinu ovšem redukce doxorubicinu probíhá. Na základě těchto údajů lze konstatovat, že kromě enzymu CBR1 se na metabolizaci doxorubicinu v cytosolu MCF-7 buněk podílí ještě další enzym(y).

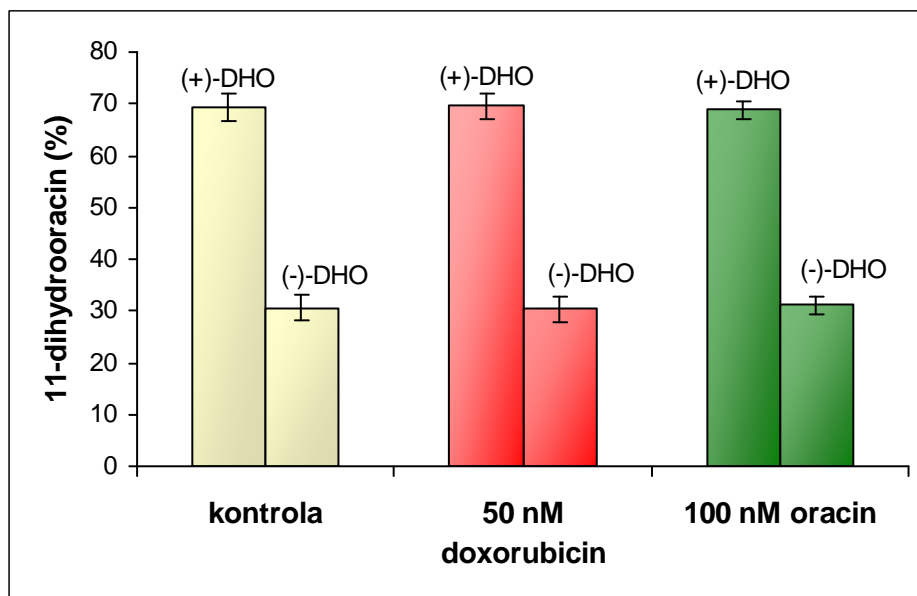
5.5. STEREOSPECIFITA REDUKTAS ORACINU V CYTOSOLU MCF-7 BUNĚK

Pro stanovení stereospecifity reduktas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk byla použita HPLC separace enantiomerů 11-dihydrooracinu. Postupovalo se dle výše uvedeného návodu (viz kapitolu 4.3.9.).

Poměr (+) a (-)-DHO v cytosolické frakci kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky bez použití specifických inhibitorů a dále při koncentracích inhibitorů, které již způsobovaly signifikantní pokles specifické enzymové aktivity, je uveden v následující tabulce – Tab. 23. Srovnání stereospecifity reduktas oracinu v cytosolu kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky je znázorněno graficky – Obr. 14.

Tab. 23. Poměr enantiomerů 11-dihydrooracinu v cytosolu MCF-7 buněk

Inhibitor	Koncentrace inhibitoru [μM]	Kontrola		50 nM doxorubicin		100 nM oracin	
		(+) DHO [%]	(-) DHO [%]	(+) DHO [%]	(-) DHO [%]	(+) DHO [%]	(-) DHO [%]
-	0	69,35 \pm 2,62	30,65 \pm 2,62	69,65 \pm 2,47	30,35 \pm 2,47	68,85 \pm 1,77	31,15 \pm 1,77
Quercitrin	1	71,35 \pm 1,20	28,65 \pm 1,20	75,45 \pm 5,16	24,55 \pm 5,16	69,85 \pm 0,92	30,15 \pm 0,92
	10	61,15 \pm 3,75	38,85 \pm 3,75	66,75 \pm 4,88	33,25 \pm 4,88	66,55 \pm 0,21	33,45 \pm 0,21
	100	71,05 \pm 0,49	28,95 \pm 0,49	68,45 \pm 4,17	31,55 \pm 4,17	70,95 \pm 0,64	29,05 \pm 0,64
	500	70,95 \pm 1,06	29,05 \pm 1,06	68,40 \pm 0,85	31,60 \pm 0,85	71,10 \pm 1,27	28,40 \pm 0,57
α -methylskořicová kys.	1000	67,60 \pm 0,42	32,40 \pm 0,42	68,10 \pm 0,42	31,90 \pm 0,42	74,25 \pm 1,34	25,75 \pm 1,34



Obr. 14. Poměr (+) a (-)-DHO v cytosolické frakci kontrolních buněk a buněk ovlivněných cytostatiky bez použití specifických inhibitorů

Poměr enantiomerů 11-dihydrooracinu je ve všech vzorcích srovnatelný, (+)-DHO a (-)-DHO 70:30. Expozice cytostatikům ani působení inhibitorů tedy neovlivňuje poměr (+) a (-)-DHO. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky inhibičních studií, ve kterých bylo zjištěno, že na redukcí oracinu v cytosolu MCF-7 buněk se podílí jediný enzym (CBR1).

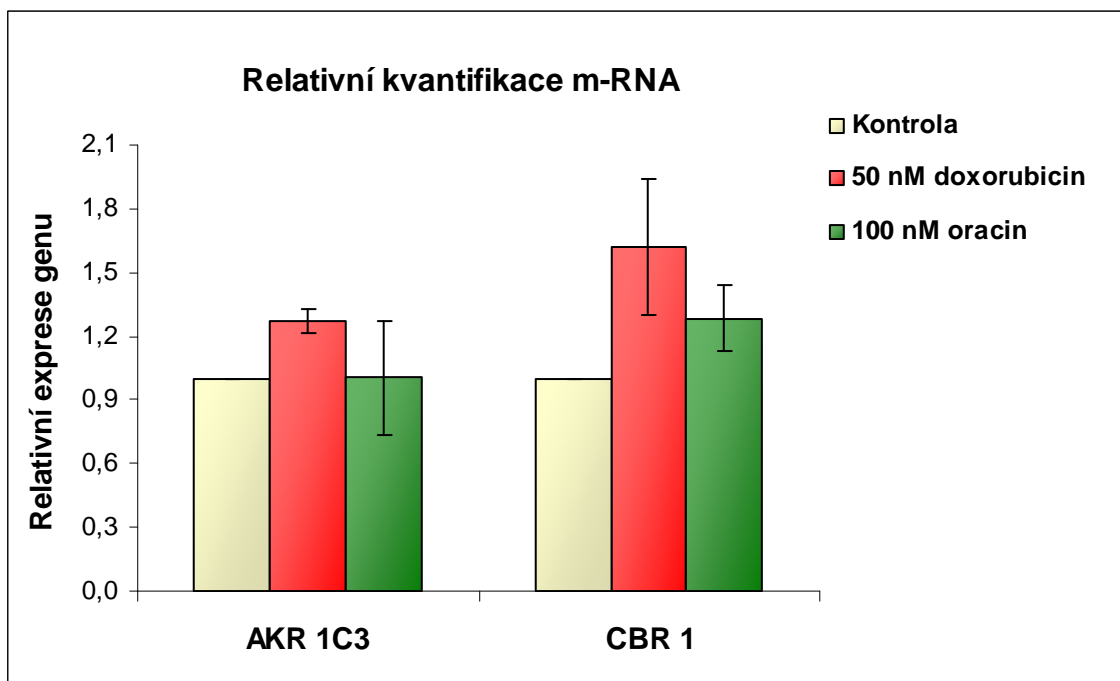
5.6. VLIV DOXORUBICINU A ORACINU NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ V BUŇKÁCH MCF-7 LINIE

Expozice buněk MCF-7 linie doxorubicinu či oracinu vede k indukci enzymů účastnících se metabolizace těchto cytostatik. Indukce enzymů může být podmíněna zvýšením exprese příslušných genů nebo změnami na úrovni posttranslačních úprav [68].

Ke kvantifikaci mRNA byla použita QRT-PCR (postup viz kapitola 4.3.10.). Získaná data byla zpracována metodou relativní kvantifikace (metoda $2^{-\Delta\Delta C_T}$) - viz Tab. 24. Byla srovnána exprese vybraných genů (AKR1C3 a CBR1) v buňkách ovlivněných cytostatiky a buňkách kontrolních – viz Obr. 15.

Tab. 24. Relativní exprese genů pro AKR1C3 a CBR1 v buňkách kontrolních a ovlivněných cytostatiky.

Vzorek	Relativní exprese genů ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	
	AKR1C3	CBR1
Kontrola	1 ± 0	1 ± 0
50 nM doxorubicin	1,271 ± 0,056	1,622 ± 0,516
100 nM oracin	1,004 ± 0,370	1,284 ± 0,157



Obr. 15. Srovnání exprese genů pro AKR1C3 a CBR1 v buňkách kontrolních a ovlivněných cytostatiky.

Hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$ u kontrol jsou rovny 1,00. Aby bylo možno považovat expresi genu pro AKR1C3 a CBR1 v buňkách ovlivněných sledovanými cytostatiky za významně zvýšenou oproti expresi v buňkách kontrolních, měla by být hodnota $2^{-\Delta\Delta C_T}$ alespoň 2,00. Výše uvedená data ukazují, že v ovlivněných buňkách nedošlo k statisticky významnému zvýšení genetické exprese. Indukce enzymů metabolizujících vybraná cytostatika je tedy podmíněna ještě dalším mechanismem.

6. DISKUSE

Doxorubicin je hodnotné cytostatikum používané při léčbě řady hematologických a solidních nádorů včetně karcinomu prsu. Jeho závažným nežádoucím účinkem je kardiotoxicita [21]. Právě absence kardiotoxicity je jednou z předností oracinu, potenciálního cytostatika ve 2. fázi klinického zkoušení [37]. Vedle nežádoucích účinků cytostatik je dalším významným faktorem limitujícím úspěšnost léčby vznik sekundární rezistence. Jedním z mechanismů vzniku nádorové rezistence se jeví zvýšení inaktivace cytostatika v nádorové buňce [2, 3]. Tato skutečnost podmiňuje snahu objasnit biotransformaci cytostatik v různých typech nádorů a zjistit jejich vliv na aktivitu biotransformačních enzymů.

Hlavní biotransformační cestou doxorubicinu a oracinu v lidském organismu je redukce karbonylové skupiny [22, 41]. V předchozích studiích na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové bylo zjištěno, že redukce doxorubicinu a oracinu na příslušné alkoholy probíhá v buňkách MCF-7 nádorové linie především v cytosolu [49]. Tato studie byla proto zaměřena na cytosolické reductasy karbonylu.

Ve studii s MCF-7 náborovou linií byl zkoumán vliv 48 hodinové expozice nízkým koncentracím doxorubicinu (50 nM) a oracinu (100 nM) na aktivitu redukčních enzymů v cytosolu těchto buněk. Uvedená doba expozice a koncentrace cytostatik, které byly zvoleny na základě výsledků testu cytotoxicity, nezpůsobují poškození buněk. Bylo zjištěno, že expozice doxorubicinu a oracinu vede ke statisticky významné indukci enzymů, které katalyzují redukci těchto cytostatik v cytosolu MCF-7 buněk. Obdobný efekt (indukce reductas daunorubicinu) byl pozorován po přidání daunorubicinu do kultivačního média citlivých a rezistentních buněk karcinomu pankreatu [2]. Indukce může být důsledkem zvýšení exprese příslušného genu (tzv. transkripční mechanismus enzymové indukce), snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA (netranskripční mechanismy enzymové indukce) [68]. Pro objasnění mechanismu indukce bylo nutné nejprve identifikovat konkrétní reductasy doxorubicinu a oracinu v cytosolu MCF-7 buněk.

Enzymy účastnící se tvorby 13-doxorubicinolu a 11-dihydrooracinu v cytosolu MCF-7 buněk byly určeny na základě inhibičních studií. Byly testovány dva enzymy: CBR1 (EC 1.1.1.184) z nadrodiny SDR a AKR1C3 (EC 1.1.1.213, EC 1.1.1.62) z nadrodiny AKR. CBR1 je cytosolický enzym vyskytující se v řadě tkání a podílející se

na metabolismu endogenních a exogenních aldehydů a ketonů, včetně antracyklinů [24]. CBR byla též označena za enzym odpovědný za redukci oracinu v jaterním cytosolu potkanů [45]. AKR1C3 je primárně exprimována v prsní tkáni a prostatě, kde se podílí na regulaci hladin aktivních estrogenů a androgenů vzájemnou konverzí aktivních a inaktivních forem [58]. Zároveň byla prokázána účast isoenzymů z podrodiny AKR1C (AKR1C1, 2 a 4) na redukci oracinu v lidském jaterním cytosolu [42]. Inhibiční studie potvrdily roli CBR1 v metabolismu obou cytostatik v nádorové prsní tkáni. Quercitrin, specifický inhibitor CBR [24], v koncentraci 10 μ M způsoboval signifikantní pokles tvorby redukováných metabolitů. Při vyšších koncentracích quercitrinu byla redukce oracinu zcela inhibována, zatímco redukce doxorubicinu zůstala ze 30% zachována. Na redukci doxorubicinu v cytosolu MCF-7 buněk se tedy podílí minimálně jeden další enzym. Použití α -methylskořicové kyseliny, specifický inhibitor AKR1C [62], neovlivnilo rozsah redukce vybraných cytostatik v cytosolu MCF-7 buněk. Na základě těchto výsledků usuzujeme, že AKR1C3 se neúčastní redukce doxorubicinu a oracinu v nádorové prsní tkáni. Účast jediného enzymu (CBR1) na redukci oracinu byla dále potvrzena experimenty, které sledovaly vliv inhibitorů na stereospecifitu redukce oracinu. Quercitrin v koncentracích, které vyvolávaly signifikantní pokles tvorby DHO, neovlivnil poměr vzniklých enantiomerů. V inhibované i neinhibované reakci bylo vytvořeno 70% (+)-DHO a 30% (-)-DHO. Stereospecifita reduktas oracinu v cytosolu MCF-7 buněk je nižší v porovnání s reduktasami v lidském jaterním cytosolu, kde je tvořeno 88-90% (+)-DHO [41]. Získaná data potvrzují, že existují značné rozdíly v biotransformaci cytostatik v normální jaterní tkáni a v nádorové prsní tkáni.

Vliv 48 hodinové expozice MCF-7 buněk nízkým koncentracím doxorubicinu a oracinu na expresi genů vybraných enzymů (CBR1 a AKR1C3) byl určen pomocí QRT-PCR. V buňkách vystavených působení cytostatik byl zaznamenán mírný statisticky nevýznamný nárůst hladiny mRNA pro CBR1, zatímco v případě AKR1C3 nebyla exprese ovlivněna. Indukce CBR1 byla tedy pravděpodobně podmíněna převážně netranskripčním mechanismem (snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA).

Ax a spol. [3] ve svých studiích potvrdili 60% zvýšení hladiny mRNA pro CBR v nádorových buňkách žaludku rezistentních vůči daunorubicinu ve srovnání s buňkami citlivými. Hladina mRNA P-glykoproteinu a MRP zůstala v důsledku přidavku verapamilu do kultivačního média nezměněna. Z těchto dat vyplývalo, že rezistence k daunorubicinu byla vyvolána zvýšením exprese CBR. Soldan a spol. [2] zjistili, že

expozice nádorových buněk pankreatu daunorubicinu vedla ke koncentračně závislé indukci redukčních enzymů. Na druhé straně buňky MCF-7 linie rezistentní vůči doxorubicinu nevykazovaly zvýšení redukce doxorubicinu ve srovnání s buňkami citlivými [85]. V oblasti vzniku nádorové rezistence zůstává stále mnoho nejasností. Ačkoli se zdá, že indukce redukčních enzymů není hlavní příčinou vzniku nádorové rezistence, podílí se na inaktivaci cytostatik a tím umožňuje přežívání nádorových buněk. Forrest a Gonzalez [24] v experimentech na transgenních myších, které vykazovaly zvýšenou expresi lidské CBR v srdeční tkáni, zjistili, že lidské CBR hrají důležitou roli ve vývoji akutní i chronické kardiotoxicity po podání antracyklinů. Na základě uvedených informací lze předpokládat, že inhibitory CBR by mohly být prospěšné při léčbě nádoru prsu prostřednictvím antracyklinů, jednak zvýšením protinádorového účinku, jednak omezením rizika kardiotoxicity.

7. ZÁVĚR

V této studii bylo zjištěno, že krátkodobá (48 hod.) expozice MCF-7 buněk nízkým (nM) koncentracím doxorubicinu a oracinu vede k indukci cytosolických reduktas těchto cytostatik.

Na základě inhibičních studií bylo stanoveno, že CBR1 z nadrodiny SDR proteinů je hlavním enzymem redukce oracinu a spolu s dalšími enzymy se podílí i na redukci doxorubicinu v cytosolu MCF-7 buněk.

Výsledky QRT-PCR ukazují, že krátkodobá (48 hod) expozice MCF-7 buněk nízkým (nM) koncentracím doxorubicinu a oracinu nezpůsobuje statisticky významné zvýšení exprese genu pro CBR1. Indukce CBR1 je pravděpodobně podmíněna převážně netranskripčním mechanismem (snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA).

Obecně je indukce biotransformačních enzymů, která vede ke zvýšení inaktivace cytostatik v nádorových buňkách, považována za jeden z mechanismů vzniku nádorové rezistence. Inhibitory CBR1 by tedy mohly být prospěšné při léčbě karcinomu prsu prostřednictvím doxorubicinu a oracinu.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKR	aldo-ketoreduktasy (Aldo-Keto Reductases)
Ala	alanin
ANT	antracykliny
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CAR	konstitutivní androstanový receptor (Constitutive Androstane Receptor)
CBR	karbonylreduktasy
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycitidintrifosfát
DD	dihydrodioldehydrogenasa
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DHO	11-dihydrooracin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
DOXOL	13-doxorubicinol
dTTP	deoxythymidintrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
G-CSF	faktor stimulující granulocytové kolonie
Gly	glycin
GM-CSF	faktor stimulující granulocytové-makrofágové kolonie
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
His	histidin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
LRP	Lung Resistance related Protein

Lys	lysin
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (Medium-chain Dehydrogenases/Reductases)
MDR	mnohočetná léková rezistence (MultiDrug Resistance)
m-RNA	mediátorová RNA (Messenger RNA)
MRP	protein sdružený s MDR (Multidrug Resistance-associated Protein)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NQO	chinonreduktasy
PBGD	porfobilinogendeaminasa
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok (Phosphate-Buffered Saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
P-gp	P-glykoprotein
Pro	prolin
PXR	pregnanový X receptor (Pregnane X Receptor)
QRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase (Quantitative Real-Time PCR)
RNA	ribonukleová kyselina
RNasy	ribonukleasy
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (Short-chain Dehydrogenases/Reductases)
Ser	serin
Thr	threonin
Tyr	tyrosin
T-E	trypsin-EDTA

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ÚZIS: Zhoubné nádory v roce 2005, Praha 6.12.2007 [cit. 4.4.2008]
http://www.uzis.cz/download.php?ctg=20&search_name=n%E1dor®ion=100&kind=21
- [2] Soldan, M., Netter, K. J., Maser, E.: Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.* 51, 117-23, 1996
- [3] Ax, W., Soldan, M., Koch, L., Maser, E.: Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction, *Biochem. Pharmacol.* 59, 293-300, 2000
- [4] Langdon, S. P.: *Methods in molecular medicine*, vol. 88: Cancer cell culture: Methods and protocols, Humana Press, Totowa, 2004, 360 S
- [5] Harrison, R. G.: Observations on the living developing nerve fiber, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4, 140-143, 1907
- [6] Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium, *Cancer Res.* 12, 364-365, 1952
- [7] Masters, J. R.: HeLa cells 50 yr on: the good, the bad and the ugly, *Nature Rev.* 2, 315-318, 2002
- [8] Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in culture, *Science* 122, 501, 1955
- [9] Dulbecco, R., Freeman, G.: Plaque formation by the polyoma virus, *Virology* 8, 396-397, 1959
- [10] Morgan, J. F., Morton, H. J., Parker, R. C.: The nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 1-8, 1950
- [11] Barnes, D., Sato, G.: Serum-free culture: a unifying approach, *Cell* 22, 649-655, 1980
- [12] Barnes, D., Sato, G.: Methods for growth of cultured cells in serum-free medium, *Anal. Biochem.* 102, 255-270, 1980
- [13] Ham, R. G., McKeehan, W. L.: Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells, *In Vitro* 14, 11-22, 1978
- [14] Weaver, V. M., Fischer, A. H., Peterson, O. W., Bissell, M. J.: The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay, *Biochem. Cell Biol.* 74, 833-851, 1996

- [15] Masters, J. R. W.: Human cancer cell lines: fact and fantasy, *Nat. Rev.* 1, 233-236, 2000
- [16] Lincová, D., Farghali, H. a spol.: Základní a aplikovaná farmakologie, 2. doplněné a přepracované vydání, Galen, Praha, 2007, 672 S
- [17] Lüllmann, H.: Farmakologie a toxikologie, 15. přepracované vydání, Grada, Praha, 2004, 725 S
- [18] Klener, P.: Klinická onkologie, Galen a Karolinum, Praha, 2002, 686 S
- [19] Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčík, P.: Farmaceutická chemie IV., Karolinum, Praha, 2006
- [20] Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2002, monografie Doxorubicin hydrochloridum
- [21] Mikro-verze AISLP, verze 2006.2, INFOPHARM a.s. Praha: SPC přípravku Adriblastina
- [22] Benjamin, R. S., Ringgs, C. E., Bachur, N. R.: Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man, *Clin. Pharmacol. Ther.* 14, 592-600, 1973
- [23] Mordente, A., Minotti, G., Martorana, G. E., Silvestrini, A., Giardina, B., Meucci, E.: Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications, *Biochem. Pharmacol.* 66, 989-98, 2003
- [24] Forrest, R. L., Gonzales, N. R.: Carbonyl reductase, *Chem. Bio. Interact.* 129, 21-40, 2000
- [25] Gewirtz, D. A., Yanovich, S.: Metabolism of adriamycin in hepatocytes isolated from the rat and the rabbit, *Biochem. Pharmacol.* 36, 1793-8, 1987
- [26] Ramji, S., Lee, Ch., Inaba, T., Patterson, A. V., Riddick, D. S.: Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase Overexpression Does Not Enhance the Aerobic Cytotoxicity of Doxorubicin in Human Breast Cancer Cell Lines, *Cancer Research* 63, 6914-6919, 2003
- [27] Cummings, J., Allan, L., Willmott, N., Riley, R., Workman, P., Smyth, J. F.: The enzymology of doxorubicin quinone reduction in tumour tissue, *Biochem. Pharmacol.* 44, 2175-2183, 1992
- [28] Powis, G.: Free radical formation by antitumor quinones, *Free Radic. Biol. Med.* 6, 63-101, 1989
- [29] Hrdina, R., Geršl, V., Klimtová, I., Šimůnek, T., Macháčková, J., Adamcová, M.: Anthracycline-induced cardiotoxicity, *Acta Medica* 43(3), 75-82, 2000

- [30] Forrest, G., Gonzalez, B., Tseng, W., Li, X., Mann, J.: Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice, *Cancer Res.* 15, 5158-64, 2000
- [31] Olson, R. D., Mushlin, P. S., Brenner, D. E., Fleischer, S., Chang, B. K., Cusack, B. J., Broucek, Jr. R. J.: Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite doxorubicinol, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85, 3585-9, 1988
- [32] Michalský, J.: International Patent Application, PCT/CS92/00026, 1992
- [33] Melka, M.: Oracin. Preclinical Summary Report of RIPB (Researche Inst. for Pharmacy and Biochemistry), Prague, 1993
- [34] Miko, M., Poturnajová, M., Soucek, R.: Cytotoxicity and mode of action of the potential cytostatic drug oracin, *Neoplasma* 49, 167-71, 2002
- [35] Klucar, J., Al-Rubeai, M.: G2 cell cycle arrest and apoptosis are induced in Burkitt's lymphoma cells by the anticancer agent oracin, *FEBS Lett.* 400 (1), 127-30, 1997
- [36] Marhan, J.: Mutagenicity of cytostatic drugs in a bacterial systém. I. Ames test, *Folia Microbiol.* 40, 457-461, 1995
- [37] Geršl, V., Mazurová, Y., Bajgar, J., Melka, M., Hrdina, R., Palička, V.: Lack of cardiotoxicity of a new antineoplastic agent, a synthetic derivative of indenoisochinoline: comparison with daunorubicin in rabbits, *Arch. Toxicol.* 70, 645-51, 1996
- [38] Wsól, V., Kvasničková, E., Szotáková, B., Hais, I. M.: High-performance liquid chromatographic assay for the separation and characterization of metabolites of the potential cytostatic drug oracin, *J. Chromatogr. B* 681, 169-75, 1996
- [39] Szotáková, B., Wsól, V., Trejtnar, F., Skálová, L., Kvasničková, E.: Studies on the metabolism of the potential cytostatic drug oracin. Species differences, *Exp. Toxicol. Pathol.* 48 (Suppl. II), 377-80, 1996
- [40] Wsól, V., Szotáková, B., Kvasničková, E., Fell, A. F.: High-performance liquid chromatography study of stereospecific microsomal enzymes catalysing the reduction of a potential cytostatic drug, oracin. Interspecies comparison, *J. Chromatogr. A* 797, 197-201, 1998
- [41] Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Čepková, H., Kvasničková, E.: The main metabolic pathway of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes end cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin, *Enantiomer* 5, 263-70, 2000
- [42] Wsól, V., Szotaková, B., Skalová, L., Maser, E.: Contribution of aldo-keto reductases to the metabolism of the novel anticancer drug oracin in man, *Enzymology and molekular biology of carbonyl metabolism* 12, 249-255, 2005

- [43] Skálová, L., Wsól, V., Szotáková, B., Kvasničková, E.: A comparison between stereospecificity of oracin reduction and stereoselectivity of oxidation of 11-dihydrooracin enantiomers *in vitro* in rat and guinea pig, *Chirality* 11, 510-515, 1999
- [44] Wsól, V., Skálová, L., Szotáková, B., Kvasničková, E.: Sex differences in stereospecificity of oracin reductases in rat *in vitro* and *in vivo*, *Chirality* 11, 505-509, 1999
- [45] Szotáková, B., Skálová, L., Wsól, V., Kvasničková, E.: Reduction of the potential anticancer drug oracin in the rat liver *in vitro*, *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 495-500, 2000
- [46] Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Maser, E.: Stereochemical aspects of carbonyl reduction of the original anticancer drug oracin by mouse liver microsomes and purified 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Chem.-Biol. Interact.* 143-144, 459-68, 2003
- [47] Wsól, V., Szotáková, B., Skálová, L., Maser, E.: The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Toxicol.* 197, 253-61, 2004
- [48] Maser, E.: Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction, *Biochem. Pharmacol.* 4, 421-440, 1995
- [49] Gavelová, M., Hladíková, J., Novotná, R., Machala, M., Skálová, L.: Effects of selected cytostatic drugs on carbonyl reducing enzymes in human breast carcinoma MCF-7 cells, XX. Biochemický zjazd, Piešťany, 12.-16.9.2006 (poster)
- [50] Oppermann, U. C. T., Maser, E.: Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions, *Toxicology* 144, 71-81, 2000
- [51] Hydman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., Penning, T. M.: The aldo-keto reductase superfamily homepage, *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 621-631, 2003
- [52] Rosemond, M., Walsh, J.: Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study *in vitro*, *Drug metabolism reviews*, Marcel Dekker, 335-361, 2004
- [53] Chang, Q.: Aldo-keto reductases as modulators of stress response, *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 325-332, 2003
- [54] Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafgat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafgat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H.: Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update, *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 247-253, 2003
- [55] Jez, J. M., Penning, T. M.: The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update, *Chem. Bio. Interac.* 130-132, 499-525, 2001
- [56] Hyndman, D., Penning, T. M.: Aldo-Keto Reductase (AKR) Superfamily homepage, Aktualizace 11-2007 [cit. 22.2.2008] www.med.upenn.edu/akr/

- [57] Khanna, M., Qin, K. E., Wang, R. W., Cheng, K. C.: Substrate specificity, gene structure, and tissue-distribution of multiple human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 270, 20162-8, 1995
- [58] Bauman, D. R., Steckelbroeck, S., Penning, T. M.: The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action, *Drug News Perspect* 17(9), 563-576, 2004
- [59] Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M.: Human 3 α -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, *Biochem. J.* 351, 67-77, 2000
- [60] Dufort, I., Labrie, F., Luu-The, V.: Human types 1 and 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: Differential lability and tissue distribution, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 841-6, 2001
- [61] Desmond, J. C. a spol: The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Cancer research* 63, 505-512, 2003
- [62] Brožič, P., Golob, B., Gomboc, N., Rižner, T. L., Gobec, S.: Cinnamic acids as new inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3), *Molecular and cellular endocrinology* 248, 233-235, 2006
- [63] Filling, Ch., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U.: Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases, *J. Biol. Chem.* 277(28), 25677-25684, 2002
- [64] Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H.: Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs), *Chem. Bio. Interact.* 143-144, 271-278, 2003
- [65] Schlager, J. J., Powis, G.: Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol, *Int. J. Cancer* 45, 403-409, 1990
- [66] Lopez de Cerain, A., Marin, A., Idoate, M. A., Tunon, M. T., Bello, J.: Carbonyl reductase and NADPH cytochrome P450 reductase activities in human tumoral versus normal tissues, *Eur. J. Cancer* 35, 320-324, 1999
- [67] Klener, P.: *Klinická onkologie*, Galen a Karolinum, Praha, 2002, 686 S
- [68] Szotáková, B., Skálová, L.: *Indukce a inhibice biotransformačních enzymů*, Xenobiochemie, Hradec Králové, 2006, přednáška
- [69] Pávek, P., Červený, L., Mičuda, S., Štaud, F., Čečková-Novotná, M., Fendrich, Z.: *Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika*

příčina některých lékových interakcí: Pregnanový X receptor (PXR) a konstitutivní androstanový receptor (CAR), *Remedia* 15, 406-9, 2005

[70] Nosková, V., Hajdúch, M., Michál, V., Cwiertka, K.: Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. Atypická MDR. (Mechanisms of multidrug resistance and their clinical implications II. Atypical MDR), *Klin. Onkologie* 2, 10-17, 2000

[71] Nosková, V., Hajdúch, M., Michál, V., Cwiertka, K.: Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. Typická MDR. (Mechanisms of multidrug resistance and their clinical implications I. Typical MDR), *Klin. Onkologie* 2, 4-9, 2000

[72] Nečas, O. a spol.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, 3. české vydání, H&H, Jinočany, 2000

[73] Jaffrezou, J. P., Laurent, G.: Ceramide: A new target in anticancer research, *Electron. J. Oncol.* 2, 1-32, 1999

[74] Lucci, A., Han, T., Liu, Y., Giuliano, A. E., Cabot, M. C.: Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells, *Cancer* 86(2), 300-311, 1999

[75] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B., J., Klenk, D., C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76-85, 1985

[76] Qiagen: *RNeasy Mini Handbook*, 2001

[77] Švecová, L.: Zavedení metody QRT-PCR pro studium indukce 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy, *Diplomová práce*, FaF HK, Hradec Králové, 2005

[78] Červinka, M.: *Úvod do genového inženýrství*, 2. doplněné vydání, Universita Karlova, Praha, 1993

[79] Šimůnek, T.: *Amplifikační a separační metody v molekulární biologii*, *Molekulární biologie*, Hradec Králové, 2007, přednáška

[80] Qiagen: *QuantiTect Probe PCR Handbook*, 2003

[81] Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, *Methods* 25, 402-8, 2001

[82] Srpová, V.: *Studium vlivu některých cytostatik na 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu in vitro*, *Diplomová práce*, FaF HK, Hradec Králové, 2006

[83] Maser, E., Bannenberg, G.: 11-Hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds, *Biochem. Pharmacol.* 47, 1805-1812, 1994

[84] Seckl, J. R., Walker, B. R.: Minireview: 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action, *Endocrinology* 142, 1371–1376, 2001

[85] Akman, S. A., Forrest, G., Chu, F. F., Esworthy, R. S., Doroshow, J. H.: Antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzyme gene expression in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells, *Cancer res.* 50, 1397-1402, 1990.