

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**STUDIUM VLIVU NĚKTERÝCH CYTOSTATIK NA
11 β -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENASU *IN VITRO***

Diplomová práce

Veronika Srpová
Hradec Králové, 2006

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Barboře Szotákové, PhD., Doc. RNDr. Lence Skálové, PhD. a Mgr. Romaně Novotné 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.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Cytostatika	6
2.1.1	Obecná charakteristika.....	6
2.1.2	Doxorubicin a daunorubicin	10
2.1.2.1	Obecné vlastnosti a chemická struktura.....	10
2.1.2.2	Mechanismus účinku	11
2.1.2.3	Indikace.....	12
2.1.2.4	Dávkování a způsob aplikace	12
2.1.2.5	Vedlejší účinky	13
2.1.2.6	Farmakokinetické vlastnosti	18
2.1.2.7	Biotransformace antracyklinů.....	19
2.1.2.8	Enzymová indukce.....	21
2.1.2.9	Enzymová inhibice	22
2.1.2.10	Rezistence na antracykliny	22
2.1.3	Oracin.....	23
2.1.3.1	Obecné vlastnosti a chemická struktura.....	23
2.1.3.2	Mechanismus účinku	23
2.1.3.3	Potenciální indikace	24
2.1.3.4	Biotransformace oracinu	24
2.2	Redukce karbonylové skupiny.....	26
2.2.1	Obecná charakteristika reduktas karbonylu.....	26
2.2.2	Aldo-ketoreduktasy.....	27
2.2.3	Karbonylreduktasy	28
2.2.4	Hydroxysteroiddehydrogenasy	29
2.2.4.1	Obecná charakteristika.....	29
2.2.4.2	Struktura 11 β -HSD	30
2.2.4.3	Intracelulární lokalizace 11 β -HSD	31
2.2.4.4	Tkáňová distribuce 11 β -HSD	31
2.2.4.5	Funkční charakteristika 11 β -HSD	32

2.2.4.6	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasa 2	32
2.2.4.7	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasa 1	33
2.2.4.8	Exogenní substráty 11 β -HSD 1	33
2.2.4.9	Ovlivnění aktivity 11 β -HSD 1	36
3	CÍL PRÁCE	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Užitý materiál	39
4.1.1	Biologický materiál.....	39
4.1.2	Pomůcky a přístroje	39
4.1.3	Chemikálie	40
4.2	Metodika práce	41
4.2.1	Izolace hepatocytů z jater potkanů.....	41
4.2.2	Příprava mikrosomů z hepatocytů	50
4.2.3	Stanovení koncentrace bílkovin.....	52
4.2.4	Stanovení aktivity mikrosomálních reductas spektrofotometricky	53
4.2.5	Stanovení aktivity 11 β -HSD 1 inkubací mikrosomů s oracinem	56
4.2.6	Izolace RNA z hepatocytů	58
4.2.7	Kvantifikace izolované m-RNA metodou QRT-PCR	60
5	VÝSLEDKY	64
5.1	Stanovení koncentrace bílkovin.....	64
5.2	Stanovení aktivity mikrosomálních reductas spektrofotometricky	67
5.3	Stanovení aktivity 11 β -HSD 1 inkubací mikrosomů s oracinem	70
5.4	Kvantifikace izolované m-RNA metodou QRT-PCR	73
6	DISKUSE.....	75
7	ZÁVĚR	79
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	80
	POUŽITÁ LITERATURA	82

1 ÚVOD

Po druhé světové válce prodělala farmakologie obrovský rozvoj. Byly objeveny stovky nových účinných látek, které umožnily využít farmakoterapii i u chorob do té doby neléčitelných. Vývoj nových léčiv však přináší i nová rizika v podobě nežádoucích účinků a větší pravděpodobnosti vzniku významných interakcí, řada látek se vyznačuje velmi úzkou terapeutickou šíří. Tyto faktory vedly k tomu, že všechny rozvinuté státy začaly upravovat vývoj léčiv, jejich výrobu a používání relativně přísnými právními předpisy, které mají zaručit kvalitu, bezpečnost a účinnost vyvíjených léčiv. Všechna nová potenciální léčiva jsou podrobována preklinickému a klinickému výzkumu. V etapě preklinického výzkumu se provádí široká paleta testů, přičemž jsou využívány jak metody *in vitro*, tak i *in vivo*. Veškeré preklinické testy mají v podstatě jeden cíl – předpovědět terapeutický účinek a toxicitu potenciálního léčiva pro použití u člověka. Teprve po vyhodnocení farmakologických a toxikologických testů je možno uvažovat o přípravě klinického hodnocení.

Pro racionální chápání farmakologie a toxikologie je nezbytná znalost metabolismu léčiv (tělu cizích látek, xenobiotik). Osud léčiva v organismu (vstřebávání, distribuce, enzymová deaktivace či aktivace a vylučování) je závislý na jeho chemické struktuře. Často i malá změna struktury může ovlivnit farmakokinetiku léčiva i jeho farmakologický účinek. Metabolické přeměny tělu cizích látek a biotransformační enzymy, které tyto přeměny katalyzují, jsou předmětem studia xenobiochemie. Ta zkoumá i faktory, které mohou mít vliv na aktivitu biotransformačních enzymů.

Předmětem zkoumání této diplomové práce je mikrosomální enzym I. fáze biotransformace řady karbonylových sloučenin - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu I (11 β -HSD 1). Je sledován vliv cytotoxických léčiv daunorubicinu, doxorubicinu a oracinu na aktivitu tohoto enzymu v podmínkách *in vitro* – v hepatocytech získaných z jater laboratorních potkanů. Výsledky některých obdobně zaměřených studií naznačují, že by tato cytostatika mohla aktivitu 11 β -HSD 1 zvyšovat prostřednictvím enzymové indukce. Daunorubicin, doxorubicin a oracin jsou zároveň substráty 11 β -HSD 1, tento enzym se účastní redukce karbonylové skupiny v jejich molekule.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CYTOSTATIKA

2.1.1 Obecná charakteristika

Maligní nádorová onemocnění jsou v dnešní době jednou z hlavních příčin předčasného úmrtí. Chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie jsou hlavními nástroji užívanými k léčbě malignit. Nádorové maligní buňky jsou charakterizovány ztrátou kontroly růstu, invazivitou a metastázováním do tkání. Faktory způsobující vznik nádorů lze rozdělit do tří skupin: fyzikální (radiální energie – UV-záření, paprsky X), chemické (řada chemikálií – různé organické i anorganické sloučeniny bez společného strukturního znaku) a biologické (onkogenní viry). Tyto faktory poškozují nebo pozměňují molekulu DNA [1].

Tabulka 11. Některé chemické karcinogeny [1].

Třída	Sloučeniny
polycyklické aromatické uhlovodíky	benzpyren, dimethylbenzanthracen
aromatické aminy	2-acetaminofluoren, N-methyl-4-aminoazobenzen
nitrosaminy	dimethylnitrosamin, diethylnitrosamin
anorganické sloučeniny	arsen, asbest, berylium, kadmium, chrom
přirozeně se vyskytující látky	daktinomycin, aflatoxin B ₁
některé léky	alkylační látky, diethylstilbestrol

Systematické klinické zkoušení farmak s cytostatickým 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 identifikováno na 50 farmak různých farmakologických skupin. V současnosti je terapeuticky ovlivnitelná řada maligních onemocnění i v pokročilém stavu, nicméně většina nádorů může být chemoterapeuticky léčena pouze paliativně. K této skutečnosti přispívají faktory, které odpověď na farmakoterapii významně snižují a zhoršují tak prognózu onemocnění. Patří k nim poškození funkce eliminujícího orgánu (pro vysokou toxicitu farmaka), vyšší věk (kdy bývá farmakologie cytostatika změněna) nebo okolnosti, které podmiňují rozvoj sekundární rezistence.

Farmakodynamika (terapeutické a toxické účinky) a farmakokinetika cytostatik je v popředí odborného zájmu počínaje analýzou *in vitro* až po klinické hodnocení. Cílem je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek (dlouhodobou kompletní remisi) při minimální toxicitě a za současné prevence vývoje rezistence. V současné době se směřuje k dosažení tohoto cíle zvyšováním dávek (vysokodávková chemoterapie), kombinací cytostatik, využitím podpůrné terapie nebo léčby antagonisty, kombinací cytostatik s jinou terapií (chirurgickou, radioterapií), biochemickou modulací účinku, vhodnou cestou podání cytostatik a využitím významu cirkadiálních rytmů pro farmakologii cytostatik. Nově se hledá vztah mezi cytostatickým účinkem a kinetikou jednotlivých cytostatik, který by sloužil k predikci terapeutického i toxického účinku a také k odhadu individuálního dávkového režimu [2].

Klasifikace cytostatik bývá uváděna podle různých kritérií, nejčastěji jsou tříděny podle mechanismu účinku a původu účinných látek.

Tabulka 22. Některé látky užívané v chemoterapii nádorů [1,3].

Třída látek	Příklady	Mechanismus účinku
alkylační látky	chlormethin, melfalan, chlorambucil, cyklofosamid	alkylují DNA
antimetaboly		
antagonisté kyseliny listové	methotrexát	inhibují dihydrofolátreduktasu
antagonisté purinů	merkaptopurin, tioguanin, kladribin, fludarabin	ve formě nukleotidů inhibují syntézu DNA
antagonisté pyrimidinů	fluorouracil, cytarabin	ve formě nukleotidů inhibují syntézu DNA (fluorouracil inhibuje thymidylátsynthetasu)
protinádorová antibiotika	doxorubicin, daunorubicin, daktinomycin, mitoxanthron	vmezeřují se do DNA a stabilizují komplex DNA-topoisomerasa II
rostlinné alkaloidy	vinkristin, vinblastin, paklitaxel	vážou se na tubulin v mikrotubulech, mitotické jedy
steroidní hormony	(anti)estrogeny, (anti)androgeny, glukokortikoidy	ovlivňují hormon-dependentní nádory
ostatní	cisplatina asparginasa prokarbazin	různý

Cytostatická terapie je téměř pravidelně provázena řadou **nežádoucích účinků**, z nichž některé mohou ohrozit i život pacienta. Vysoká incidence nežádoucích účinků je způsobena tím, že cytostatika jako léky inhibující buněčnou proliferaci jsou léky neselektivní, inhibice proliferace se tedy týká jak buněk nádorových, tak buněk normálních. Právě poškození normálních proliferujících buněčných populací (kostní dřeň, epitel trávicího traktu aj.) je odpovědné za nejzávažnější nežádoucí účinky cytostatik. K nežádoucím účinkům chemoterapie nádorových onemocnění patří poškození krvetvorby (postihuje především bílou a destičkovou řadu), kožní změny (hyperpigmentace, folikulitida, alopecie), gastrointestinální toxicita (mukositida, nauzea a zvracení), orgánová toxicita (kardiotoxicita, pneumotoxicita, nefrotoxicita a urotoxicita, neurotoxicita), infertilita, teratogenní účinky, paradoxně i mutagenní a kancerogenní účinky [3]. Důležitá je tedy profylaxe a léčba nežádoucích a toxických účinků cytostatik.

Tabulka 33. Podpůrná terapie v prevenci nežádoucích účinků a toxicity cytostatik [2].

Nežádoucí účinek	Cytostatika	Prevence
nauzea, zvracení	všechna s rozdílnou intenzitou (zj. cisplatina, cyklofosfamid)	metoklopramid v kombinaci s dexamethasonem, antagonisté 5-HT ₃ -receptorů
myelosuprese	všechna s rozdílnou intenzitou (zj. alkylující látky, merkaptopurin)	GM-CSF, G-CSF, erythropoetin, trombopoetin, amifostin, IL-3
nefrotoxicita	methotrexát	leukovorin
	cisplatina	forsírovaná diuréza, hydratace, amifostin, thiosulfát
ototoxicita	cisplatina	amifostin
hemorhagická cystitida	cyklofosfamid, ifosfamid	mesna
kardiomyopatie	antracykliny	dexrazoxan
polyneuropatie	Vinca-alkaloidy	amifostin

Velká pozornost se věnuje prevenci rozvoje **rezistence** na cytostatickou léčbu. Rezistence může být vnitřní - primární (dané léčivo nebylo nikdy účinné pro cílové buňky, nedostatečná odpověď na léčbu cytostatikem) a získaná - sekundární (léčivo bylo na počátku terapie účinné, po určité době se však u nádorových buněk vyvíjí mechanismus, který způsobuje, že je léčivo neúčinné). Rezistence může být nejenom k danému cytostatiku, ale i k ostatním strukturně nepříbuzným protinádorovým látkám. Tento jev je znám jako mnohočetná léková rezistence (MDR) [1]. K rezistenci nádorových buněk na cytostatika přispívají mechanismy týkající se farmakokinetiky i farmakodynamiky. Buňka ovlivňuje kinetiku cytostatika snížením jeho vstupu do buňky, zvýšením jeho efluxu do extracelulárního prostoru, redukcí metabolické aktivace cytostatika na účinnou látku nebo zrychlenou přeměnou na neúčinný metabolit. Změny ve farmakodynamice zahrnují reparaci defektních cílových makromolekul (poškozených předchozí chemoterapií), amplifikaci příslušných genů a zmnožení cílových makromolekul [2].

Tabulka 44. Některé biochemické mechanismy lékové rezistence u nádorových buněk [2,4].

Cytostatika	Mechanismus rezistence
alkylační látky	snížení permeability buněčné stěny pro tyto látky, pokles konjugace na thiometabolity (nedostatečná aktivace), zvýšená reparace poškozené DNA
methotrexát	snížení vstupu do buňky (mutantní přenašečový systém), mutace v cílovém enzymu (mutantní dihydrofolátreduktasa), zvýšená aktivita cílového enzymu (dihydrofolátreduktasy)
cytarabin	zvýšená aktivita deaminas působících na cytosin (zvýšená inaktivace)
Vinca alkaloidy	změna cílové struktury (tubulinu)
cisplatina	zvýšení jednoho typu metalothioneinu (zvýšená inaktivace)
některá cytostatika	zvýšený výstup z buňky zprostředkovaný P-glykoproteinem (P-gp)

2.1.2 Doxorubicin a daunorubicin

2.1.2.1 Obecné vlastnosti a chemická struktura

Doxorubicin (DOX) a daunorubicin (DAU) patří mezi antracyklinová antibiotika, která se řadí k nejúčinnějším a široce užívaným antineoplastickým léčivům [5]. Jsou to metabolity aktinomycet. První poznatky o této skupině látek pocházejí z r.1962, kdy byl ve Francii z plísně *Streptomyces coeruleorubidus* izolován rubidomycin a téměř současně v Itálii z plísně *Streptomyces peucetius* daunorubicin. Pozdější studie ukázaly, že jde o identické látky dnes označované jako daunorubicin. Doxorubicin byl izolován v r. 1967 z plísně *Streptomyces peucetius var. caesius* [6]. Pro klinické účely se užívají stabilnější hydrochloridy.

Doxorubicin (také znám jako adriamycin) je chemicky (8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy-*a*-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy] - 6,8,11 - trihydroxy - 8 - (hydroxyacetyl) -1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion.

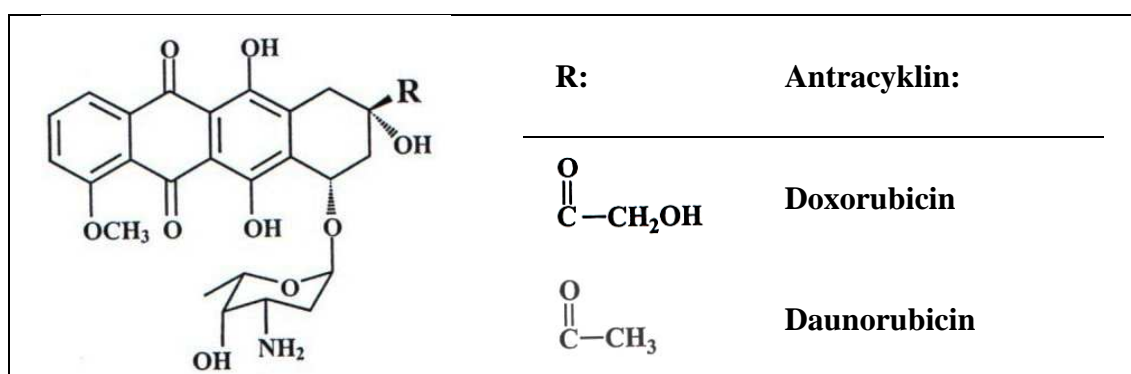
Sumární vzorec doxorubicin-hydrochloridu: $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$

Molekulová hmotnost doxorubicin-hydrochloridu: Mr 579,99 [7].

Daunorubicin (také znám jako rubidomycin) je chemicky (8S,10S)-8-acetyl-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy-*a*-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy] - 6,8,11 - trihydroxy - 1-methoxy-5,7,8,9,10,12-hexahydrotetracen-5,12-dion.

Sumární vzorec daunorubicin-hydrochloridu: $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$

Molekulová hmotnost daunorubicin-hydrochloridu: Mr 563,99 [7].



Obrázek 11. Chemická struktura doxorubicinu a daunorubicinu.

Chemická struktura antracyklinových antibiotik (ANT) je dosti specifická. Jsou to glykosidy, jejich molekula se skládá z chinonového aglykonu, jehož základ tvoří částečně hydrogenovaný tetracen. Na aglykon je napojen bazický monosacharid daunosamin. Obměny v aglykonové části molekuly vedou většinou ke snížení

cytostatické aktivity, pro zachování účinku je nezbytná i přítomnost cukerné složky a volné bazické aminoskupiny. Rozsáhlý konjugovaný systém aglykonu podmiňuje selektivní absorpci světla ve viditelné oblasti spektra. Důsledkem toho je červené zbarvení antracyklinů, které může zbarvovat moč pacientů [6].

Doxorubicin-hydrochlorid je oranžovočervený krystalický hygroskopický prášek dobře rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v methanolu. Daunorubicin-hydrochlorid je oranžovočervený krystalický hygroskopický prášek snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, těžce rozpustný v lihu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu [7].

2.1.2.2 Mechanismus účinku

Přestože je známo, že antracykliny mají schopnost zasahovat do řady biochemických a biologických funkcí eukaryotických buněk, přesný mechanismus jejich cytotoxických a antiproliferativních účinků nebyl dosud plně vysvětlen. Po průniku do buňky se molekula ANT váže převážně na chromatin. Experimentální důkazy svědčí pro to, že tvoří komplex s DNA interkalací svých planárních cyklů mezi páry nukleotidových bazí. Důsledkem tohoto vsunutí je výrazné narušení syntézy DNA, DNA-dependentní syntézy m-RNA a proteosyntézy. Nejnovější experimentální důkazy naznačují, že interkalace spouští štěpení DNA pomocí inhibice topoisomerasy-II, což vede k závažnému narušení terciární struktury DNA. Tento účinek byl pozorován při takové koncentraci léčiv, která je v rozmezí klinické léčebné dávky. O ANT je rovněž známo, že se podílejí na oxidačních a redukčních reakcích: řada NADPH-dependentních buněčných reductas je schopna redukovat DOX a DAU na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních cytotoxických sloučenin (např. superoxid, hydroxylové radikály a H_2O_2). Tvorba volných radikálů vede také ke kardiotoxicitě ANT (viz 2.1.2.5 Vedlejší účinky). Další místo působení ANT může být na úrovni buněčné membrány: léčivo se může vázat na lipidy buněčné membrány a může ovlivnit řadu funkcí. Cytotoxicita a antiproliferativní účinnost ANT mohou vycházet z některých shora uvedených mechanismů, ale mohou se uplatňovat i další procesy [8].

Účinek ANT je fázově nespecifický, avšak nejvyšší účinnost ANT vykazují v S-fázi buněčného cyklu. ANT jsou cytotoxické zj. pro rychle proliferující buňky (nádorová tkáň, ale i kostní dřev, GIT sliznice a sliznice dutiny ústní, vlasové folikuly) [9].

2.1.2.3 Indikace

Doxorubicin je používán v terapii v hematologických malignit: součástí terapie nehodgkinských lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastické a myeloblastické leukémie, chronické lymfatické leukémie. Ze solidních tumorů patří mezi indikace doxorubicinu karcinom prsu, vaječníku, endometria, prostaty, nonseminom, osteosarkom, sarkomy měkkých tkání, malobuněčný bronchogenní karcinom, karcinomy hlavy nebo krku, neuroblastom, karcinom štítné žlázy, karcinom žaludku, hepatocelulární karcinom, Wilmsův tumor, karcinom močového měchýře. Intravezikálně se užívá u povrchového karcinomu močového měchýře. Doxorubicin je alternativou k léčbě výpotků v intrapleurální a intraperitoneální dutině [8].

Daunorubicin je podobný doxorubicinu. Používá se zejména při indukční terapii akutní lymfoblastické nebo myeloblastické leukémie, ne k léčbě solidních tumorů [9], patrně pro nižší distribuci do tkání [2]. V současnosti se na rozdíl od doxorubicinu v terapii nádorových onemocnění prakticky neuplatňuje. V ČR není momentálně registrován žádný hromadně vyráběný léčivý přípravek s daunorubicinem jako hlavní účinnou látkou.

2.1.2.4 Dávkování a způsob aplikace

Doxorubicin se aplikuje intravenózně nebo intravezikálně. Dávka se vypočítává na základě plochy tělesného povrchu (mg/m^2). Dávkovací schéma podávání doxorubicinu se může lišit podle indikace (solidní tumory nebo akutní leukémie) a podle toho, v jakém léčebném režimu je lék používán (v monoterapii či v kombinaci s jinými cytotoxickými látkami nebo jako součást multidisciplinárních postupů, které zahrnují kombinaci chemoterapie, chirurgického zákroku a případně radioterapie a hormonální terapie).

Intravenózní podávání doxorubicinu je třeba provádět opatrně. Doporučuje se podávat doxorubicin do kanyly volně protékající i.v. infuzí (izotonický roztok chloridu sodného nebo 5% roztok glukózy). Aplikace by měla trvat 3-5 minut. Tento postup slouží k minimalizaci nebezpečí vzniku trombózy a perivenózní extravazace, která může vést k těžké celulitidě, ke vzniku puchýřů a k nekróze tkáně. Přímá i.v. injekce se nedoporučuje kvůli nebezpečí extravazace, ke které může dojít i při odpovídajícím návratu krve po aspiraci jehlou.

Léčba solidních nádorů: Jestliže se doxorubicin podává v monoterapii, doporučená dávka pro jeden léčebný cyklus je 60-75 mg/m² každé tři týdny. Během jednoho cyklu se lék podává obvykle v jedné dávce, je však možné během cyklu dávku rozdělit do několika aplikací. Podávání doxorubicinu v týdenním režimu se ukázalo být stejně účinné jako aplikace v třítydenních cyklech. Doporučená dávka na jeden týden je 10-20 mg/m². Při tomto časovém harmonogramu podávání by mohla být toxicita léku nižší, zj. jeho účinky na srdce. Celková kumulativní dávka by neměla být vyšší než 550 mg/m².

Léčba akutních leukémií: V terapii se využívá různých schémat útočné kombinované chemoterapie. V této situaci je doporučená dávka doxorubicinu 75-90 mg/m². Tato dávka se podává rozdělená do tří aplikací v průběhu tří po sobě následujících dnů (jeden cyklus). Načasování a dávka pro druhý cyklus se řídí podle stavu kostní dřeně a periferních krevních buněk. Interval mezi cykly by měl však být nejméně 10 dnů.

Doxorubicin podávaný *intravezikálně* může být použit v léčbě superficiálních tumorů močového měchýře nebo v profylaxi recidiv nádorů po transuretrální resekci. Doporučená dávka doxorubicinu pro lokální intravezikální terapii superficiálních tumorů močového měchýře je 30-50 mg ve 25-50 ml fyziologického roztoku na jednu instilaci. Optimální konc. se pohybují okolo 1,0 mg/ml. Po instilaci roztoku by pacienti měli měnit polohu těla, s otočením o čtvrt otáčky každých 15 minut. Obecně platí, že instilát může být v měchýři ponechán po dobu 1-2 hodiny. Aby se zabránilo nežádoucímu naředění instilovaného roztoku močí, pacienti by měli být poučeni, aby 12 hodin před instilací nepili žádnou tekutinu. Jednotlivé instilace lze opakovat v intervalech od jednoho týdne do jednoho měsíce podle toho, zda se jedná o podávání terapeutické nebo profylaktické. Celková resorpce DOX po intravezikální instilaci je velmi nízká [8].

Daunorubicin se aplikuje v dávce 40-60 mg/m² nitrožilně po 3 dny s následnou tří- až čtyřtydenní přestávkou. V kombinacích je dávkování upraveno [9].

2.1.2.5 Vedlejší účinky

Antracykliny (zj. DOX) jsou účinné proti širokému spektru tumorů, ale nehledě na obecné vedlejší účinky cytostatik (nauzea, zvracení, alopecie, myelosuprese) je jejich klinický užitek limitován kardiotoxicitou (na kumulativní dávce závislou), která může vyústit až v městnavé srdeční selhání. To může být fatální (až 60% případů) [5].

Kardiální účinky. U pacientů užívajících doxorubicin či daunorubicin se mohou objevit následující typy kardiotoxicity:

Akutní kardiotoxicita, která nebývá častá, je přechodná (reverzibilní) event. klinicky zvládnutelná antidysrytmiky. Objevuje se bezprostředně po první dávce (během 24 hodin) nebo jako následek první léčebné kúry. Projevuje se abnormálním nálezem na EKG (změny v úseku ST-T, prodloužení QT intervalu) a arytmiemi. Po skončení arytmií může terapie pokračovat, obecně se akutní toxicita nepovažuje za indikaci k ukončení léčby antracyklinovými antibiotiky [2].

Dlouhodobější podávání antracyklinů způsobuje *chronický typ kardiotoxicity* představovaný kardiomyopatií, která může vést ke vzniku městnavé srdeční slabosti. Souvisí s kumulativní dávkou, řada studií došla k závěru, že riziko vzniku městnavé srdeční slabosti prudce vzrůstá při nepřítomnosti ostatních kardiálních rizikových faktorů v okamžiku, kdy celková konc. doxorubicinu dosáhne prahové hodnoty 550 mg/m². Kardiomyopatie je projevem kumulativní toxicity antracyklinů, která limituje dávku. Závažnému kardiálnímu poškození lze předejít pravidelným sledováním v průběhu léčby [8]. Klinicky se manifestuje náhle (během prvního roku léčby, nejčastěji během 1-2 měsíců po poslední dávce) a rychle progreduje. Je poměrně rezistentní na léčbu, může ohrozit život nemocného, její prognóza bývá vážná. K jejím známám patří tachykardie, tachypnoe, dilatace srdce, plicní a venózní kongesce, pleurální výpotky. Příčinou je poškození a progresivní ztráta myocytů, která je zprvu funkčně kompenzována zbylými myocyty, tudíž často uniká pozornosti. S růstem kumulativní dávky se však prohlubuje pokles stažlivosti myokardu a klesá ejekční frakce. Následkem může být akutní srdeční dekompenzace.

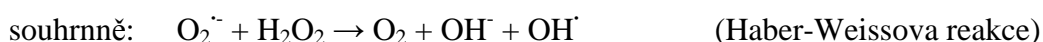
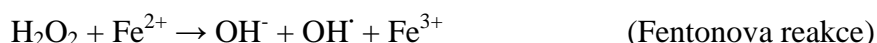
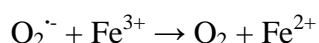
Pozdní kardiotoxicita se může manifestovat po více letech až desetiletích (4-20 let) od ukončení léčby. Projevuje se poruchami vodivosti a tachyarytmiemi. Poškození myocytů a dysfunkce komor mívá za následek pozdní dekompenzaci srdce. Tento typ byl popsán i u dětí [2].

Mnoho úsilí už bylo vynaloženo na objasnění mechanismu tohoto vážného toxického účinku antracyklinů, přesto přesný mechanismus kardiotoxicity není doposud znám. Dosavadní poznatky naznačují existenci jednak mechanismu závislého na tvorbě volných radikálů (hraje stěžejní roli v patogenezi antracykliny vyvolané kardiotoxicity) a jednak mechanismů na volných radikálech nezávislých.

- Jsou dvě hlavní cesty tvorby volných radikálů:

1) *Redoxní cyklický děj*

Chinonová struktura v jejich molekule působí jako elektronový akceptor, redukuje se na semichinon (přenos elektronu katalyzován flavoproteinovými enzymy), který reaguje s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu $O_2^{\cdot-}$, přičemž se regeneruje chinon. $O_2^{\cdot-}$ radikál se může vyskytovat samovolně nebo je přeměněn superoxidodismutasou (SOD) na H_2O_2 . Molekula H_2O_2 je relativně stabilní, tvorba OH^{\cdot} z H_2O_2 je závislá na katalytické roli železa:



Vysoce reaktivní hydroxylový radikál může přímo poškodit DNA a může vést k lipidové peroxidaci. To má za následek produkci velkého množství relativně stabilních aldehydů (např. malondialdehydů, 4-hydroxyalkenalů, alkanalů). Tyto cytotoxické aldehydy jsou extrémně reaktivní, mohou difundovat uvnitř buňky nebo dokonce skrz plazmatické membrány a napadají makromolekulární cílové struktury vzdálené od místa jejich vzniku. Mohou působit jako „druzí cytotoxičtí poslí“ [5].

2) *Tvorba antracyklin-železitého komplexu [ANT-Fe³⁺]*

Tento komplex je stabilní, tvoří se mezi antracykliny a ionty železa z myoglobinu a hemoglobinu [2]. Může být redukován na ANT-Fe²⁺ komplex buď enzymaticky různými flavoproteiny nebo pomocí redukčních agens o malé molekulové hmotnosti (např. GSH, cystein). V nepřítomnosti redukčního systému může být železo v komplexu ANT-Fe³⁺ redukováno při intramolekulární oxidaci antracyklinové molekuly za vzniku ANT_{ox}-Fe²⁺. Komplex ANT-Fe²⁺ či ANT_{ox}-Fe²⁺ reaguje s O_2 a H_2O_2 za vzniku $O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} radikálů.

Kardiomyocyty jsou hodně citlivé na oxidační stres vyvolaný podáváním antracyklinů ve srovnání s jinými tkáněmi. Důvodem je vysoká akumulace antracyklinů v kardiomyocytech, bohatost kardiomyocytů na mitochondrie (ty jsou důležitým cílem molekulárního působení antracyklinů) a relativně chudý antioxidační obranný systém v kardiální tkáni oproti ostatním tkáním (nízká aktivita klíčových antioxidačních enzymových systémů – SOD, katalasy, GSH-peroxidasy) [5].

- Na volných radikálech nezávislé mechanismy:

Studie na laboratorních zvířatech ukázaly, že chronická kardiomyopatie není vždy doprovázena biochemickými ukazateli oxidačního poškození myokardu [10]. Existenci jiných mechanismů, nezávislých na tvorbě volných radikálů, podporuje fakt, že antioxidanty přinesly užitek v prevenci či oddálení chronické kardiotoxicity u hlodavců [11], ale ne u psů [12] ani u člověka [13,14]. Některé studie předpokládají, že chronická kardiomyopatie se rozvíjí až po konverzi DOX a DAU na odpovídající sekundární alkoholy (13-hydroxyantracykliny) – doxorubicinol a daunorubicinol. Tuto hypotézu podporuje fakt, že doxorubicinol (ale ne DOX) se akumuluje v srdeční tkáni po dlouhodobém podávání cytostatika potkanům. Navíc doxorubicinol je silnější inhibitor výměny $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ v sarkolemě než DOX [10,15,16]. *In vitro* je akutní kardiotoxický účinek doxorubicinolu a daunorubicinolu podstatně vyšší než u mateřských látek [17]. Dále se v rozvoji kardiotoxicity uplatňuje i uvolnění histaminu po podání ANT [18,19], porucha homeostázy vápníku v kardiálních buňkách [20,21], interference s autonomní kontrolou srdce (s parasympatickým i sympatickým systémem) [22-24].

Multifaktoriální a nekompletně objasněná patogeneze ANT-vyvolané kardiotoxicity částečně vysvětluje mnoho testovaných sloučenin a jiných přístupů ve snaze snížit tento toxický účinek. Prevence může být částečně dosaženo užitím kardioprotektivních agens, modifikací dávkovacího režimu nebo podáním analogů antracyklinů méně toxických než DOX a DAU. Mezi kardioprotektivní sloučeniny ovlivňující mechanismus kardiotoxicity závislý na volných radikálech patří dexrazoxan. Tato bisdioxopiperazinová sloučenina původně vyvinutá jako cytostatikum je jedinou schválenou látkou pro klinické použití k profylaxi ANT-kardiotoxicity. Protektivní účinek dexrazoxanu (ICRF-187) je nejspíše způsoben chelatací železa z ANT-Fe komplexů či vyvázáním volného železa a následnou redukcí tvorby volných radikálů. Terapeutická odpověď a nekardiální toxicita ANT zůstává po jejich podání spolu s dexrazoxanem nezměněna [5]. Možná role doxorubicinolu a daunorubicinolu v rozvoji chronické kardiomyopatie vede k předpokladu, že klinické užití antracyklinů by mohlo být vylepšeno minimalizací jejich přeměny na tyto metabolity. Některé studie ukazují, že snížená exprese enzymů podílejících se na redukcí karbonylové skupiny antracyklinů chrání před ANT-indukovanou kardiotoxicitou [25], stejně tak i užití inhibitorů těchto reductas [26].

Hematologické účinky. Hlavním projevem hematologické toxicity je reverzibilní leukopenie. Tato leukopenie je závislá na dávce a představuje akutní projev toxicity antracyklinů, jež limituje dávku léku. Léčbou jsou nejvíce postiženy neutrofilie, může se však rovněž objevit trombocytopenie a anemie. Během terapie doxorubicinem je nezbytně nutné provádět hematologické sledování pacienta. Pokles počtu krevních elementů dosahuje svého maxima obvykle za 10-14 dnů po podání léčiva. U pacientů s normální regenerační kapacitou kostní dřeně se počty krevních elementů upravují zpět na hodnoty před léčbou do konce třetího týdne. Při režimech vysokodávkové chemoterapie, které zahrnují podávání antracyklinů v kombinaci s dalšími myelosupresivními látkami, lze použít prostředky na podporu kostní dřeně.

U pacientů, kteří byli současně léčeni antracykliny v kombinaci s antineoplastickými látkami poškozujícími DNA, byl vzácně pozorován výskyt sekundární akutní myeloidní leukémie, s nebo bez preleukemické fáze. Tyto případy mohou mít krátké období latence (1-3 roky).

Gastrointestinální účinky. U pacientů, kteří jsou léčeni antracykliny, se může objevit mukositida (především stomatitida, méně často esofagitida). Stomatitida se objevuje záhy po podání léku (častěji u nemocných léčených vícedenní aplikací) a je-li závažnějšího charakteru, může během několika dnů progredovat do slizničních ulcerací. Tento stav se však u většiny pacientů upraví do třetího týdne terapie. V den podání léku se může rovněž objevit nauzea a zvracení, příp. bolesti břicha a průjemy. Výskytu závažnější nauzey a zvracení lze zabránit nebo je zmírnit nasazením vhodné antiemetické terapie.

Dermatologické účinky. Často se objevuje alopecie včetně zastavení růstu vousů (asi 85% léčených osob). Tento vedlejší účinek často vyvolává u pacientů velké obavy, obvykle je však reverzibilní a během dvou až tří měsíců od ukončení terapie se růst všech vlasů opět obnoví. Může se vyskytnout hyperpigmentace kůže, zčervenání, urtikarie a hypersenzitivita na ozáření.

Účinky v místě aplikace injekce. Nepříliš vzácné jsou erytematózní proužky podél žíly, do které se lék infunduje. Tyto proužky mohou předcházet lokální flebitidu či tromboflebitidu. Riziko lze minimalizovat dodržováním doporučeného postupu pro podávání léku. Rovněž se může vyvinout fleboskleróza, zj. pokud se léčivo opakovaně podává infuzí do malé žíly. V případě perivenózní extravazace léku se objeví lokální bolestivost, celulitida závažného stupně a nekróza tkáně.

Mezi **ostatní** méně časté nepříznivé účinky patří horečka a pocity mrazení, konjunktivitida, slzení a anafylaxe. U žen se může objevit amenorrhoea a u mužů azoospermie v ejakulátu. Stejně jako i jiné protinádorové léky, vyvolává podávání antracyklinů hyperurikémii, jež se objevuje v důsledku extenzivního katabolismu purinů, jež doprovází rychlou buněčnou destrukci vyvolanou léčivem. Hydratace, alkalizace moči a podávání alopurinolu pomohou zabránit nebo minimalizovat nepříznivé účinky hyperurikémie [8].

2.1.2.6 Farmakokinetické vlastnosti

- Resorpce

Antracykliny nejsou po p.o. podání resorbovány z GIT. Protože jde o léčiva s mimořádně iritačním účinkem na tkáň, musí být podávány intravenózně. Jako vhodné se ukázalo u DOX také intravezikální podání, po intravezikální aplikaci je průnik léku do systémového oběhu minimální.

- Distribuce

Doxorubicin se rychle a ve velké míře distribuuje do extravaskulárních kompartmentů, jak je zřejmé z rychlého počátečního plazmatického poločasu (5-10 min) a podle distribučního objemu v ustáleném stavu (20-30 l/kg). Doxorubicin se přibližně ze 75% váže na bílkoviny krevní plazmy. Tato vazba nezávisí na koncentraci plazmy až do 2 μM [8]. Distribuce do tkání je u DAU nižší než u DOX [2]. Antracykliny v detekovatelném množství nepronikají hematoencefalickou bariérou, avšak prostupují placentární bariérou [8].

- Metabolismus

ANT jsou metabolizovány ve značném rozsahu, a to hlavně játry [8]. Biotransformace antracyklinů se ubírá primárně cestou redukce karbonylové funkční skupiny. C13-ketoantracykliny jsou konvertovány na C13-hydroxymetabolity *in vitro* i *in vivo*. Tím dochází ke zvýšení polaritě molekuly (C13-hydroxymetabolity jsou ve vodě rozpustné), která může být následně konjugována s glukuronovou kyselinou či glutathionem a vyloučena z těla ven [27-31]. Podrobněji je redukce ANT na odpovídající alkoholy rozebrána v kapitole 2.1.2.7 Biotransformace antracyklinů.

Kromě hlavních metabolitů ANT doxorubicinolu a daunorubicinolu, které jsou ve vodě rozpustné, jsou v menší míře tvořeny i jiné metabolity. Rozštěpením glykosidické vazby v molekule ANT vznikají ve vodě slabě rozpustné aglykony (doxorubicinu/daunorubicinu či alkoholů doxorubicinolu/daunorubicinolu) a deoxyformy aglykonů. K odštěpení aminocukru dochází v mikrosomech působením NADPH-dependentní cytochrom P450 reduktasy [32].

- Vylučování

Po i.v. podání procházejí plazmatické hladiny DOX multifázovým poklesem s terminálním poločasem $T_{1/2} = 20-48$ hod. Terminální poločas doxorubicinolu je podobný poločasu doxorubicinu. Plazmatická clearance probíhá rychlostí 8-20 ml/min/kg a je založena zj. na metabolismu a na vylučování léku žlučí. Tato pomalá eliminace z plazmy může být ještě prodloužena u pacientů se zhoršenou funkcí jater, odbourávání doxorubicinu probíhá ve značné míře metabolickou konverzí na řadu méně aktivních či neaktivních produktů. 40-50% podané dávky přechází do žluči a stolice během 7 dnů. Vylučování ledvinami se děje v menší míře a představuje pouze 5-10% podané dávky během 5 dnů.

U daunorubicinu je to obdobné, vylučuje se převážně játry, částečně ledvinami. Mizení z plazmy je třífázové s poločasy 11 min, 3 hod a 25 hod [2].

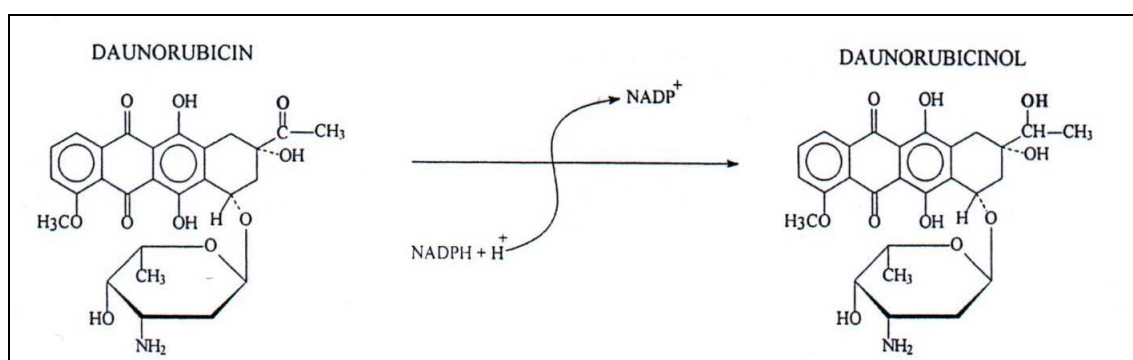
2.1.2.7 Biotransformace antracyklinů

Obecným principem biotransformace je změna struktury léčiva s cílem usnadnit jeho eliminaci z organismu. V I. fázi biotransformace se mateřská látka mění na polárnější metabolity připojením či odhalením hydrofilních funkčních skupin. Této fáze biotransformace se účastní enzymy hydrolytické, redukční či oxidační. Polárnější produkt je schopen reagovat s konjugacími enzymy (enzymy II. fáze biotransformace), přičemž vzniklý konjugát je velmi polární a je snadno vylučován z organismu. Každé xenobiotikum nemusí procházet oběma fázemi [33].

Chinonový skelet antracyklinů může podstupovat konverzi na reaktivní semichinon popsanou v kapitole zabývající se jejich kardiotoxicitou. Jednoelektronová redukce probíhá za přítomnosti flavinových enzymů [5].

Doxorubicinol a daunorubicinol vznikají po dvouelektronové redukci C13 karbonylové skupiny postranního řetězce, která je zprostředkována cytosolickými i mikrosomálními reduktasami [34]. Řada studií se snaží identifikovat reduktasy

zapojené v biotransformaci ANT a získat více poznatků o funkci a substrátové specifitě těchto reductas. Redukce karbonylu endo- a xenobiotik je všeobecně katalyzována členy dvou proteinových nadrodin: AKR (aldo-ketoreduktasy) a SDR (dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem) [35,36]. V lidských játrech byly identifikovány 3 cytosolické enzymy schopné katalyzovat u DAU redukci karbonylu: aldehydreduktasa (ALR 1; AKR1A1; EC 1.1.1.2), dihydrodioldehydrogenasa 2 (DD2; AKR1C2; 3 α -HSD; EC 1.3.1.20) a karbonylreduktasa (CR; EC 1.1.1.184). ALR 1 a DD2 patří do nadrodiny AKR enzymů, CR do SDR nadrodiny. Pro průběh enzymové redukce ANT je nutná přítomnost NADPH jako donoru elektronů. CR má pH optimum v rozmezí 6,3-6,5; pro DD2 leží pH optimum v rozmezí 6,0-6,3 a optimální pH pro činnost ALR 1 je 8,0-8,3. CR se od ALR 1 liší ve schopnosti redukovat aromatické ketony a v její citlivosti vůči specifickým inhibitorům. Katalytická účinnost DD2 pro redukci DAU je nižší než katalytická účinnost CR a ALR 1, DD2 je minoritní reduktasou ANT [37]. Kromě toho v ovariálních buňkách čínské křečka byla objevena vysoce exprimovaná neznámá AKR, která katalyzuje redukci karbonylu u DAU. Tato reduktasa vykazuje 70% sekvenční identitu s aldoreduktasou (ALR 2; AKR1B1; EC 1.1.1.21) [38]. Ukázalo se, že i některé mikrosomální hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD) mají kromě své aktivity vůči fyziologickým steroidním substrátům schopnost katalyzovat redukci xenobiotik typu nesteroidních karbonylových sloučenin [39,40]. Mikrosomální ANT-karbonyl redukce (stejně tak i cytosolická) je inducibilní, přispívá k cytosolické tvorbě doxorubicinolu a daunorubicinolu [41].



Obrázek 22. Schéma redukce karbonylu v molekule daunorubicinu [42]. Obdobně probíhá i redukce karbonylu doxorubicinu.

2.1.2.8 Enzymová indukce

Indukce biotransformačních enzymů je adaptivní odpovědí organismu na přítomnost některých xenobiotik, kterou se snaží bránit před jejich akumulací a toxicitou [33]. Enzymovou indukci lze definovat jako nárůst aktivity specifického enzymu, která je důsledkem zvýšení exprese příslušného genu (tzv. transkripční mechanismus indukce), snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA (netranskripční mechanismy indukce) [43,44]. Proces indukce tedy trvá vždy určitou dobu. Vzestup aktivity biotransformačního enzymu díky chemické indukci může odražet dřívější, tedy nesoučasnou, přítomnost induktoru. Velikost indukce závisí na dávce (koncentraci) induktoru a trvání expozice. Indukční účinek xenobiotika je velmi druhově specifický [45-47]. Některé induktory zvyšují aktivitu pouze jediného enzymu (isoformy), většina však působí současně zvýšení aktivity několika biotransformačních enzymů eventuálně i transportních systémů. Mechanismus indukčního působení je u několika nejznámějších induktorů detailně prozkoumán, u jiných je zatím pouze naznačen [48].

Řada studií se zabývá možnou indukcí enzymů redukujících karbonylovou skupinu antracyklinů, protože doxorubicinol a daunorubicinol jsou *in vitro* podstatně méně účinné v inhibici růstu nádorových buněk než mateřská léčiva [49-51]. Redukce karbonylu je tedy významným biochemickým mechanismem v detoxikaci ANT. Proto zvýšené hladiny enzymů redukujících ANT-karbonyl představují doplňkový mechanismus v rozvoji získané resistance nádorových buněk vůči ANT, které pro svůj farmakologický účinek potřebují keto-skupinu. Bylo zjištěno, že přidávání postupně se zvyšující subletální koncentrace DOX či DAU do živného média lidských buněk karcinomu pankreatu (senzitivních a rezistentních linií) vede k indukci reduktas ANT-karbonylu 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 karbonylu. Při koncentraci 1 µg/ml ANT už senzitivní buňky vykazovaly morfologické alterace a sníženou životaschopnost, zatímco v rezistentních buňkách dosahovala inaktivace ANT maxima [42,52].

2.1.2.9 Enzymová inhibice

Inhibice metabolismu xenobiotik jiným xenobiotikem může probíhat destrukcí již vytvořeného enzymu, inhibicí syntézy enzymu či inaktivací enzymu tvorbou komplexu [53].

Specifická inhibice redukce ANT na odpovídající alkoholy by mohla být dvojnásobně prospěšná v průběhu cytostatické léčby antracykliny. Jednak vede k zachování antineoplastické aktivity mateřských léčiv a jednak chrání před rozvojem kardiomyopatie způsobené alkoholovými metabolity [52]. Proto je třeba hledat vhodné a bezpečné specifické inhibitory enzymů redukujících ANT-karbonyl.

Kvercitrin (i jiné flavonoidy) specificky inhibuje karbonylreduktasu, barbituráty a fenytoin specificky inhibují aldehydreduktasu [27,54]. Tyto specifické inhibitory se využívají k určení a identifikaci cytosolických enzymů odpovědných za redukci ANT-karbonylu. Sloučeniny jako nitrazepam, chlorpromazin či reserpin vykazují inhibici systému aldo-keto reduktas v různých tkáních [55]. Silnějším inhibitorem aldosareduktasy je ethyl 1-benzyl-3-hydroxy-2(5H)-oxopyrrol-4-karboxylát (EBPC) [56]. Účinnými inhibitory aktivity 11 β -HSD se ukázaly být glycyrrhetinová kyselina a její derivát karbenoxolon (viz 2.2.4.9 Ovlivnění aktivity 11 β -HSD 1).

2.1.2.10 Rezistence na antracykliny

Hlavním problémem chemoterapie maligních tumorů je rozvoj rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům. Doposud byla objevena řada mechanismů získané rezistence na ANT a jiná antineoplastika.

MDR je často důsledkem zvýšené exprese P-gp (P-glykoproteinu; P-170). P-gp je glykoprotein v plazmatické membráně, který zprostředkovává ATP-dependentní eflux nezměněného léčiva z buňky a tím ji chrání před intracelulární akumulací léčiva [57]. Další dva proteiny, které působí také jako transmembránové (na energii závislé) pumpy, jsou MRP (multidrug resistance-associated protein) a LRP (lung resistance related protein) [58,59]. Kompetitivním inhibitorem P-gp a MRP aktivity a jejich m-RNA exprese je verapamil [60]. Také flavonoid kvercetin silně inhibuje P-gp zprostředkovaný eflux léčiv z buňky [61]. Podávání flavonoidů během chemoterapie antracykliny představuje způsob obejití lékové rezistence jednak inhibicí detoxikace ANT (redukce karbonylu) a jednak inhibicí P-gp.

Rozvoj MDR může být spojen se změnami hladiny a/či aktivity topoisomerasy II. Jiným možným mechanismem podílejícím se na MDR je zvýšení

hladin inaktivačních enzymů – I. i II. fáze biotransformace (UDP-glukuronosyl-transferasy, glutathion-S-transferasy, glutathionperoxidasy, AKR, CR, cytosolických aldehyddehydrogenas třídy 3) [62-69]. Konverze ANT na jejich 13-hydroxyderiváty je významným krokem v detoxikaci, protože mají o poznání menší cytotoxický účinek než mateřská léčiva. ANT-karbonyl redukce je indukovatelná samotným substrátem, zvýšená redukce pravděpodobně přispívá k rozvoji rezistence proti antracyklinům (viz 2.1.2.8 Enzymová indukce).

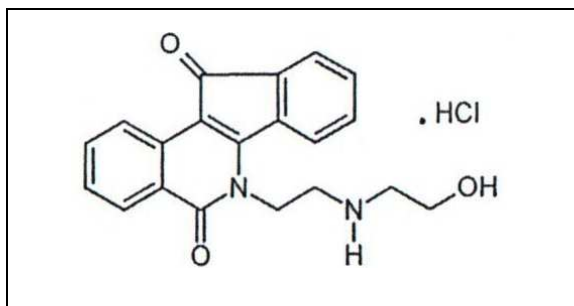
2.1.3 Oracin

2.1.3.1 Obecné vlastnosti a chemická struktura

Oracin je nadějně potenciální cytostatické léčivo, které je právě ve II. fázi klinického zkoušení. Byl syntetizován ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii v Praze. Chemicky je to 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin [70]. Využívá se ve formě hydrochloridu.

Sumární vzorec oracin-hydrochloridu: $C_{20}H_{19}ClN_2O_3$

Molekulová hmotnost oracin-hydrochloridu: M_r 370,85.



Obrázek 33. Chemická struktura oracinu.

2.1.3.2 Mechanismus účinku

Planární struktura oracinu je typická pro interkalační protinádorová léčiva (antracyklinová antibiotika - DOX, DAU; antracendiony - mitoxantron). Strukturně i farmakologicky je příbuzný klinicky užívanému cytostatiku mitoxantronu. O podobném mechanismu účinku svědčí i fakt, že byla objevena částečná zkřížená rezistence s mitoxantronem v pokusu s myšimi leukemickými buňkami L1210 provedeném *in vitro*.

Na antineoplastickém účinku oracinu se kromě interkalace, která vede k inhibici DNA a RNA syntézy a následně ke snížení obsahu proteinů v nádorových buňkách [71], podílejí také některé další mechanismy. Experimentálně byla zjištěna inhibice

topoisomerasy II (EC 5.99.1.3), která byla izolována z jader EAC buněk (Ehrlich ascites carcinoma). Topoisomerasa II je molekulárním cílem řady cytostatik. Stupeň inhibice je závislý na době expozice a koncentraci oracinu (1 μ M oracin inhiboval topoisomerasu II přibližně z 50%, 5-15 μ M téměř 100%) [72]. Studie s buněčnou linií Burkittova lymfomu nasvědčuje tomu, že oracin působí jako inhibitor mitózy, pravděpodobně zásahem do G2-fáze buněčného cyklu [73]. Navíc oracin stimuluje aerobní spotřebu glukózy, v menší míře i tvorbu laktátu v nádorových buňkách a indukuje apoptózu (programovanou smrt buňky) [71].

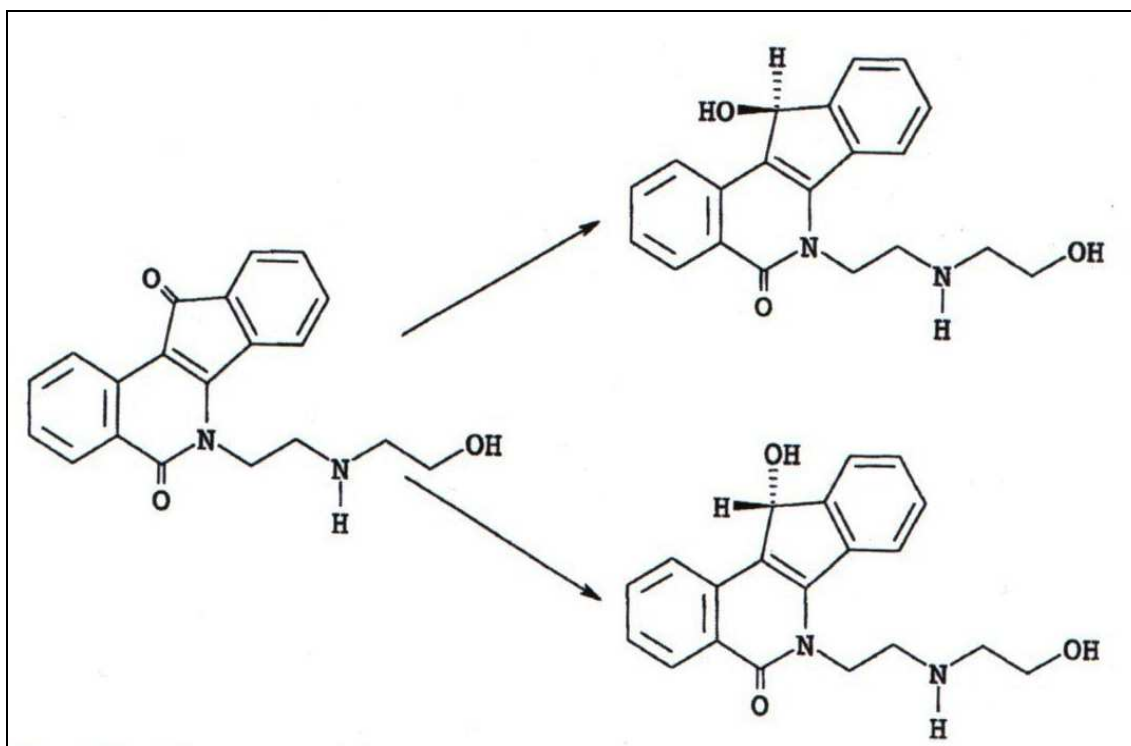
2.1.3.3 Potenciální indikace

Oracin (OR) vykazuje přímou cytotoxicitu proti širokému spektru nádorových a leukemických buněk *in vitro* a *in vivo*. Protinádorový účinek oracinu byl studován na myších a potkanech užitím deseti modelů různých nádorů. Oracin byl podáván perorálně a parenterálně. Jeho podávání prodloužilo průměrnou dobu přežití myší s ascitickou formou sarkomu S37, se solidní formou Ehrlichova karcinomu, Gardnerovým lymfosarkomem, leukémií L1210 a P388, stejně tak i potkanů s Yoshidovým retikulosarkomem. V případě Gardnerova lymfosarkomu většina zvířat přežila (s trvalou remisí a beze známky nádorového onemocnění) už po jedné perorální dávce oracinu. *In vitro* experimenty ukázaly přímou cytotoxicitu oracinu vůči pěti zvířecím tumorům [71].

Hlavními přednostmi tohoto nového chemoterapeutika jsou možnost perorálního podávání, výše zmíněná kombinace různých protinádorových mechanismů, absence kardiotoxicity [74] (která je základním dávkou omezujícím faktorem chemoterapie antracykliny), negativní výsledky Amesova testu mutagenicity [75], velmi nízká hepatotoxicita a výhodná farmakokinetika (rychlá absorpce z GIT, rychlá eliminace). Očekává se vyšší účinnost na hematologické malignity než u ANT a antracendionů (pro hematologické malignity by mělo být upřednostňováno intravenózní podávání oracinu).

2.1.3.4 Biotransformace oracinu

Biotransformace oracinu je intenzivně studována. Hlavním metabolitem oracinu je 11-dihydrooracin (DHO), který nemá vlastní protinádorový účinek. DHO je chemicky 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11H-indeno[1,2-c] isochinolin. Tento chirální metabolit je tvořen redukcí pro-chirální C11 karbonylové skupiny v molekule oracinu.



Obrázek 44. Metabolická konverze oracinu na (+)-DHO a (-)-DHO [83].

Biotransformace oracinu byla sledována *in vitro* a *in vivo* za využití různých živočišných druhů a lidské jaterní tkáně [76-79]. DHO je tvořen v mikrosomální i v cytosolické frakci ve všech druhových studiích. Stereospecificita redukce se u jednotlivých živočišných druhů významně liší. Tvorba pravotočivého enantiomeru (+)-DHO převažuje u myši, potkana, psa a mini-prasete, zatímco levotočivý enantiomer (-)-DHO je přednostně tvořen u morčete a králíka. Stereospecificita je navíc ovlivněna pohlavím laboratorních zvířat [80]. U člověka je tvořeno zhruba stejné množství obou enantiomerů [79]. Enzymová stereospecificita je definována jako schopnost enzymů preferenčně tvořit pouze jeden stereoisomer (+ či -) [81].

Na základě indukčních a inhibičních studií s celou mikrosomální frakcí bylo zjištěno, že redukce OR-karbylylu v játrech různých laboratorních zvířat a člověka se účastní na mikrosomální úrovni 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa 1 (11 β -HSD 1) [82-84]. 11 β -HSD 1 se zdá být multifunkčním enzymem, který se (kromě své fyziologické role v reverzibilní oxidoredukci glukokortikoidů) uplatňuje i v katalýze redukce nesteroidních karbylových sloučenin, účastní se detoxikace řady xenobiotických aldehydů a ketonů [39,40]. Konverze oracinu na DHO vyčištěnou 11 β -HSD 1 je ve srovnání s celou mikrosomální frakcí stereospecificitější, protože redukcí vyčištěnou 11 β -HSD 1 vzniká vyšší podíl jednoho stereoisomeru. U myši se

poměr (+)-DHO/(-)-DHO lišil při redukci oracinu izolovanou 11 β -HSD 1 (93:7) v porovnání s celou mikrosomální frakcí (70:30) [77]. U člověka byl přednostně tvořen enantiomer (-)-DHO v rozdílném poměru (+)-DHO/(-)-DHO při redukci izolovanou 11 β -HSD 1 (24:76) a mikrosomy (40:60) [84]. Z těchto významných rozdílů ve stereospecificitě lze usuzovat, že v mikrosomech existuje ještě minimálně jeden další enzym podílející se na konverzi oracinu na DHO. Částečně je vznik DHO v mikrosomech zprostředkován cytochromem P4501A. V cytosolu byla jako hlavní enzym redukující oracin identifikována karbonylreduktasa [82]. K redukci je zapotřebí NADPH jako donoru elektronů. DHO byl detekován v moči i v trusu laboratorních zvířat.

V mikrosomech je oracin konvertován kromě DHO také na 3-hydroxyoracin. Vnesení hydroxylové skupiny do molekuly oracinu katalyzuje cytochrom P4501A [85].

2.2 REDUKCE KARBONYLOVÉ SKUPINY

2.2.1 Obecná charakteristika reduktas karbonylu

Lidé a zvířata jsou vystaveni širokému spektru potenciálně toxických karbonylových sloučenin (aldehydů, ketonů a chinonů) endogenního či exogenního původu. Tyto sloučeniny mají schopnost tvořit Schiffovy base s proteiny, reagovat s thiolovými skupinami buněčných makromolekul nebo mohou být mutagenní. Kromě toho chinony mohou podstupovat tzv. redoxní cyklický děj a vytvářet tak reaktivní kyslíkové radikály vedoucí k oxidačnímu stresu buněk [86]. Buňka potřebuje ochranu před karbonylovými sloučeninami kvůli jejich reaktivitě.

Redukce karbonylové skupiny na odpovídající alkoholy představuje běžný způsob zvýšení polarity molekul, čímž je podpořena jejich eliminace. Navíc tyto tvořené hydroxyderiváty mohou být následně konjugovány enzymy II. fáze biotransformace, což vede k dalšímu usnadnění jejich exkrece. Redukce karbonylu je tedy důležitým krokem v biotransformaci vedoucí k eliminaci endogenních a exogenních aldehydů, ketonů a chinonů [39].

Nejdůležitějšími enzymy redukujícími karbonyl jsou aldehydoreduktasa (ALR 1; AKR1A1; E.C. 1.1.1.2.), aldoreduktasa (ALR 2; AKR1B1; E.C. 1.1.1.21), karbonylreduktasa (CR, E.C. 1.1.1.184) a některé dihydrodioldehydrogenasy (DD, AKR1C) a hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD).

Až na výjimky jsou enzymy zodpovědné za redukci karbonylu vysoce exprimovány v játrech. Jsou členy dvou proteinových nadrodin - **AKR** či **SDR** [39]. Ačkoliv AKR a SDR nejsou homologní a mají zcela odlišnou trojrozměrnou strukturu, katalytické mechanismy těchto dvou nadrodin jsou analogické [87].

Tabulka 55. Zařazení reduktas karbonylu do proteinových nadrodin AKR a SDR.

Nadrodina	Enzym
AKR	aldehydreduktasy aldosoreduktasy dihydrodioldehydrogenasy hydroxysteroiddehydrogenasy (savčí 3 α -HSD, 20 α -HSD)
SDR	karbonylreduktasy hydroxysteroiddehydrogenasy (savčí 11 β -HSD, 17 β -HSD, 3 α /20 β -HSD)

2.2.2 Aldo-ketoreduktasy

Aldo-ketoreduktasy (AKR) reprezentují rostoucí rodinu oxidoreduktas. Nacházejí se u obratlovců, bezobratlých, rostlin, protozoí, hub a bakterií, což dokazuje, že se jedná o prastarou nadrodinu enzymů. Členové nadrodiny AKR jsou monomerní proteiny o délce přibližně 320 aminokyselin. Váží NAD(P)(H) a účastní se metabolismu širokého spektra substrátů – alifatických aldehydů, monosacharidů, steroidů, prostaglandinů a xenobiotik [35].

Široká substrátová specifita ztěžuje přesné pojmenování těchto proteinů. Například enzym nyní označovaný jako AKR1C3 je znám též jako lidská jaterní 3 α -HSD typu II (E.C. 1.1.1.213), 17 β -HSD typu V (E.C. 1.1.1.62), dihydrodioldehydrogenasa typu X (E.C. 1.3.1.20) a prostaglandin F-syntasa (E.C. 1.1.1.188). Díky mnohočetnosti názvů pro jednotlivé členy AKR navrhli Jez a Penning [35] rozšiřovatelný nomenklaturní systém pro jednotlivé enzymy patřící do nadrodiny AKR. Nomenklaturní systém je založený na identitě sekvence aminokyselin. Na hladině 40% aminokyselinové identity byla nadrodina AKR rozčleněna do dvanácti rodin značených arabskými číslicemi. Na hladině 60% aminokyselinové identity se rozlišují jednotlivé podrodiny, které se označují velkými písmeny [35].

Např. rodina AKR1 má pět podrodin:

- AKR1A savčí aldehydreduktasy
- AKR1B aldosoreduktasy
- AKR1C hydroxysteroiddehydrogenasy
- AKR1D Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktasy
- AKR1E rostlinné aldehydreduktasy [88].

AKR zahrnují aldehydreduktasy, aldosoreduktasy, dihydrodioldehydrogenasy a některé hydroxysteroiddehydrogenasy. Přestože karbonylreduktasy jsou dle struktury řazeny do nadrodiny SDR, díky jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem a spektru substrátů je Jez se spolupracovníky ve své nomenklatuře nazývá rodinou AKR3. V současné době počet charakterizovaných AKR dospěl ke 105 proteinům. Pomocí molekulárního klonování a projektů genomových sekvencí bylo identifikováno 125 potenciálních genů AKR, mnoho z nich však bez jasné funkce [89].

2.2.3 Karbonylreduktasy

V návaznosti na Felsteda a Bachura [90] uvádí Testa [91], že karbonylreduktasami jsou souhrnně nazývány **aldehydreduktasy** a **ketoreduktasy**. Tyto enzymy tvoří skupinu kolektivně známou jako karbonylreduktasa (CR; EC 1.1.1.184; sekundární alkohol:NADP⁺ oxidoreduktasa).

Karbonylreduktasy byly detekovány a získány z různých živočišných tkání pod různými označeními. U člověka se nacházejí ubikvitně ve všech tkáních, nejvyšší aktivitu vykazují v játrech, mozku a ledvinách, zatímco u potkana je jejich aktivita nejvyšší v gonádách, přídatných orgánech a adrenálních žlázách. Subcelulární lokalizace aldehydreduktas i ketoreduktas je primárně cytosolická, ale existují i výjimky mitochondriální. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 29 000 - 44 000 v nativní i denaturované formě, což ukazuje na monomerní strukturu enzymů.

Aldehydreduktasy katalyzují NADP(H)-dependentní redukce širokého spektra aldehydů na příslušné alkoholy. K jejich fyziologickým rolím náleží metabolismus aldehydických neurotransmiterů, detoxikace reaktivních aldehydických intermediátů a osmoregulace.

Ketoreduktasy jsou jen málo charakterizovány. Redukují aromatické ketony mnohem více než alifatické ketony, ale vhodnými substráty jsou také aldehydy [89].

2.2.4 Hydroxysteroiddehydrogenasy

2.2.4.1 Obecná charakteristika

Enzymy jako karbonylreduktasa, aldehydreduktasa, aldosoreduktasa a dihydrodioldehydrogenasy zřejmě nejsou v organismu tvořeny jen proto, aby katalyzovaly redukci karbonylu farmakologicky a toxikologicky významných sloučenin, ale účastní se i metabolismu fyziologicky nepostradatelných látek – steroidů, prostaglandinů a biogenních aminů. To stejné platí i o hydroxysteroiddehydrogenasách (HSD), které patří mezi zástupce obou proteinových nadrodin. Tyto pluripotentní hydroxysteroiddehydrogenasy jsou na jedné straně vysoce specifické pro fyziologické steroidní substráty, u nichž atakují jen určité funkční skupiny, na druhé straně však katalyzují redukci karbonylu široké škály nesteroidních substrátů [39].

Tabulka 66. Hydroxysteroiddehydrogenasy z AKR a SDR nadrodiny zapojené v redukci nesteroidních karbonylových sloučenin [39].

Nadrodina	Enzym	Zdroj
AKR	3 α -HSD	savčí
	20 α -HSD	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
	20 α -HSD	savčí
SDR	3 α -HSD	<i>Comamonas testosteroni</i>
	11 β -HSD	savčí
	17 β -HSD	savčí
	3 α /20 β -HSD	<i>Streptomyces hydrogenans</i>
	3 α /20 β -HSD	savčí

Hydroxysteroiddehydrogenasy jsou NAD(P)(H)-dependentní oxidoreduktasy, které zprostředkovávají přeměnu sekundárních alkoholů na ketony na steroidním jádře a postranním řetězci. Tyto enzymy pravděpodobně hrají základní úlohu v regulaci působení steroidních hormonů. HSD jsou lokalizovány jak v mikrosomech, tak v cytosolu. Zatímco např. 3 α -HSD a 17 β -HSD jsou enzymy mikrosomální i cytosolické, 11 β -HSD a 20 α -HSD jsou pouze mikrosomální [39].

Zejména v poslední době zaznamenaly vzrůstající pozornost vědecké společnosti **11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy** (11 β -HSD; EC 1.1.1.146). Tyto enzymy jsou široce distribuovány v tkáních a mají spoustu (pato)fyziologických funkcí. Jejich enzymová aktivita hraje klíčovou roli v metabolismu fyziologických glukokortikoidů (11 β -oxidoredukce kortisolu/kortisonu a kortikosteronu/dehydrokortikosteronu) [92]. Vzájemná interkonverze inaktivních glukokortikoidů v aktivní představuje pre-receptorový regulační mechanismus působení glukokortikoidních hormonů [93]. Doposud byly popsány dvě různé isoformy, 11 β -HSD 1 a 11 β -HSD 2, které se odlišují svými biologickými vlastnostmi, tkáňovou distribucí, kofaktorovou závislostí a oxidoredukční rovnováhou [94,95]. V roce 1993 bylo objeveno, že 11 β -HSD typu 1 má schopnost katalyzovat také redukci karbonylu nesteroidních xenobiotik (aldehydů, ketonů, chinonů) [39,40,96].

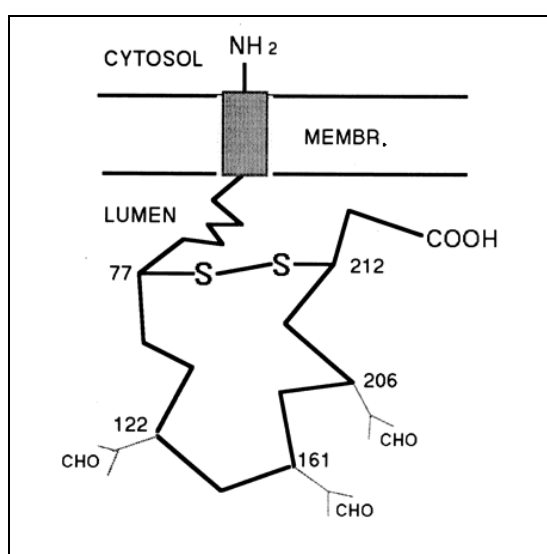
2.2.4.2 Struktura 11 β -HSD

11 β -HSD typu 1 a 2 spojují společné strukturní motivy, které je zařazují do proteinové nadrodiny SDR [97]. Charakteristika terciální struktury 11 β -HSD může být odvozena ze struktury blízce příbuzné 3 α ,20 β -HSD (ze *Streptomyces hydrogenans*) či Tropinon reduktasy 1 (z *Datura stramonium*), které patří také do SRD nadrodiny. 3 α ,20 β -HSD byla prvním SDR enzymem, jehož struktura byla objasněna [98]. Na základě tohoto srovnání lze usuzovat, že 11 β -HSD má jednodoménovou strukturu. Je to glykosylovaný enzym s monomerní molekulovou hmotností 34 kDa, ta se může měnit v závislosti na stupni glykosylace [99]. Pro všechny členy SDR nadrodiny jsou typické některé obecné strukturní rysy, přestože shoda aminokyselinové sekvence je jen nízká (15-30%) [100]. Jedním z těchto znaků je oblast se střídajícími se úseky α -helixu a β -struktury (tzv. Rossmannův záhyb), dále katalyticky aktivní triáda aminokyselin sestávající ze Ser, Tyr a Lys zbytků a N-terminální kosubstrát-vázající místo se shodnou sekvencí bohatou na glycin (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) [97]. Navzdory tomu, že jsou 11 β -HSD typu 1 a 2 členy stejné proteinové nadrodiny a že mají stejný glukokortikoidní substrát (kortisol), vykazují pouze 14% shodu na úrovni aminokyselin [101].

Kvartérní struktura 11 β -HSD dosud nebyla plně objasněna. Některé studie předpokládají, že 11 β -HSD 1 je aktivní jako dimer, jehož jednotlivé monomerní podjednotky (stejně polypeptidové řetězce) vykazují kooperaci při 11-oxidoredukci glukokortikoidů či redukci karbonylových sloučenin. Molekulová hmotnost aktivní lidské 11 β -HSD je 67,4 kDa, což podporuje hypotézu o dimerní povaze enzymu [102].

2.2.4.3 Intracelulární lokalizace 11 β -HSD

Jedním z nejcharakterističtějších rysů karbonyl redukujících enzymů je jejich intracelulární distribuce v cytosolu. Existují ale i reduktasy mikrosomální, jako např. 11 β -HSD. Ta je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula (ER). Zde plní 11 β -HSD 1 důležitou roli v protekci intracelulárních membrán před toxickými karbonylovými sloučeninami, zj. chinony [92]. 11 β -HSD 1 je v membráně ER ukotvena svou N-terminální hydrofobní doménou tak, že aktivní místo vystupuje do lumen ER [103], zatímco 11 β -HSD 2 je orientována na cytoplazmatickou stranu ER membrány [104].



Obrázek 55.

Ukotvení 11 β -HSD 1 v membráně ER.

2.2.4.4 Tkáňová distribuce 11 β -HSD

Distribuce obou typů 11 β -HSD souvisí s jejich funkcí v tkáních. 11 β -HSD 2 se nachází především v cílových tkáních působení mineralokortikoidů (např. ledviny, tračník, slinné a potní žlázy, srdce, hipokampus), kde chrání mineralokortikoidní receptory před nadbytkem glukokortikoidů prostřednictvím jejich inaktivace [105,106]. Byla nalezena také v placentě, kde působí protektivně na vývoj plodu, ochraňuje ho před účinky mateřských glukokortikoidů [107]. 11 β -HSD typu 1 je rozšířena ubikvitně ve všech tkáních. Její enzymová aktivita je zvláště důležitá v játrech, tukové tkáni a v mozku, kde udržuje vysoké intracelulární hladiny glukokortikoidů. Nejvyšší exprese a aktivity dosahuje 11 β -HSD 1 v játrech [108].

2.2.4.5 Funkční charakteristika 11 β -HSD

Jak už bylo zmíněno, 11 β -HSD hraje důležitou fyziologickou roli v udržování glukokortikoidní homeostázy v organismu. Katalyzuje vzájemnou interkonverzi aktivních glukokortikoidů (kortisol, kortikosteron) a jejich neaktivních 11-oxoderivátů (kortison, 11-dehydrokortikosteron) [108]. Na této reakci se podílejí dvě isoformy 11 β -HSD označované jako 11 β -HSD typu 1 a 2.

11 β -HSD 1 je nízkoafinitní NADP(H)-dependentní dehydrogenasa/reduktasa s K_m (Michaelisova konstanta) ležící v mikromolárním rozmezí. Enzymová reakce katalyzovaná 11 β -HSD 1 probíhá *in vitro* obousměrně, zatímco *in vivo* působí 11 β -HSD 1 převážně jako reduktasa, která reaktivuje inertní 11-oxoderiváty glukokortikoidů jejich přeměnou na 11 β -hydroxyformy.

11 β -HSD 2 je vysokoafinitní NAD⁺-dependentní dehydrogenasa s K_m pro kortisol v nanomolárním rozmezí. Reakce probíhá jednosměrně, 11 β -HSD 2 působí výhradně jako dehydrogenasa. Její enzymová aktivita vede k inaktivaci fyziologických glukokortikoidů [92].

Obě isoformy 11 β -HSD se významnou měrou účastní komplexní, tkáňově specifické regulace působení glukokortikoidů. Rovnováha mezi aktivitami 11 β -HSD 1 a 11 β -HSD 2 ovlivňuje poměr kortisol/kortison. Vzroste-li v důsledku dlouhodobého narušení této rovnováhy hladina kortisolu, může to vést k rozvoji obezity, hypertenze, inzulinové rezistence, diabetes mellitus II a k neurodegenerativním poruchám [108].

2.2.4.6 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasa 2

Steroidy jsou vysoce lipofilní sloučeniny, vstupují do buněk a váží se na intracelulární receptory, což vede k ovlivnění buněčné transkripce. Rozlišují se dva hlavní typy kortikosteroidních receptorů – mineralokortikoidní (MR) a glukokortikoidní receptory (GR) [109]. *In vitro* a v některých tkáních i *in vivo* (např. srdce a hipokampus) se váží kortikosteron, kortisol a aldosteron na MR se stejnou afinitou, zatímco v jiných tkáních *in vivo* (např. ledviny, slinné a potní žlázy, tračník) se na strukturně identické MR váže selektivně aldosteron. V roce 1988 bylo zjištěno, že specifická ledvinných MR pro aldosteron není dána samotným receptorem, ale působením 11 β -HSD (dnes známo, že typu 2) [105,106]. 11 β -HSD 2 v cílových tkáních účinku mineralokortikoidů rychle inaktivuje kortisol/kortikosteron na inertní 11-oxoderiváty, které se nemohou vázat na MR. Aldosteron je před její aktivitou chráněn svým poloacetalovým můstkem v molekule.

Hlavním místem konverze kortisolu na kortison jsou ledviny. Defekt v genu pro 11 β -HSD 2 způsobuje, že nedochází k oxidaci kortisolu na kortison, kortisol se hromadí a stimuluje renální MR. Důsledkem je retence sodíku a vody a hypokalémie, rozvíjí se hypertenze. Tato poměrně vzácná porucha je označována jako AME (Apparent Mineralocorticoid Excess), představuje určitou formu pseudohyperaldosteronismu [110]. Stejný efekt mají i inhibitory 11 β -HSD 2 (lékořice a její deriváty), které vedou k obsazení renálních MR endogenními glukokortikoidy, což se projeví také „mineralokortikoidním nadbytkem“ a hypertenzí [111].

11 β -HSD 2 je v průběhu těhotenství vysoce exprimována v placentě a v řadě fetálních tkání. Není však zcela jasné, jakou zde plní funkci. Pravděpodobně je její účinek během vývoje plodu časově a tkáňově specifický, omezuje vystavení tkání potencionálně škodlivému účinku glukokortikoidů mateřského i fetálního původu [112].

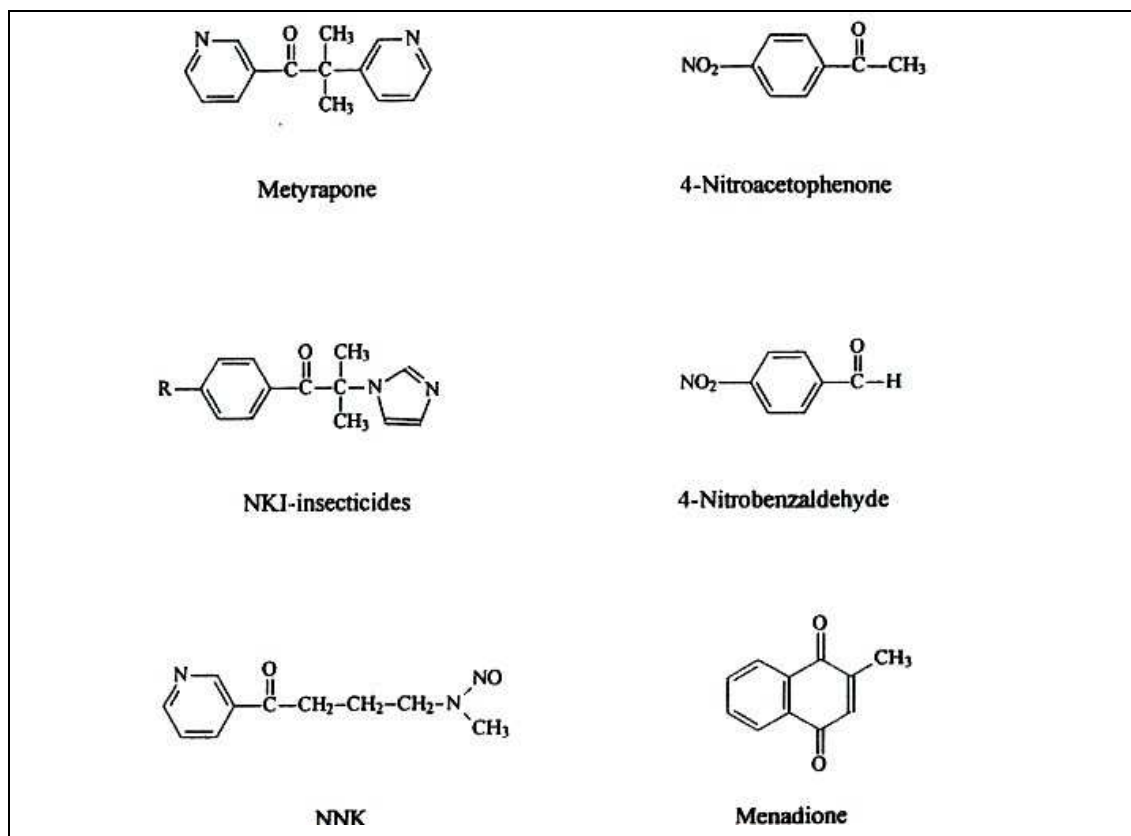
2.2.4.7 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasa 1

Zatímco biologická funkce 11 β -HSD 2 je v cílových tkáních účinku aldosteronu poměrně dobře známá, role široce distribuované 11 β -HSD 1 je objasněna méně. V játrech, tukové tkáni a mozku působí 11 β -HSD 1 preferenčně jako reduktasa. Regeneruje aktivní glukokortikoidy, amplifikuje jejich účinek v daných buňkách a udržuje tak základní metabolické funkce i během denního minima glukokortikoidní sekrece. Zároveň se její enzymová aktivita uplatňuje při adaptivní odpovědi na stres [108,113].

11 β -HSD 1 hraje důležitou roli v I. fázi biotransformace farmakologicky důležitých karbonylových sloučenin. Chrání organismus před toxickými aldehydy a ketony katalýzou jejich konverze na méně lipofilní a ve vodě rozpustnější metabolity, které jsou snadněji konjugovány a eliminovány. Většina karbonylových sloučenin se vyznačuje lipofilitou a lze tudíž předpokládat jejich distribuci v membránách bohatých na lipidy. Proto může mít mikrosomální 11 β -HSD 1 spíše než cytoplazmatické reduktasy významnou úlohu při redukci těchto látek [92].

2.2.4.8 Exogenní substráty 11 β -HSD 1

Z chemických struktur exogenních substrátů hepatální 11 β -HSD 1 je patrné, že karbonyl je vždy v blízkosti aromatického systému. Tato strukturní konfigurace se zdá být nezbytná pro přístup k aktivnímu místu enzymu [92].



Obrázek 66. Nesteroidní substráty jaterní 11 β -HSD 1 [92].

Metyrapon (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon) patří mezi nejvýznačnější inhibitory CYP450-dependentní steroidhydroxylasy z 11 β -hydroxylačního systému gluko- a mineralokortikoidů v kůře nadledvinek savců. Sám metyrapon je primárně metabolizován redukcí své karbonylové skupiny na hydroxyderivát metyrapol. Bylo zjištěno, že na této redukci se kromě cytosolické karbonylreduktasy podílí i mikrosomální 11 β -HSD 1. Studium kinetiky redukce karbonylu s metyraponem a dalšími modelovými substráty (4-nitroacetofenon, 4-benzaldehyd) odhalilo, že glukokortikoidy a xenobiotika s karbonylem se váží na stejné katalyticky aktivní místo 11 β -HSD 1 [40].

Při vývoji nových insekticidů se hledají takové látky, které ovlivňují pro hmyz či bezobratlé specifický hormonální systém, aby se omezily možné vedlejší účinky těchto látek na obratlovce. Jedním ze specifických hmyzích hormonů je 20-hydroxyekdyson (důležitý pro reprodukci, embryogenezi a metamorfózu hmyzu), který vzniká 20-hydroxylací ekdysonu. Tuto reakci zprostředkovává CYP450-dependentní monooxygenasový systém, kde v aktivaci ekdysonu hraje ústřední roli ekdyson-20-monooxygenasa (E-20-M). Metyrapon je *in vitro* účinným inhibitorem

E-20-M, ale *in vivo* je jeho účinek nevýznamný. Byly syntetizovány některé azolové analogy metyraponu, které jsou pro hmyz toxické, protože inhibicí E-20-M narušují aktivaci ekdysonu [114]. Tyto analogy jsou v lidském organismu metabolizovány (stejně jako metyrapon) redukcí karbonylu katalyzovanou 11 β -HSD 1 v mikrosomech a karbonylreduktasou v cytosolu jaterních buněk. Výsledné hydroxymetabolity jsou méně toxické než jejich mateřské sloučeniny, proto redukce karbonylu představuje důležitý krok v detoxikaci těchto biologicky aktivních insekticidů u lidí i ostatních savců. 11 β -HSD 1 tedy zajišťuje selektivitu toxického účinku insekticidů vůči hmyzu a bezpečnost jejich použití pro lidi a jiné savce [115].

Nejvýznamnějším karcinogenem obsaženým v cigaretovém kouři je nitrosamin NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon] s vysokou specificitou vůči plicní tkáni [116]. Genotoxicita NNK závisí na poměru mezi jeho metabolickou aktivací CYP450 enzymy a jeho detoxikací, která se ubírá cestou redukce karbonylu a vede k NNK alkoholu [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol], který je následně konjugován s kyselinou glukuronovou. Enzym odpovědný za redukci karbonylu NNK byl hledán od roku 1980 [117] a nakonec byla jako mikrosomální enzym katalyzující tuto reakci identifikována právě 11 β -HSD 1 [118]. Na základě tohoto zjištění lze říci, že 11 β -HSD 1 (společně s glukuronosyltransferasou) má v určitých tkáních vliv na karcinogenní potenci NNK.

Chinony jsou v přírodě velice rozšířeny, v hojném množství jsou obsaženy v rostlinách, houbách a bakteriích. Člověk chinony přijímá s potravou, je vystaven působení chinonů z ovzduší (kde jsou přítomny jako polutanty), chinony však mohou vznikat i během oxidačního metabolismu endogenních aromatických prekurzorů (catecholaminů, estrogenů...). Také řada klinicky významných protinádorových léčiv obsahuje ve své struktuře chinonové jádro (např. antracykliny). V mechanismu cytotoxického účinku chinonů hraje roli redoxní cyklický děj a oxidační stres buňky: chinon podstupuje jednoelektronovou redukci a konvertuje se tak na semichinon, který redukuje kyslík na superoxidový radikál a sám se přeměňuje zpět na chinon. Alternativně může být chinon redukován přenosem dvou elektronů, čímž vzniká hydrochinon. Ten může podstoupit autooxidaci nebo je v přítomnosti konjugačních enzymů rychle konvertován na glukuronidy či sulfátové konjugáty, což brání jeho reoxidaci na chinon. Z toho plyne, že enzymy katalyzující dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony mohou chránit buňku před oxidačním stresem tím, že kompetují s cestou jednoelektronové redukce [119]. Za detoxikaci chinonů v cytosolu

jsou odpovědné NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa a karbonylreduktasa [120,121]. Mikrosomální 11 β -HSD 1 je také schopna katalyzovat dvouelektronovou redukci chinonů, což bylo prokázáno použitím menadionu (2-methyl-1,4-naftochinon) jako substrátu [96]. Z kinetických parametrů redukce fyziologických glukokortikoidních substrátů a redukce menadionu bylo zjištěno, že vnitřní clearance (V_{max}/K_m) menadionu byla 75x vyšší než u 11-dehydrokortikosteronu [122]. Oxidační stres vyvolaný chinony může vést k lipoperoxidaci a tím k poškození fosfolipidové membrány. 11 β -HSD 1 je ukotvena v mikrosomální membráně, a proto nejspíše plní důležitější funkci v ochraně proti lipoperoxidaci a následnému poškození membrány než cytosolická NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa a karbonylreduktasa. Navíc je UDP-glukuronosyltransferasa (konjugační enzym důležitý v detoxikaci chinonů) lokalizována v endoplazmatickém retikulu, což naznačuje spolupráci 11 β -HSD 1 a UDP-glukuronosyltransferasy při detoxikaci chinonů [92].

Jak už bylo zmíněno dříve, hepatální 11 β -HSD 1 se podílí i na detoxikaci protinádorových látek **doxorubicinu, daunorubicinu a oracinu**. Jejich redukcí vznikají příslušné alkoholy (doxorubicinol, daunorubicinol, 11-dihydrooracin), které jsou lépe rozpustné ve vodě, snadněji konjugovány a následně eliminovány z organismu. Hydroxyderiváty mají nižší nebo žádný cytotoxický potenciál oproti mateřským léčivům. Z toho lze usuzovat, že je-li 11 β -HSD 1 (i další enzymy I. a II. fáze biotransformace léčiv) indukována, a tak zvýšena její enzymová aktivita, urychlí se inaktivace podávaných cytostatik, což se může uplatnit v rozvoji získané rezistence k těmto léčivům. Existují také hypotézy, které předpokládají roli doxorubicinolu a daunorubicinolu v rozvoji kardiomyopatie při léčbě ANT. Inhibice redukce karbonylu těchto cytostatik proto může být dvojnásobně prospěšná během chemoterapie - poskytuje ochranu antineoplastického účinku mateřských léčiv a zároveň ochranu před kardiomyopatií způsobenou alkoholovými metabolity antracyklinů.

2.2.4.9 Ovlivnění aktivity 11 β -HSD 1

Detoxikační aktivitu jaterní 11 β -HSD 1 může ovlivňovat řada faktorů. Mezi tyto faktory patří individuální rozdíly v expresi enzymu, které jsou dány genetickým polymorfismem či vnějšími podmínkami, patofyziologické změny v enzymové aktivitě a interakce s endo- či exogenními substráty či inhibitory 11 β -HSD.

Hepatální 11β -HSD 1 podléhá multifaktoriální regulaci. Kortisol a dexamethason zvyšují expresi 11β -HSD 1, zatímco růstový hormon, insulin, thyroïdní hormony a estrogény její expresi omezují [92].

Ukázalo se, že některá eobiotika a xenobiotika inhibují enzymovou aktivitu 11β -HSD 1 *in vivo* a *in vitro*. Tuto vlastnost mají žlučové kyseliny, progestageny a hydroxyprogesterony, glycyrrhetinová kyselina (hlavní obsahová látka lékořice), karbenoxolon (hemisukcinát glycyrrhetinové kyseliny), naringenin (bioflavonoid grapefruitu), dexamethason, furosemid a ethanol [92]. Bylo také zjištěno, že 11β -HSD 1 je indukovatelná některými svými substráty. Jak už bylo uvedeno dříve, schopnost indukce 11β -HSD 1 byla nalezena u daunorubicinu, jehož přítomnost (ve vzrůstající subletální koncentraci) v živném médiu buněk karcinomu pankreatu vedla ke zvýšení redukce jeho karbonylu ve všech subcelulárních frakcích. Bez přidávání DAU do média nebyl v mikrosomech daunorubicinol detekovatelný. Dodávání DAU do média vedlo k silné, koncentračně závislé indukci redukčních enzymů (i 11β -HSD 1). Redukce DAU-karbonylu byla po této indukci objevena i v mikrosomální frakci, kde byl zjištěn vysoký nárůst vytvořeného daunorubicinolu [52].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv cytostatik doxorubicinu, daunorubicinu a oracinu na mikrosomální reduktasu karbonylových sloučenin 11 β -HSD typu 1. Pro posouzení efektu uvedených cytostatik bylo třeba:

- stanovit aktivitu 11 β -HSD 1 v mikrosomální frakci hepatocytů laboratorních potkanů kontrolních i ovlivněných vybranými cytostatiky,
- izolovat RNA z kontrolních a ovlivněných hepatocytů a kvantifikovat m-RNA pro 11 β -HSD 1.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 UŽITÝ MATERIÁL

4.1.1 Biologický materiál

K provádění pokusů *in vitro* byla primární kultura hepatocytů samců laboratorních potkanů (*Rattus norvegicus varietas alba*).

4.1.2 Pomůcky a přístroje

- Pomůcky:

kádinky, Erlenmayerovy a odměrné baňky, odměrné válce, skleněné pipety, skleněná miska, Büchnerova nálevka, pinzeta, nylonové sítko, odsávací baňky, hadičky, nádoba na led, centrifugační kyvety, stojánek na kyvety, Bürkerova komůrka, Petriho misky, špachtle, mikrozkuřavky, automatické pipety, multikanálové pipety, pipetovací špičky, mikrotitrační destička, stopky, kyvety pro spektrofotometrické stanovení, inserty, rukavice, váženka, navařovací kopist, míchadlo, buničina - čtverečky

- Přístroje a zařízení:

laboratorní magnetická míchačka - IKA Color Squid Hyrtel HTR 8068

vodní lázeň - Memmert

ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex

analytické váhy - Scaltec SBC 22

digitální pH-metr - Jenway LTD 3020

třepačka - IKA MS2 Minishaker

centrifuga Eppendorf 5810R

centrifuga Eppendorf 5415D

centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

ultracentrifuga Sorvall OTD Combi - rotor TST 60.4

ultrazvukový homogenizátor - Sonopuls Bandelin HD 2070

freezer Heraeus - HeraFreeze

čtečka absorbance - Biorad Microplate Reader 550

UV-VIS spektrofotometr - Unicam Helios ε

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

mikroskop - Nikon Eclipse TS 100
CO₂ inkubátor - HeraCell
inkubátor - Eppendorf Thermomixer Comfort
koncentrátor - Eppendorf Concentrator 5301
kapalinový chromatograf - Agilent 1100 Series
PCR cykler - LightCycler ROCHE

4.1.3 Chemikálie

doxorubicin - Adriblastina® inj., Pharmacia & Upjohn
daunorubicin - Daunoblastina® inj., Pharmacia & Upjohn
oracin - VÚFB Praha
EGTA - Sigma, ČR
albumin - Sigma, ČR
kolagenasa - Sevapharma a.s., ČR
pneumoxid v tlakové láhvi
trypanová modř - Sigma, ČR
WILLIAMS E - Sigma, ČR
HAM F12 - Sigma, ČR
MTT - Sigma, ČR
metyraapon - Aldrich, ČR
4-pyridinkarboxaldehyd - Aldrich, ČR
NADPH - Sigma, ČR
set pro stanovení bílkovin s BCA - Sigma, ČR
acetonitril pro kapalinovou chromatografii - Sigma, ČR
hexansulfonan sodný - Sigma, ČR
amoniak 25% - Lachema, ČR
octan ethylnatý
glycerol 85% - Lachema, ČR
ethanol 70%
β-merkptoethanol - Sigma, ČR
RNeasy® Mini Kit - Qiagen, Německo
QuantiTect Probe PCR® Kit - Qiagen, Německo
běžné chemikálie čistoty p.a. - Penta, ČR

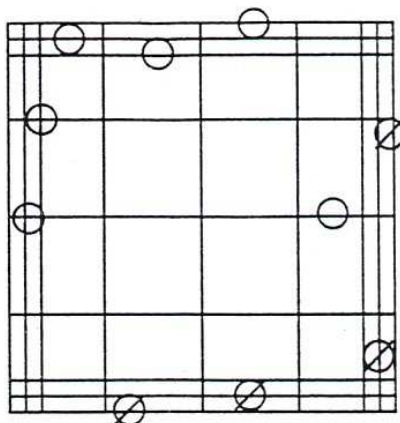
4.2 METODIKA PRÁCE

4.2.1 Izolace hepatocytů z jater potkanů

Pro provedení experimentu *in vitro* bylo potřeba nejprve získat hepatocyty z jater zdravých samců laboratorních potkanů. Izolace hepatocytů byla provedena metodou modifikované dvoustupňové kolagenasové perfuse, která byla zavedena na katedře biochemických věd FaF UK. Izolované jaterní buňky, které jsou uchyceny v monovrstvě ke dnu Petriho misek potažených kolagenem a inkubovány v živném médiu, disponují neporušenou intracelulární strukturou a kompletní enzymovou výbavou. Mohou tedy být využity pro biotransformační studie xenobiotik a pro detekci indukce či inhibice enzymů.

Výběr živného média významně ovlivňuje průběh celého pokusu. Různé typy buněk vyžadují specifické růstové podmínky, které se zjišťují experimentálně. Základními složkami média jsou anorganické soli (udržují osmotickou rovnováhu, regulují membránový potenciál, slouží jako kofaktory enzymů), sacharidy (zdroj energie), vitaminy (prekurzory kofaktorů, důležité pro buněčný růst a proliferaci), stopové prvky, v médiu bez séra jsou nutné proteiny či peptidy a mastné kyseliny. Do média je možno přidat sérum (např. 5% FBS, které napomáhá adhezi živých hepatocytů ke kolagenovému dnu Petriho misek), dále antibiotika a fungicidní látky, případně hormony [123]. Pro kultivaci potkaních hepatocytů je používáno médium ISOM složené ze dvou komerčně dostupných roztoků [124].

Před nanesením buněk na Petriho misky je potřeba zjistit koncentraci získaných buněk a jejich životnost. K tomuto účelu se využívá mikroskopické stanovení prostupnosti funkčních membrán pro trypanovou modř. Metoda je založena na principu aktivního vylučování barviva neporušenou cytoplazmatickou membránou živých buněk pomocí funkčních transportních systémů. Je tedy možno pod mikroskopem rozlišit buňky mrtvé (modře obarvené) a buňky živé (neobarvené). K počítání buněk se používá Bürkerova komůrka. Pod mikroskopem se spočítají živé buňky ležící uvnitř deseti čtverců komůrky včetně těch buněk, které se dotýkají horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců. Buňky na dolním a pravém rozhraní se nepočítají. Poté se stanovuje průměrný počet živých buněk v jednom čtverci komůrky a počet buněk v 1ml suspenze.



Obrázek 77. Čtverec Bürkerovy komůrky o délce strany 1mm. Počítají se buňky uvnitř čtverce a na horním a levém mezihraní (O), nepočítají se buňky na dolním a pravém mezihraní (Ø).

Koncentrace hepatocytů v suspenzi se zjistí dle vzorce:

$$C = \bar{x} \cdot 2 \cdot 16 \cdot 10^4$$

C počet živých hepatocytů v 1ml

\bar{x} průměrný počet živých buněk v 1 čtverci

2 zředění

16 počet malých čtverců

10^4 přepočítání na 1ml

Získaná suspenze hepatocytů o vhodné koncentraci živých buněk se nanáší na sterilní Petriho misky, jejichž dno je potaženo kolagenem. Po 3-4 hodinové inkubaci v CO_2 inkubátoru (37°C , atmosféra s 5% CO_2 a 95% O_2) adherují živé buňky ke kolagenovému dnu misek a vytvářejí monovrstvu. Poté je možno vyměnit uchyceným buňkám stávající médium za čerstvé.

Při studiu vlivu určitých látek na buněčné enzymy se tyto látky přidávají přímo do živného média, a to v koncentracích, které nejsou pro buňky toxické. Tyto koncentrace je možno určit na základě provedení MTT testu. Žlutá tetrazoliová sůl MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazolium bromid], která je ve vodě rozpustná, je redukována enzymy dýchacího řetězce živých buněk na fialový nerozpustný formazan, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Po

přidání detergentu a okyselení se barvivo uvolní z buněk a rozpustí, přičemž vzniká čirý roztok. Následně se zjišťují absorbance roztoků při 595nm a z naměřených hodnot se určuje cytotoxicita testovaných látek. Platí, že naměřené hodnoty absorbance jsou úměrné metabolické aktivitě buněk. MTT test tedy umožňuje porovnat metabolickou aktivitu buněk inkubovaných se vzrůstajícími koncentracemi sledovaných látek s buňkami inkubovanými v médiu bez přídatku sledovaných látek (100% aktivity).

Pro zjištění ovlivnění enzymové aktivity určitými látkami je třeba, aby byly buňky s těmito látkami inkubovány minimálně 24 hodin [123].

Postup práce:

Pro určení vlivu sledovaných cytostatik DOX, DAU a OR na 11 β -HSD 1 bylo nutné získat dostatečné množství životaschopných potkaních hepatocytů, ze kterých byla po 40 hodin trvajícím kontaktu s cytostatiky izolována kompletní RNA a připraveny subcelulární frakce. Před vlastní izolací hepatocytů byly připraveny promývací roztoky a média:

- Roztok solí:
 - NaCl (80,0g/1000ml redestilované vody)
 - KCl (4,0g/1000ml redestilované vody)
 - MgSO₄ · 7 H₂O (2,0g/1000ml redestilované vody)
- Fosfátový pufr:
 - Na₂HPO₄ · 12 H₂O (2,4g/200ml redestilované vody)
 - KH₂PO₄ (0,4g/200ml redestilované vody)
- Roztok NaHCO₃:
 - NaHCO₃ (16,8g/200ml redestilované vody)
- Roztok CaCl₂:
 - CaCl₂ (0,8g/10ml redestilované vody)
- Zásobní roztok:
 - roztok solí (100ml)
 - fosfátový pufr (10ml)
 - redestilovaná voda (890ml)

-
- Roztok A:
 - zásobní roztok (487,5ml)
 - roztok NaHCO₃ (12,5ml)
 - po probublání pneumoxidem (7 min ve vodní lázni při 37°C) bylo upraveno pH na 7,4 (0,1M roztokem HCl či 0,1M roztokem NaOH)
 - EGTA (75mg/500ml roztoku A)

 - Roztok B:
 - zásobní roztok (487,5ml)
 - roztok NaHCO₃ (12,5ml)
 - po probublání pneumoxidem (7 min ve vodní lázni při 37°C) bylo upraveno pH na 7,4 (0,1M roztokem HCl či 0,1M roztokem NaOH)
 - roztok CaCl₂ (1,0ml)

 - Roztok B_V (2x):
 - roztok B (150ml)
 - albumin (1,5g/150ml roztoku B)

 - Roztok B_K (2x):
 - roztok B (100ml)
 - kolagenasa (30mg/100ml roztoku B)

 - Roztok C:
 - zásobní roztok (500ml)
 - pH bylo upraveno na 7,4 a poté byl zásobní roztok vysterilizován v autoklávu
 - sterilní roztok CaCl₂ (1ml)

 - Živné médium ISOM:
 - roztok WILIAMS E*
 - WILIAMS E (10,93g), NaHCO₃ (2,2g)
 - roztok ATB (10ml) – penicilin 60mg, streptomycin 100mg/10 ml roztoku
 - doplněno redestilovanou vodou do 1000ml

 - roztok HAM F12*
 - HAM F12 (10,64g), NaHCO₃ (1,2g)
 - roztok ATB (10ml)
 - doplněno redestilovanou vodou do 1000ml

- roztoky WILIAMS E a HAM F12 byly smíchány v poměru 1:1
- takto připravený ISOM byl 7 minut probubláván pneumoxidem v laminárním boxu
- poté bylo upraveno pH na 7,2
- ISOM byl zfiltrován přes bakteriální filtr v laminárním boxu a znovu probublán pneumoxidem
- k části média byl přidán insulin (29mg/1000ml ISOMu)
- k části média byl přidán 5% fetální hovězí sérum (5ml FBS/100ml ISOMu)

Potkani byli uvedeni do celkové etherové narkózy. Byla jim otevřena břišní dutina, játra byla promyta roztokem A *in situ* a poté byla prostřížena vena portae. Celá nepoškozená játra byla přenesena do Büchnerovy nálevky umístěné nad odpadní nádobou.

Následné promývání jater bylo prováděno postupnou kanylací všech cév vstupujících do jater. Játra byla promývána nejprve perfusním roztokem A, až do jejich odkrvení (cca 5-10 min). Roztok A byl okysličován pneumoxidem. Obsažené chelatační činidlo (EGTA) vyvázalo z jaterní tkáně Ca^{2+} ionty, což vedlo k uvolnění mezibuněčných spojů. Poté byla játra promývána roztokem B_K s kolagenasou a vápníkem (nezbytný pro její aktivitu), dokud nebyla jaterní tkáň kolagenasou dostatečně natrávena (cca 5-7 min). Roztoky A a B_K byly uloženy ve vodní lázni o teplotě 37°C.



Obrázek 88. Promývání potkaních jater perfusním roztokem.

Po rozvolnění jaterní tkáně byla játra přenesena do skleněné misky umístěné v ledové lázni. Do misky byl přidán roztok B_V s vápníkem a albuminem, který ukončil působení kolagenasy, aby nedošlo k narušení vlastních hepatocytů. Pinzetou pak byly z jater do roztoku vyklepávány hepatocyty. Suspenze hepatocytů se zbytky jaterní tkáně byla přefiltrována přes nylonové sítko.



Obrázek 99. Mechanické rozrušování natrávené jaterní tkáně a uvolňování hepatocytů.



Obrázek 1010. Filtrace suspenze hepatocytů přes nylonové sítko.

Filtrát byl přelit do centrifugačních kyvet (4-8 kyvet po 50ml) a následně odstředěn v centrifuze (40g, 4°C, 5 min). Supernatant byl slit a peleta resuspendována zpětným pipetováním ve vychlazeném roztoku C s vápníkem. Vzniklá suspenze pak byla znovu odstředěna (40g, 4°C, 5 min). Tento krok byl zopakován ještě jednou, tentokrát již za sterilních podmínek v laminárním boxu (pro resuspendaci použit sterilní roztok C). Po centrifugaci byl supernatant slit v laminárním boxu, peleta resuspendována ve vychlazeném živném médiu ISOM (bez insulinu a bez FBS) a suspenze naposledy stočena ve sterilních vychlazených kyvetách (40g, 4°C, 5 min). Celkem tedy byly provedeny čtyři centrifugace (1x s roztokem B_v - nesterilní, 2x s roztokem C - nesterilní a sterilní, 1x s živným médiem ISOM - sterilní). Supernatant z poslední centrifugace byl slit v laminárním boxu a peleta resuspendována ve vychlazeném živném médiu ISOM s přísadou 5% FBS. 100ml suspenze hepatocytů pak bylo přeneseno z kyvet do kádinky.



Obrázek 1111. Hepatocyty na dně sterilních kyvet po centrifugaci s médiem ISOM.

Z kádinky byl do mikrozkušavky odebrán vzorek 30 μ l suspenze a k němu přidáno 30 μ l 0,4% roztoku trypanové modři v 0,15M NaCl a pufru o pH 7,4. Po promíchání repipetací byla směs nanášena do Bürkerovy komůrky a ta umístěna pod objektiv optického mikroskopu. Při zvětšení 10x20 byly počítány živé hepatocyty v deseti čtvercích komůrky. Z průměrného počtu živých hepatocytů v jednom čtverci byla určena koncentrace živých hepatocytů v suspenzi. Podle zjištěné koncentrace hepatocytů a s ohledem na jejich životnost byla suspenze zředěna na koncentraci $1 \cdot 10^6$ živých hepatocytů/ml pomocí živného média ISOM s FBS. Tato konečná suspenze byla nanášena na Petriho misky potažené kolagenem (3ml na každou misku o průměru 6cm).



Obrázek 1212. Nanášení suspenze hepatocytů na Petriho misky potažené kolagenem.

Misky byly přeneseny do CO₂ inkubátoru a byly v něm ponechány 4 hodiny při teplotě 37°C, aby došlo k uchycení hepatocytů ke dnu misek. Po uplynutí této doby bylo v laminárním boxu vyměněno médium za čerstvé – původní médium bylo z misek opatrně odsáto a na každou misku s hepatocyty pak bylo dodáno živné médium ISOM s insulinem (3ml na každou misku), již s obsahem jednotlivých testovaných cytostatik o koncentraci 0,2 μ M a 1,0 μ M. Použité koncentrace byly vybrány na základě provedeného MTT testu tak, aby byly pro hepatocyty netoxické. Ke kontrolním miskám byl dodán čistý ISOM s insulinem bez přídavku cytostatik.

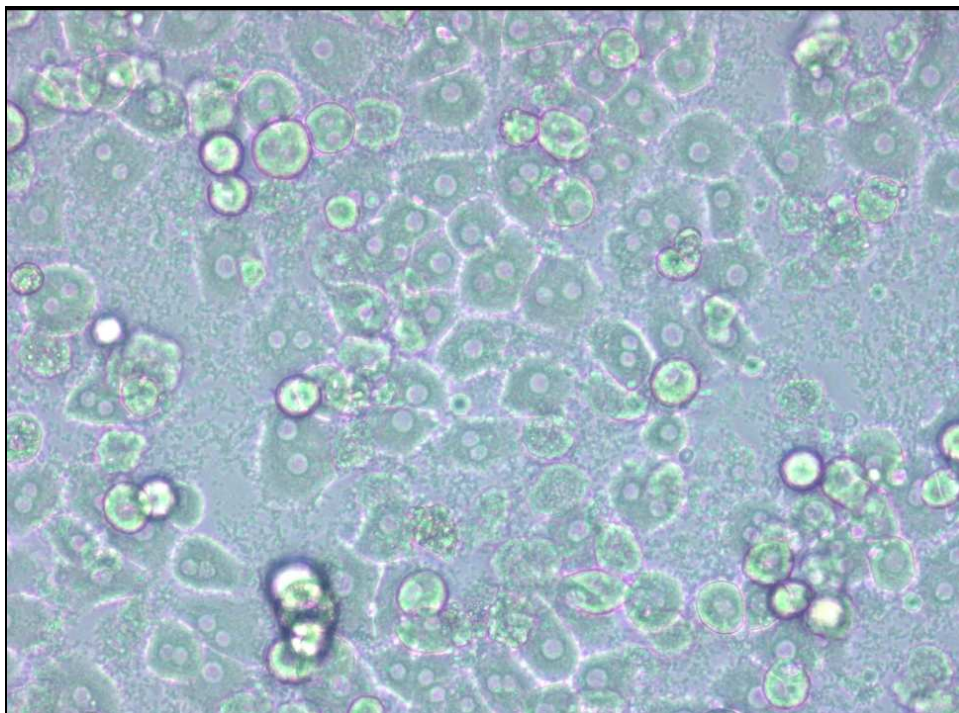
Tabulka 77. Koncentrace sledovaných cytostatik použité k ovlivnění hepatocytů.

Označení misky	Cytostatikum	Konc. cytostatika v živném médiu hepatocytů
K	-	-
DAU 0,2	daunorubicin	0,2 μ M
DAU 1,0		1,0 μ M
DOX 0,2	doxorubicin	0,2 μ M
DOX 1,0		1,0 μ M
OR 0,2	oracin	0,2 μ M
OR 1,0		1,0 μ M

Jednotlivá připravená živná média s obsahem cytostatika o dané koncentraci byla použita vždy pro 6 řádně označených misek s hepatocyty (DAU 0,2; DAU 1,0; DOX 0,2; DOX 1,0; OR 0,2; OR 1,0). K 6 miskám bylo přidáno pouze samotné živné médium bez cytostatika (K). Tyto misky sloužily jako kontrolní, byly důležité pro vyhodnocení výsledků jednotlivých experimentů.

Po výměně média byly hepatocyty opět uloženy do CO₂ inkubátoru a v něm ponechány při teplotě 37°C přibližně 40 hodin, po celý čas na ně působilo cytostatikum (kromě misek kontrolních). Po inkubaci byly z hepatocytů připraveny subcelulární frakce (mikrosomy) a izolována RNA, aby bylo možno zhodnotit ovlivnění enzymové aktivity a exprese 11 β -HSD 1. Pro přípravu mikrosomů byly využity 4 misky a pro izolaci RNA 2 misky s hepatocyty inkubovanými se sledovanými cytostatiky o konc. 0,2 μ M a 1,0 μ M či misky kontrolní.

Hepatocyty byly z jater potkanů izolovány celkem třikrát, ve třech samostatných, na sobě nezávislých pokusech (dále označovány jako A, B, C).



Obrázek 1313. Primární kultura hepatocytů získaná z potkaních jater.

4.2.2 Příprava mikrosomů z hepatocytů

Pro zjištění vlivu testovaných cytostatik na 11β -HSD 1 bylo třeba získat mikrosomální frakci hepatocytů, protože tato reductasa je v buňce lokalizována v mikrosomech. Principem přípravy subcelulárních frakcí je rozrušení buněčné struktury a následné oddělení mikrosomů od cytosolu frakční ultracentrifugací.

Postup práce:

Z inkubátoru byly vyndány vždy 4 misky s hepatocyty ovlivněnými příslušným cytostatikem a z nich bylo odsáto živné médium. Ihned po odsátí média byly misky položeny na drcený led. Poté bylo na každou misku napipetováno 0,5ml vychlazeného 0,1M fosfátového pufru o pH 7,4. Ze dna misek byly špachtlí seškrábnuty hepatocyty a vzniklá suspenze byla přenesena pipetou vždy ze dvou misek do jedné mikrozkušavky (tj. ze 4 misek s jedním cytostatikem o dané konc. takto vznikly 2 mikrozkušavky). Stejný postup byl proveden s kontrolními miskami. Stojánek s popsánými mikrozkušavkami byl po celou dobu v ledové lázni.

Mikrozkumavky byly uzavřeny, odstředěny v centrifuze (40g, 4°C, 4 min) a poté byl supernatant odsát pipetou. Stojánek s mikrozkumavkami (stále v ledové lázni) byl přenesen do chladicího boxu, kde bylo k peletě přidáno 0,5ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,4. Obsah mikrozkumavek byl resuspendován sonikací (do každé mikrozkumavky na 20s ponořen hrot ultrazvukového homogenizátoru Sonopuls asi 1 cm pod hladinu). Poté byly mikrozkumavky opět uzavřeny a centrifugovány v centrifuze Heraeus (20 000g, 4°C, 20 min). Po stočení byl supernatant v chladícím boxu odpipetován do předem vychlazených kyvet pro ultracentrifugu Sorvall, vždy ze dvou mikrozkumavek se stejným cytostatikem o dané konc. do jedné kyvety. Kyvety pak byly vloženy do pouzder a uzavřená pouzdra byla upevněna k rotoru ultracentrifugy Sorvall. Po ultracentrifugaci (105 000g, 2°C, 67 min) byla pouzdra přenesena do chladicího boxu, byly z nich vyjmuty kyvety a supernatant slit (cytosol). Sediment na dně kyvety byl po přidání 0,5ml 0,1M fosfátového pufru o pH 7,4 s 20% (v/v) glycerolu sonikován. Resuspendovaná směs (mikrosomy) byla po 260 μ l rozpipetována do popsaných mikrozkumavek.

Takto připravené mikrosomální frakce byly uchovávány v papírové krabičce za stavu hlubokého zmrazení při teplotě -80°C až do doby, kdy byly použity pro měření aktivity enzymu 11 β -HSD 1 a pro stanovení koncentrace bílkovin.

Mikrosomy použité pro cíle této práce byly připraveny z hepatocytů izolovaných ve třech samostatných, na sobě nezávislých pokusech A, B, C. Byly získány vždy dvě mikrozkumavky s mikrosomy pro každé cytostatikum a kontrolu.

Tabulka 88. Označení mikrosomů připravených z hepatocytů kontrolních a hepatocytů ovlivněných cytostatiky.

	Datum přípravy mikrosomálních frakcí		
	18.05.2004	22.10.2004	12.11.2004
Označení připravených mikrosomů (MIK)	A K	B K	C K
	A DAU 0,2	B DAU 0,2	C DAU 0,2
	A DAU 1,0	B DAU 1,0	C DAU 1,0
	A DOX 0,2	B DOX 0,2	C DOX 0,2
	A DOX 1,0	B DOX 1,0	C DOX 1,0
	A OR 0,2	B OR 0,2	C OR 0,2
	A OR 1,0	B OR 1,0	C OR 1,0

4.2.3 Stanovení koncentrace bílkovin

Principem použité metody pro stanovení koncentrace bílkovin v připravených mikrosomech 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 562nm [125].

Před měřením byl připraven v čas potřeby pracovní roztok C smícháním komerčně dodávaných roztoků A a B v poměru 50:1.

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

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Tato závislost byla zjištěna proměřením absorbancí šesti připravených standardních roztoků o známé koncentraci bílkoviny. Jako standardní bílkovina byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Roztoky byly připraveny z výchozího 0,1% roztoku BSA a destilované vody.

Tabulka 99. Složení roztoků pro kalibrační křivku.

Označení roztoku	Konc. BSA v roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	0,1% roztok BSA [μl]	Destilovaná voda [μl]
1	0	0	500
2	200	100	400
3	400	200	300
4	600	300	200
5	800	400	100
6	1000	500	0

Kalibrační křivka je přímka, byla provedena lineární regrese a na základě zjištěných parametrů rovnice přímky a naměřených absorbancí byla vypočtena koncentrace bílkovin [$\mu\text{g/ml}$] v jednotlivých mikrosomálních frakcích.

Postup práce:

Mikrosomální frakce byly 10x naředěny destilovanou vodou. Do každé z jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 10 μ l vzorku bílkovin (naředěné mikrosomy či kalibrační roztoky) a 200 μ l pracovního roztoku C. U slepého vzorku bylo místo bílkovin nanášeno 10 μ l destilované vody. Pro nanášení byla použita multikanálová pipeta, do každého jednoho sloupečku destičky (8 jamek) byl napipetován vždy stejný vzorek. Po promíchání složek v jamkách byla destička 30 minut inkubována při 37°C. Hodnoty absorbance byly změřeny při 562nm 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 každého vzorku byla průměrem z 8 naměřených hodnot, od nichž byla odečtena absorbance slepého vzorku.

Rozdíly mezi stanovenými koncentracemi bílkovin v kontrolních mikrosomech a mikrosomech ovlivněných jednotlivými sledovanými cytostatiky byly statisticky zpracovány nepárovým Studentovým t-testem se spolehlivostí 0,95.

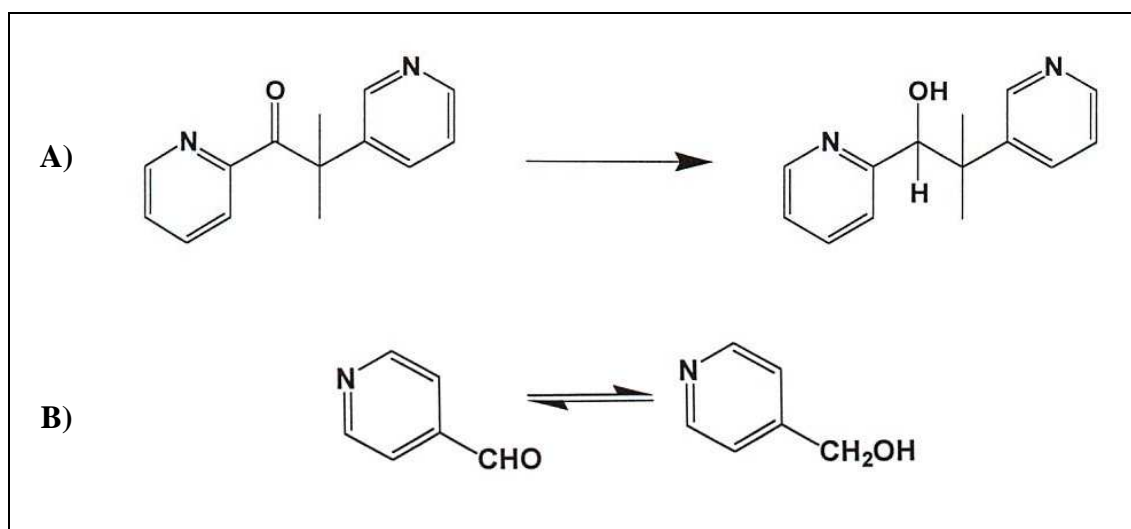
4.2.4 Stanovení aktivity mikrosomálních reductas spektrofotometricky

Stanovení aktivity cytosolických i mikrosomálních reductas je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP⁺ ve vzorku při 340nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí změřeného poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP⁺ ($\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reductas. Jednotka enzymové aktivity [U] je definována jako oxidace 1 μ mol NADPH/min při 25°C [126-129].

Koenzym NADPH je donorem vodíku v probíhajících oxidoredukčních reakcích. Redukce molekuly substrátu je vždy spojena s oxidací molekuly koenzymu. Na rozdíl od NADP⁺ absorbuje NADPH světlo o vlnové délce 340nm, čehož se s výhodou využívá při sledování reakcí dehydrogenas s koenzymem. Rychlost poklesu absorbance při 340nm je přímo úměrná koncentraci dehydrogenasy katalyzující oxidaci NADPH, takže měření rychlosti tohoto poklesu umožňuje odvodit množství enzymu přítomné v biologickém materiálu a vyjádřit jej v jednotkách aktivity [1].

V mikrosomálních frakcích připravených z hepatocytů ovlivněných i neovlivněných sledovanými cytostatiky byla spektrofotometricky stanovována aktivita 11 β -HSD 1 za využití jejího potenciálního substrátu metyraponu. Metyrapon je pevná látka rozpustná ve vodě o $M_r = 226\text{g/mol}$. Je redukován na alkoholický metabolit metyrapol cytosolickými i mikrosomálními enzymy náležícími do nadrodiny AKR (dihydrodioldehydrogenasami a karbonylreduktasou) a SDR (11 β -HSD) [89].

Pro ověření metodiky byla spektrofotometricky stanovována také aktivita další mikrosomální reduktasy - 3 α -HSD. Jako její substrát byl použit 4-pyridinkarboxaldehyd, kapalná látka o $M_r = 107\text{g/mol}$. V cytosolické frakci je redukován na 4-pyridylkarbinol aldehydreduktasou, roli mohou hrát i DD1, DD2 a DD4, v mikrosomální frakci je redukován 3 α -HSD [89].



Obrázek 1414. Schéma probíhající redukce substrátů. A) Redukce metyraponu na metyrapol. B) Redukce 4-pyridinkarboxaldehydu na 4-pyridylkarbinol.

Postup práce:

Před vlastním měřením bylo třeba připravit všechny potřebné pomůcky a jednotlivé složky reakční směsi. Byl připraven draselno-fosfátový pufr (0,1M; pH 6,0), zásobní roztok substrátů (0,1M vodný roztok metyraponu a 0,1M vodný roztok 4-pyridinkarboxaldehydu) a zásobní roztok NADPH (10mM vodný roztok), který je málo stabilní a cca po 7 hodinách je třeba připravit roztok nový. Jako katalyzátor reakce byla použita mikrosomální frakce s enzymy, která byla předem rozmrazena. Zásobní roztoky substrátů a NADPH a mikrosomy byly během měření uchovávány v ledové lázni, pufr za laboratorní teploty.

Tabulka 1010. Složení reakční směsi v kyvetě.

Substrát	Jednotlivé složky směsi
metyrapon	930 μ l draselno-fosfátový pufr (0,1M; pH 6,0)
	10 μ l zásobní roztok metyraponu (0,1M)
	10 μ l zásobní roztok NADPH (10mM)
	50 μ l mikrosomy (enzymy)
4-pyridin-karboxaldehyd	970 μ l draselno-fosfátový pufr (0,1M; pH 6,0)
	10 μ l zásobní roztok 4-pyridinkarboxaldehydu (0,1M)
	10 μ l zásobní roztok NADPH (10mM)
	10 μ l mikrosomy (enzymy)

Reakce probíhala v kyvetě pro spektrofotometr Helios ϵ , celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1ml. Výchozí koncentrace substrátů v reakční směsi tedy byla 1mM, výchozí koncentrace NADPH 0,1mM. Pro nastavení nulové absorbance na spektrofotometru byl připraven slepý vzorek, který byl tvořen jen pufrém, substrátem a NADPH.

Po přidání každé složky do kyvety byl její obsah řádně promíchán, kyveta byla uzavřena parafilmem a několikrát překllopena. Reakce byla odstartována přidáním enzymů do směsi, v tu chvíli byly zapnuty stopky. Hodnoty absorbance byly odečteny v čase 0 a 4 minuty.

Stanovení aktivity reduktas pro oba substráty bylo provedeno se všemi mikrosomálními frakcemi A, B, C vždy ve 4 paralelních měřeních. Z průměrného naměřeného rozdílu absorbance (v čase 0 a 4 minuty) byla určena změna absorbance za 1 minutu ($\Delta A/\text{min}$). Z této změny a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP⁺ byla vypočtena koncentrace NADPH, která v průběhu reakce zoxiduje na NADP⁺. Výpočet byl proveden dle Lambert-Beerova zákona ze vzorce:

$$\Delta A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

ΔA pokles absorbance

ϵ molární absorpční koeficient [$6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c molární koncentrace [M]

l tloušťka vrstvy (kyvety) [1 cm]

Enzymová aktivita byla vyjádřena v [mU], kde [U] je mezinárodní jednotka pro aktivitu vyjadřující množství substrátu v μmol přeměněné za 1 minutu. Specifická enzymová aktivita vyjadřuje aktivitu enzymu vztaženou na jednotku hmotnosti, v našem případě byla vyjádřena v [mU/mg bílkoviny]. Pro výpočet specifické enzymové aktivity bylo třeba stanovit koncentraci bílkovin.

Rozdíly v hodnotách enzymové aktivity a specifické enzymové aktivity mikrosomů ovlivněných jednotlivými sledovanými cytostatiky oproti mikrosomům kontrolním byly statisticky zpracovány nepárovým Studentovým t-testem se spolehlivostí 0,95.

4.2.5 Stanovení aktivity 11 β -HSD 1 inkubací mikrosomů s oracinem

Oracin je redukčními enzymy konvertován na 11-dihydrooracin (DHO). Redukce se účastní na mikrosomální úrovni 11 β -HSD 1. Platí úměra mezi aktivitou redukčních enzymů a množstvím oracinu, které je enzymaticky přeměněno na DHO. Po inkubaci mikrosomů s oracinem a koenzymem NADPH bylo zjišťováno množství DHO vzniklého během oxidoredukční reakce v reakční směsi za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Principem je dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Z množství DHO ($M_r = 372,85\text{g/mol}$) vytvořeného za 1 minutu byla stanovena enzymová aktivita a specifická enzymová aktivita mikrosomálních reductas.

Postup práce:

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky oracinu (1mM vodný roztok) a NADPH (6mM vodný roztok). Zásobní roztoky a mikrosomy byly během měření uchovávány v ledové lázni. Sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven z vodných 0,1M roztoků Na_2HPO_4 a NaH_2PO_4 .

Tabulka 1111. Složení inkubační směsi.

Jednotlivé složky směsi	
100 μl	zásobní roztok oracinu (1mM)
50 μl	zásobní roztok NADPH (6mM)
100 μl	mikrosomy (enzymy)
50 μl	sodno-fosfátový pufr (0,1M; pH 7,4)

Reakce probíhala v označených mikrozkušavkách. Celkový objem inkubační směsi byl 300 μ l. Výchozí koncentrace oracinu v inkubační směsi tedy byla 0,33mM, výchozí koncentrace NADPH 1mM.

Do označených mikrozkušavek bylo nejprve napipetováno uvedené množství zásobního roztoku oracinu a NADPH. Poté byla směs preinkubována při teplotě 37°C cca 5 minut. Vlastní enzymová reakce byla odstartována přidáním 50 μ l mikrosomální frakce a do směsi byl nakonec dodán ještě pufr. Všechny mikrozkušavky byly uzavřeny, promíchány na třepačce a poté inkubovány 60 minut při 37°C. Inkubace byla ukončena ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni a přidáním 30 μ l konc. amoniaku. Směs byla po přidání amoniaku promíchána.

Následujícím krokem byla extrakce lipofilních látek ze směsi do octanu ethylnatého. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,9ml 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 (0,8ml) byla pipetou přenesena do označených mikrozkušavek. Extrakty pak byly odpařeny v koncentrátoru do sucha (při 45°C asi 20 min). Suché vzorečky byly uchovávány až do HPLC analýzy v chladu a temnu.

Před vlastním provedením HPLC byly odparky rozpuštěny ve 250 μ l mobilní fáze a poté přepipetovány do insertů. Mobilní fázi tvořila směs 10mM hexansulfonanového pufru a acetonitrilu v poměru 3:1 v/v. Pufr byl připraven z hexansulfonanu sodného, obsahoval 0,1M roztok TEA a pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou na pH 3,27.

Pro kapalinovou chromatografii na přístroji Agilent 1100 byla použita kolona BDS Hypersil C18 (250x4mm). 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 340nm, Em 418nm).

S každou mikrosomální frakcí A, B, C byla provedena 2 paralelní měření (inkubace s oracinem i HPLC analýza). Nástřik na kolonu byl 100 μ l vzorku z celkového připraveného množství 250 μ l.

Z množství DHO vytvořeného za 1 minutu byla stanovena enzymová aktivita, která byla vyjádřena v [μ U], a specifická enzymová aktivita v [μ U/mg bílkoviny]. Pro výpočet specifické enzymové aktivity bylo třeba stanovit koncentraci bílkovin.

Rozdíly v hodnotách enzymové aktivity a specifické enzymové aktivity mikrosomů ovlivněných jednotlivými sledovanými cytostatiky oproti mikrosomům kontrolním byly statisticky zpracovány nepárovým Studentovým t-testem se spolehlivostí 0,95.

4.2.6 Izolace RNA z hepatocytů

Ve všech savčích buňkách existují tři hlavní třídy RNA: mediátorová m-RNA, transferová t-RNA a ribosomální r-RNA. Třída m-RNA je velikostně velmi heterogenní (1-5% z celkové buněčné RNA). Hraje důležitou roli v expresi genetické informace, její funkcí je zprostředkování přenosu informace uložené v genu do procesu proteosyntézy. Molekula m-RNA vzniká během transkripce, kdy dochází k přepisu nukleotidových sekvencí DNA do sekvencí RNA na základě komplementarity bazí, a slouží jako templát, podle kterého se řadí kódované aminokyseliny do polypeptidového řetězce [130].

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 vodné roztoky a materiál, které přijdou do styku se zpracovávaným vzorkem, zbaveny RNas. Je třeba používat sklo sterilní nebo omyté v 0,1% vodném roztoku diethylpyrokarbonátu, RNase-free pipetovací špičky, RNase-free vodu. Ruce a prachové částice jsou nejčastějšími zdroji kontaminace, proto je nutné při manipulaci se vzorkem používat rukavice a často je vyměňovat [131].

Pro izolaci kompletní RNA z hepatocytů byl použit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), 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 [123].

Použité kolony měly vazebnou kapacitu 100 μ g RNA a zachytily molekuly delší než 200 bazí. Veškeré operace byly prováděny za laboratorní teploty.

Postup práce:

RNA byla izolována vždy ze 2 misek s hepatocyty inkubovanými 40 hodin se sledovanými cytostatiky a ze 2 misek kontrolních. Z misek bylo odsáto živné médium. Poté bylo do misek napipetováno 600 μ l RLT pufru s přidaným β -merkptoethanolem (10 μ l/1ml pufru), tím začaly buňky lyzovat. Miskami bylo kýváno tak, aby se pufr rozprostřel po celém dně. Po zgelovatění byly rozrušené hepatocyty seškrábnuty špachtlí ze dna misek a pipetou přeneseny do označených mikrozkušavek (vždy z jedné misky do jedné mikrozkušavky). Do mikrozkušavek bylo přidáno 600 μ l 70% ethanolu a poté byl obsah promíchán na třepačce.

Izolační kolony byly umístěny do 2ml přiložených sběrných zkumavek a poté bylo z každého vzorku na zvláštní kolonku nanášeno 700 μ l. Zkušavky byly uzavřeny a stočeny v centrifuze (11 000 otáček/min, 15s). Tekutina proteklá kolonkou do zkumavky byla vylita do odpadu. Poté byla tato operace opakována ještě 3x (na stejnou kolonku bylo nanášeno dalších 700 μ l vzorku a provedena centrifugace). Pro každý vzorek (K; DAU 0,2; DAU 1,0; DOX 0,2; DOX 1,0; OR 0,2; OR 1,0 připravené v pokusech A, B, C) ze dvou mikrozkušavek byla použita jedna kolonka.

Poté byly kolony postupně promývány. Nejprve bylo na kolonku nanášeno 700 μ l pufru RW1 a provedena centrifugace (11 000 otáček/min, 15s), eluát byl vylit. Kolony byly přeneseny do čistých sběrných zkumavek, poté na ně bylo nanášeno 500 μ l pufru RPE, byly odstředěny (11 000 otáček/min, 15s) a proteklá tekutina odlita. 500 μ l pufru RPE bylo nanášeno ještě jednou, následovalo odstředění o odlití tekutiny.

Kolony pak byly přeneseny do 1,5ml sběrných mikrozkušavek, bylo na ně nanášeno 30 μ l RNase-free vody a poté byly stočeny v centrifuze (11 000 otáček/min, 60s), aby se RNA vymyla. Nanášení 30 μ l RNase-free vody a odstředování bylo ještě jednou zopakováno.

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

Kompletní RNA použitá v této práci pro kvantifikaci sledované m-RNA byla izolována hepatocytů ovlivněných i neovlivněných cytostatiky, které byly připraveny ve třech samostatných experimentech A, B, C.

Tabulka 1212. Označení RNA z hepatocytů kontrolních a ovlivněných cytostatiky.

	Datum izolace RNA z hepatocytů		
	18.05.2004	22.10.2004	12.11.2004
Označení získané RNA	A K	B K	C K
	A DAU 0,2	B DAU 0,2	C DAU 0,2
	A DAU 1,0	B DAU 1,0	C DAU 1,0
	A DOX 0,2	B DOX 0,2	C DOX 0,2
	A DOX 1,0	B DOX 1,0	C DOX 1,0
	A OR 0,2	B OR 0,2	C OR 0,2
	A OR 1,0	B OR 1,0	C OR 1,0

4.2.7 Kvantifikace izolované m-RNA metodou QRT-PCR

Pro kvantifikaci m-RNA, která byla izolována z hepatocytů ovlivněných cytostatiky a hepatocytů kontrolních, byla využita polymerasová řetězová reakce (PCR). Výhodami této molekulárně-biologické metody jsou možnost rychlé a mnohonásobné amplifikace zvoleného fragmentu nukleové kyseliny a vysoká citlivost detekce. PCR je možno použít pro zjištění a namnožení velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku, teoreticky by měla dostačovat i jedna jediná molekula DNA.

V našem případě polymerasové řetězové reakci předcházela reverzní transkripce. Termostabilní polymerasy využívané v PCR totiž nemohou jako templát využívat vlákno RNA. Při reverzní transkripci je podle m-RNA izolované z buněk syntetizována komplementární DNA pomocí virové reverzní transkriptasy. Takto získaná DNA je označována jako c-DNA (copy-DNA) [132]. Oproti molekule DNA obsahuje molekula c-DNA sekvenční bez intronů [130]. Molekula c-DNA slouží jako templát pro PCR [133].

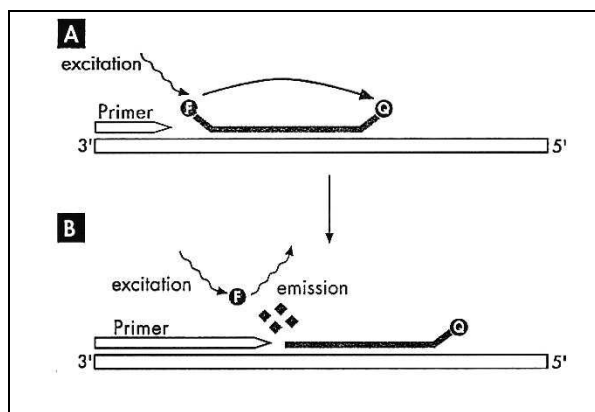
V reakční směsi pro PCR musí být kromě cílových amplifikovaných nukleových kyselin také jednořetězcové oligonukleotidy o délce 20-25 párů bazí (primery, próby), jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), vhodný reakční pufr a termostabilní enzym Taq polymerasa (z termofilní bakterie *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, kdy dochází ke štěpení relativně slabých vazeb mezi bazemi a vznikají dvě jednotlivá vlákna DNA.
- **Annealing.** Ve druhém kroku je teplota snížena a primery a próby v reakční směsi mohou vyhledat komplementární úseky cílové DNA a přichytit se k nim. Primery jsou specifické a jejich přítomnost je nezbytná pro činnost DNA polymerasy. Optimální teplotu annealingu je nutné hledat experimentálně, pohybuje se v rozmezí 40-60°C.
- **Extenze.** Třetí krok probíhá obvykle při teplotě 72°C, kdy je schopna Taq polymerasa pracovat. Nasedne na konec primeru a dosyntetizovává komplementární vlákno dvoušroubovice. Během extenze dochází k elongaci nového řetězce.

PCR probíhá v termocykleru ve 20-50 opakujících se cyklech [133].

V našem případě byla provedena QRT-PCR (kvantitativní PCR v reálném čase), která umožňuje zaznamenat produkty reakce bezprostředně po jejich vzniku v každém jednotlivém cyklu. Pro provedení byl použit QuantiTect Probe PCR® Kit (QIAGEN) a bylo postupováno podle přiložené příručky. Byly využity dvojitě značené próby, na jejichž 5'konci je navázán nosič fluorescence (fluorofor) a na 3'konci zhášec fluorescence (quencher). Dokud je nosič v dosahu působení zhášec, není naměřena žádná fluorescence (viz obr. 9A). Během elongace nově syntetizovaného řetězce je próba rozštěpena 5'→3' exonukleasovou aktivitou HotStarTaq DNA polymerasy, nosič fluorescence se dostává mimo dosah působení zhášec a to vede k detekci fluorescence (viz obr. 9B). Intenzita fluorescenčního záření roste s počtem cyklů, je úměrná počtu namnožené c-DNA [134].



Obrázek 1515. Schématické znázornění principu dvojitě značené próby v QRT-PCR. (F) fluorofor; (Q) zhášec

Pro zjištění ovlivnění exprese cílového genu je třeba vyhodnotit také expresi tzv. housekeepingového genu. Housekeepingové geny jsou exprimovány ve všech buňkách, kódují proteiny nezbytné pro udržování a 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) [123].

QRT-PCR byla provedena v cykleru LightCycler (ROCHE). Tento přístroj zaznamenává změny intenzity fluorescence v závislosti na počtu proběhlých cyklů a je spojen s počítačem, jehož software zobrazuje naměřená data v grafickém formátu a umožňuje jejich analýzu. Výstupem měření jsou hodnoty C_T . Pro vyhodnocení získaných dat byla užita metoda relativní kvantifikace popisující změny v expresi sledovaných genů v hepatocytech ovlivněných cytostatiky v porovnání s kontrolou. Vhodnou metodou pro analýzu relativních změn v genové expresi je $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoda [135]. Nejprve je třeba zjistit hodnotu $\Delta\Delta C_T$ dle vzorce:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T,HSD} - C_{T,PBGD})_{\text{vzorek}} - (C_{T,HSD} - C_{T,PBGD})_{\text{kontrola}}$$

C_Tvýstup z QRT-PCR

HSDsledovaný gen pro 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu 1

PBGD.....housekeepingový gen pro porfobilinogendeaminasu

Takto získaná hodnota $\Delta\Delta C_T$ se dosadí do vzorce [135]:

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

Hodnota x u kontrol je vždy 1,00. U vzorků by měla být hodnota x alespoň dvakrát vyšší, aby bylo možno považovat rozdíl v expresi sledovaného genu v ovlivněných hepatocytech za statisticky významný [136].

Z hodnot $2^{-\Delta\Delta C_T}$ byla vyjádřena procentuálně exprese sledovaného genu pro 11 β -HSD 1 v hepatocytech ovlivněných antracykliny a oracinem o koncentraci 0,2 a 1,0 μ M. Expresi genu pro 11 β -HSD 1 v hepatocytech kontrolních je považována za 100%.

Postup práce:

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 QuantiTect Probe PCR® Kit (QIAGEN). Nejprve byl z jednotlivých složek připraven Master Mix podle tabulky 13. 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.

Tabulka 1313. Objemy jednotlivých složek tvořících Master Mix.

Jednotlivé složky Master Mixu		Poznámka
150 μ l	QuantiTect Probe PCR Master Mix	zajišťuje koncentraci 4mM MgCl ₂ (Mg ²⁺ jsou nutné pro aktivitu DNA polymerasy)
30 μ l	roztok primerů A, B a próby	optimální koncentrace jednotlivých primerů je 0,5 μ M, próby 0,1-0,2 μ M
3 μ l	RT Mix	zajišťuje průběh reverzní transkripce
87 μ l	RNase-free voda	

Bylo připraveno po 2 kapilárách pro každý vzorek izolované RNA – v jedné kapiláře byly primery a próba specifické pro housekeepingový gen PBGD a ve druhé primery a próba specifické pro gen enzymu 11 β -HSD 1.

QRT-PCR proběhla v LightCycleru (ROCHE), který využívá pro excitaci vlnovou délku $\lambda = 470\text{nm}$. Chlazení probíhá rychlostí 20°C/min. Ve vzorku nejprve proběhla reverzní transkripce (20 min, 50°C), při které byla dle m-RNA 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.

Tabulka 1414. Reakční podmínky v jednotlivých fázích provedené PCR.

Fáze reakce	Teplota [°C]	Čas [min]
reverzní transkripce	50	20
počáteční inkubace	95	15
denaturace	95	0
annealing/extenze	60	1

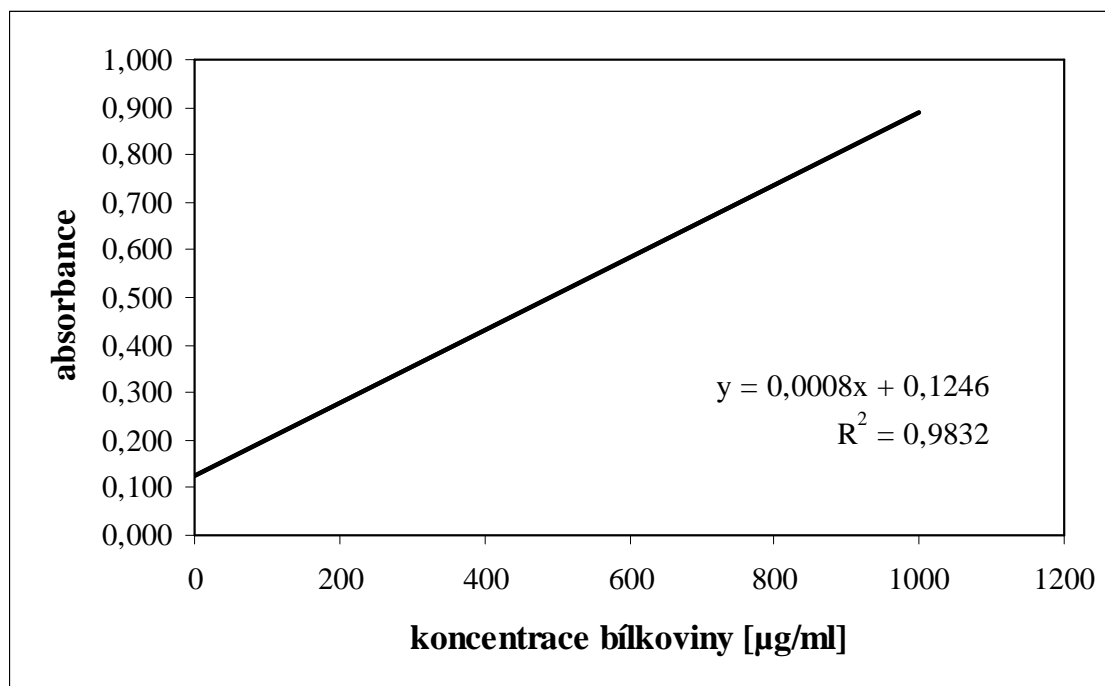
5 VÝSLEDKY

5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVIN

Při zjišťování koncentrace bílkovin v mikrosomech připravených z cytostatiky ovlivněných a kontrolních hepatocytů bylo postupováno výše popsáním způsobem (viz kapitola 4.2.3). Bylo potřeba nejprve sestavit kalibrační křivku vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Byly proměřovány absorbance připravených roztoků BSA o známé koncentraci. Hodnoty absorbance použité pro sestavení jednotlivých bodů křivky jsou průměrem z 8 naměřených hodnot. Veškeré výsledky jsou vyjádřeny ve formě $x \pm \text{S.D.}$ (směrodatná odchylka).

Tabulka 1515. Průměrné hodnoty absorbance (A) kalibračních roztoků.

Označení	Konc. BSA [$\mu\text{g/ml}$]	A \pm S.D.
1	0	0,106 \pm 0,006
2	200	0,277 \pm 0,018
3	400	0,491 \pm 0,051
4	600	0,530 \pm 0,071
5	800	0,746 \pm 0,015
6	1000	0,884 \pm 0,039



Obrázek 1616. Kalibrační křivka.

Rovnice získané přímkou je $y = 0,0008x + 0,1246$ s hladinou spolehlivosti $R^2 = 0,9832$. Z průměrných hodnot absorbance jednotlivých vzorků (vždy z 8 paralelních měření) a z parametrů rovnice přímkou byly vypočítány koncentrace bílkoviny v připravených mikrosomech.

Tabulka 1616. Naměřené hodnoty absorbance (A) a vypočítané množství bílkoviny [mg] v 1ml mikrosomální frakce jednotlivých vzorků.

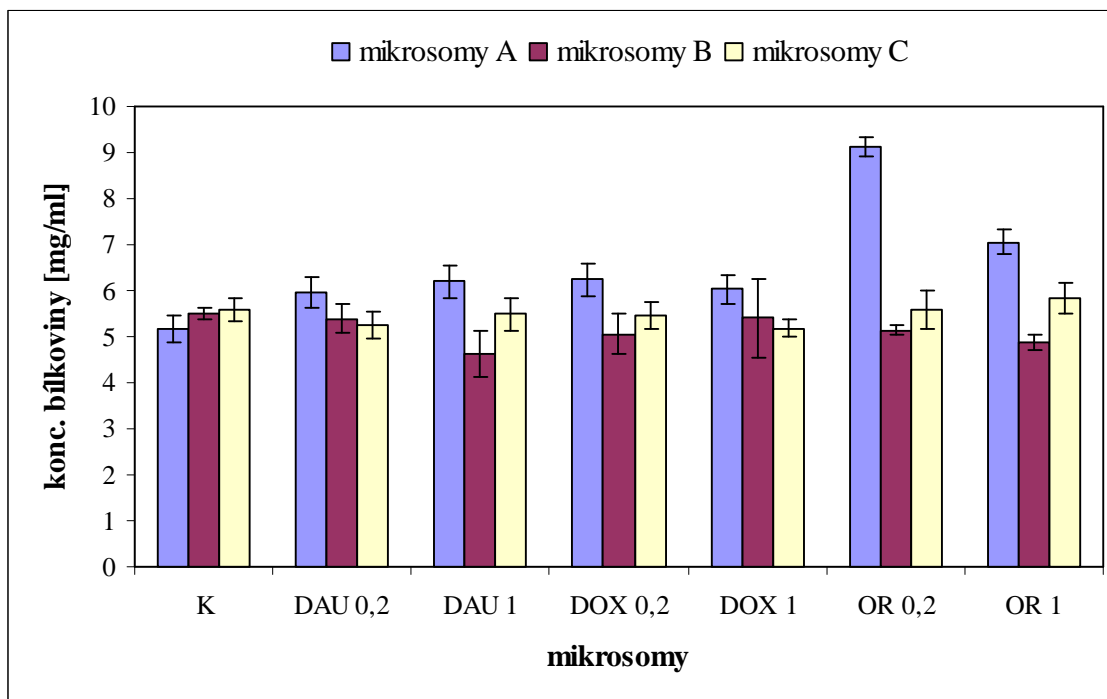
Vzorky	A ± S.D.	Konc. bílkoviny* ± S.D. [mg/ml]
A K	0,538 ± 0,023	5,17 ± 0,28
A DAU 0,2	0,602 ± 0,028	5,96 ± 0,34
A DAU 1,0	0,620 ± 0,028	6,19 ± 0,35
A DOX 0,2	0,624 ± 0,029	6,25 ± 0,36
A DOX 1,0	0,607 ± 0,025	6,03 ± 0,31
A OR 0,2	0,856 ± 0,017	9,14 ± 0,21
A OR 1,0	0,689 ± 0,021	7,06 ± 0,27
B K	0,564 ± 0,010	5,50 ± 0,13
B DAU 0,2	0,556 ± 0,024	5,39 ± 0,30
B DAU 1,0	0,494 ± 0,039	4,62 ± 0,49
B DOX 0,2	0,529 ± 0,035	5,06 ± 0,44
B DOX 1,0	0,557 ± 0,068	5,41 ± 0,85
B OR 0,2	0,535 ± 0,009	5,14 ± 0,11
B OR 1,0	0,514 ± 0,014	4,87 ± 0,17
C K	0,570 ± 0,020	5,57 ± 0,25
C DAU 0,2	0,545 ± 0,024	5,26 ± 0,30
C DAU 1,0	0,564 ± 0,028	5,49 ± 0,35
C DOX 0,2	0,563 ± 0,023	5,48 ± 0,29
C DOX 1,0	0,540 ± 0,015	5,19 ± 0,19
C OR 0,2	0,572 ± 0,034	5,60 ± 0,42
C OR 1,0	0,592 ± 0,026	5,84 ± 0,33

*Koncentrace bílkoviny v mikrosomálních frakcích ovlivněných i neovlivněných hepatocytů byly získány dosažením do vzorce:

$$\text{konc. bílkoviny [mg/ml]} = \frac{A - 0,1246}{0,0008} \cdot \frac{10}{1000}$$

10..... zředění mikrosomů

1000..... převod z [μg/ml] na [mg/ml]



Obrázek 1717. Grafické vyjádření koncentrace bílkoviny [mg/ml] v připravených mikrosomech.

Koncentrace bílkoviny v jednotlivých mikrosomálních frakcích ovlivněných sledovanými cytostatiky byly srovnávány s koncentracemi bílkoviny v mikrosomech kontrolních. Byly porovnávány vždy mikrosomy připravené v jednom dni (zvláště mikrosomy A, B, C). Zvýšené množství bílkoviny oproti kontrolám bylo prokázáno nepárovým Studentovým t-testem se spolehlivostí 0,95 jen u mikrosomů A DAU 0,2; A DAU 1,0; A DOX 0,2; A DOX 1,0; A OR 0,2; A OR 1,0 a C OR 1,0. Ostatní mikrosomy z ovlivněných hepatocytů obsahovaly pouze nepatrně vyšší nebo dokonce nižší množství bílkoviny než kontroly. Z naměřených výsledků je zřejmé, že nejvyšší koncentrace bílkoviny byly nalezeny v mikrosomech z řady hepatocytů označené A, přičemž nejvýznamnější rozdíl oproti kontrole byl nalezen u hepatocytů ovlivněných oracinem.

5.2 STANOVENÍ AKTIVITY MIKROSOMÁLNÍCH REDUKTAS SPEKTROFOTOMETRICKY

Touto metodou byla stanovována aktivita mikrosomálních reductas vykazujících podobnou aktivitu vůči užitým substrátům jako lidské jaterní HSD. Aktivita 11 β -HSD 1 byla měřena vůči metyraponu, aktivita 3 α -HSD vůči 4-pyridinkarboxaldehydu.

Postupem popsaným v kapitole 4.2.4 byly zjištěny rozdíly absorbance (ΔA) reakční směsi v čase 0 a 4 minuty vždy ve 4 paralelních měřeních pro každý substrát a mikrosomy. Z průměrných hodnot ΔA vztažených na 1 minutu byly vypočítány koncentrace NADPH přeměněného během oxidoredukční reakce v jednotlivých vzorcích dle Lambert-Beerova zákona. Následně byla vyjádřena enzymová aktivita a specifická enzymová aktivita mikrosomálních reductas v jednotlivých mikrosomech.

Touto metodou nebyla detekována žádná redukční aktivita 11 β -HSD 1 vůči metyraponu (pravděpodobně z důvodu nižší citlivosti spektrofotometrické metody), proto jsou dále uváděna pouze data a výsledky pro redukci 4-pyridinkarboxaldehydu mikrosomálním enzymem 3 α -HSD. Aktivita 11 β -HSD 1 byla zjišťována inkubací s oracinem a následnou HPLC analýzou (viz kapitola 5.3).

Tabulka 1717. Naměřené hodnoty $\Delta A/\text{min}$ a vypočítané aktivity $3\alpha\text{-HSD}$ v jednotlivých mikrosomálních frakcích.

Vzorky	$\Delta A/\text{min}$ [min^{-1}]	c^* [nmol/ml]	Enzymová aktivita** [mU]	Specifická enzymová aktivita** [mU/mg]
A K	0,0051	0,81	$80,7 \pm 8,8$	$15,6 \pm 1,7$
A DAU 0,2	0,0070	1,12	$111,6 \pm 11,7$	$18,7 \pm 2,0$
A DAU 1,0	0,0056	0,90	$89,7 \pm 12,4$	$14,5 \pm 2,0$
A DOX 0,2	0,0078	1,24	$123,6 \pm 25,2$	$19,8 \pm 4,0$
A DOX 1,0	0,0061	0,98	$97,7 \pm 14,7$	$16,2 \pm 2,4$
A OR 0,2	0,0056	0,89	$88,7 \pm 19,6$	$9,8 \pm 2,2$
A OR 1,0	0,0048	0,77	$76,8 \pm 9,4$	$11,2 \pm 1,4$
B K	0,0025	0,40	$39,9 \pm 3,3$	$7,4 \pm 0,6$
B DAU 0,2	0,0028	0,45	$44,9 \pm 3,8$	$8,3 \pm 0,7$
B DAU 1,0	0,0028	0,44	$43,9 \pm 0,0$	$8,8 \pm 0,0$
B DOX 0,2	0,0028	0,44	$43,9 \pm 4,6$	$8,7 \pm 0,9$
B DOX 1,0	0,0023	0,37	$37,2 \pm 2,3$	$6,9 \pm 0,4$
B OR 0,2	0,0030	0,48	$47,8 \pm 5,6$	$9,3 \pm 1,1$
B OR 1,0	0,0031	0,50	$49,8 \pm 6,9$	$10,2 \pm 1,4$
C K	0,0026	0,41	$41,4 \pm 8,2$	$7,5 \pm 1,5$
C DAU 0,2	0,0030	0,48	$47,8 \pm 0,0$	$9,1 \pm 0,0$
C DAU 1,0	0,0029	0,47	$46,9 \pm 8,8$	$8,5 \pm 1,6$
C DOX 0,2	0,0030	0,48	$47,8 \pm 0,0$	$8,7 \pm 0,0$
C DOX 1,0	0,0021	0,33	$32,9 \pm 8,2$	$6,5 \pm 1,6$
C OR 0,2	0,0026	0,42	$41,9 \pm 8,3$	$7,5 \pm 1,5$
C OR 1,0	0,0030	0,48	$47,8 \pm 0,0$	$8,2 \pm 0,0$

*Koncentrace NADPH přeměněného během reakce byly získány dosazením do vzorce plynoucího z Lambert-Beerova zákona:

$$c [\text{nmol/ml}] = \frac{\Delta A/\text{min}}{6270 \cdot l} \cdot 10^6$$

10^6 převod z [mol/l] na [nmol/ml]

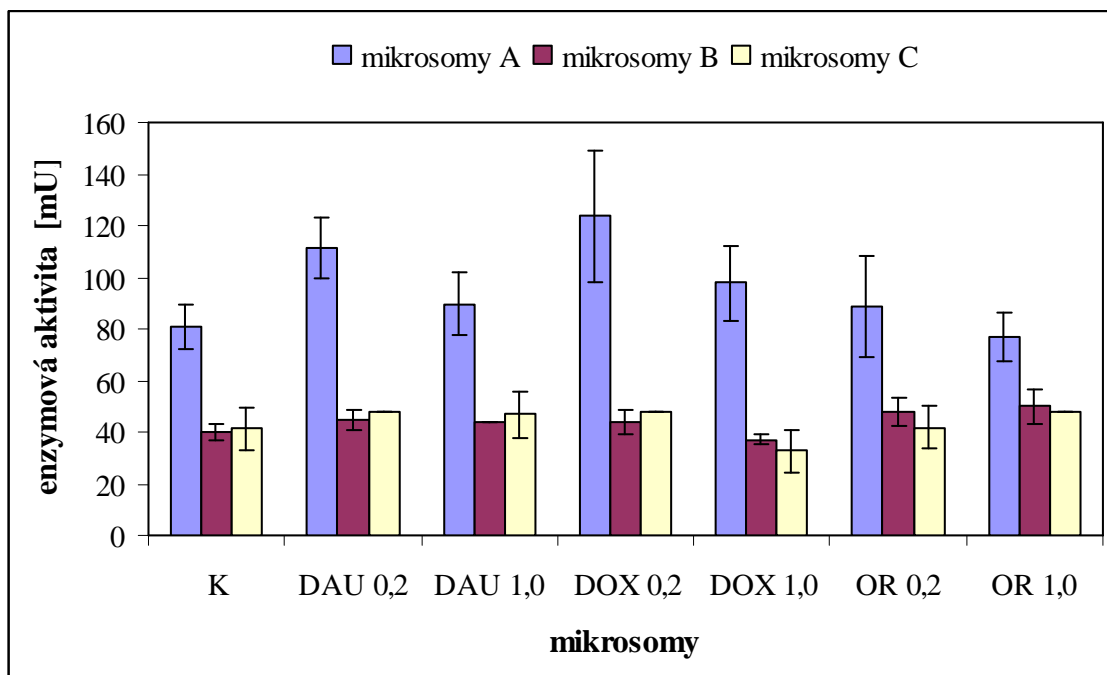
**Hodnoty enzymové aktivity byly získány dosazením do vzorce:

$$\text{enzymová aktivita [mU]} = c[\text{nmol/ml}] \cdot 100$$

100 přepočít z 10 μ l na 1ml mikrosomů

***Po vztážení vypočítané aktivity na koncentraci bílkoviny v mikrosomech byly získány hodnoty specifické enzymové aktivity:

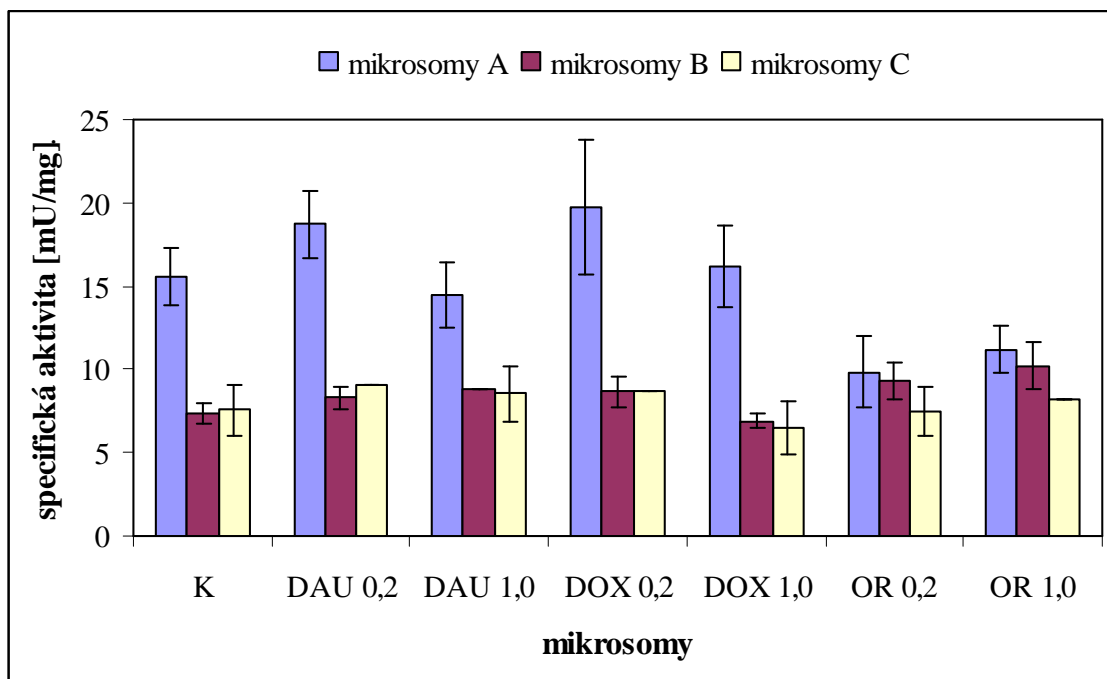
$$\text{specifická enzymová aktivita [mU/mg]} = \frac{\text{enzym. aktivita [mU]}}{\text{konc. bílkoviny [mg/ml]}}$$



Obrázek 1818. Grafické vyjádření enzymové aktivity 3 α -HSD v 1ml mikrosomů.

Aktivity 3 α -HSD v mikrosomech inkubovaných 40 hodin s jednotlivými cytostatiky byly porovnávány s aktivitou enzymu nalezenou v mikrosomech kontrolních (inkubovaných s čistým médiem), aby bylo možno posoudit vliv cytostatik na aktivitu mikrosomální 3 α -HSD. Rozdíly v aktivitě enzymu byly statisticky zhodnoceny nepárovým Studentovým t-testem, kdy byla prokazována hypotéza (se spolehlivostí 0,95), že aktivita v ovlivněných mikrosomech je významně vyšší než v mikrosomech kontrolních ze stejné řady připravených mikrosomů (A, B, C). Statisticky významný rozdíl byl dokázán jen u mikrosomů A DAU 0,2; A DOX 0,2; B OR 1,0. Nejvyšší aktivitu 3 α -HSD vykazovaly mikrosomy označené jako A.

Protože jednotlivé mikrosomální frakce se vzájemně liší koncentrací bílkoviny, mohou být nalezené enzymové aktivity zavádějící. Proto byly aktivity 3 α -HSD vztaheny na koncentraci bílkoviny v daných mikrosomech. Výsledné hodnoty specifických aktivit jsou uvedeny v tabulce 17.



Obrázek 1919. Grafické vyjádření specifické aktivity 3 α -HSD v mikrosomech.

Významně zvýšené hodnoty specifické aktivity 3 α -HSD oproti kontrole byly zaznamenány v ovlivněných mikrosomech A DAU 0,2; A DOX 0,2; B DAU 1,0; B DOX 0,2; B OR 0,2 a B OR 1,0. V mikrosomech C nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ve specifické aktivitě 3 α -HSD ovlivněných mikrosomů oproti kontrole. Nejvyšší specifické aktivity enzymu vykazovaly mikrosomální frakce A.

5.3 STANOVENÍ AKTIVITY 11 β -HSD 1 INKUBACÍ MIKROSOMŮ S ORACINEM

Po inkubaci mikrosomů s oracinem a následné extrakci vytvořeného DHO do octanu ethylnatého byla provedena HPLC analýza. Postup práce při inkubaci a HPLC byl popsán v kapitole 4.2.5. Výstupem z HPLC analýzy jednotlivých vzorků bylo množství DHO (m) detekované v objemu nastříknutém na kolonu. Nástřík na kolonu byl 100 μ l vzorku. Hodnoty uvedené v tabulce 18 jsou průměrem ze 2 paralelních měření. Množství veškerého DHO vzniklého za 1 hodinu probíhající oxidoredukční reakce bylo převedeno na látkové množství (n). Z látkového množství DHO vytvořeného za 1 minutu byla následně vyjádřena aktivita a specifická aktivita 11 β -HSD 1 v jednotlivých mikrosomech.

Tabulka 1818. Množství DHO detekované při HPLC analýze a hodnoty aktivity a specifické aktivity 11 β -HSD 1 v jednotlivých mikrosomálních frakcích.

Vzorky	m DHO [ng/100 μ l]	n DHO* [nmol]	Enzymová aktivita** [μ U]	Specifická enzymová aktivita*** [μ U/mg]
A K	16,745	0,112	18,7 \pm 1,0	3,6 \pm 0,2
A DAU 0,2	22,199	0,149	24,8 \pm 0,8	4,2 \pm 0,1
A DAU 1,0	21,696	0,145	24,2 \pm 0,7	3,9 \pm 0,1
A DOX 0,2	22,587	0,151	25,2 \pm 0,4	4,0 \pm 0,1
A DOX 1,0	19,037	0,128	21,3 \pm 1,2	3,5 \pm 0,2
A OR 0,2	18,222	0,122	20,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,0
A OR 1,0	16,354	0,110	18,3 \pm 0,0	2,7 \pm 0,0
B K	24,845	0,167	27,8 \pm 1,9	5,1 \pm 0,3
B DAU 0,2	22,352	0,150	25,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,0
B DAU 1,0	20,319	0,136	22,7 \pm 0,7	4,6 \pm 0,1
B DOX 0,2	23,354	0,157	26,1 \pm 0,4	5,2 \pm 0,1
B DOX 1,0	17,912	0,120	20,0 \pm 0,5	3,7 \pm 0,1
B OR 0,2	23,285	0,156	26,0 \pm 0,7	5,1 \pm 0,1
B OR 1,0	23,501	0,158	26,3 \pm 1,4	5,4 \pm 0,3
C K	33,485	0,225	37,4 \pm 1,3	6,8 \pm 0,2
C DAU 0,2	30,651	0,206	34,3 \pm 2,9	6,5 \pm 0,5
C DAU 1,0	28,590	0,192	31,9 \pm 2,4	5,8 \pm 0,4
C DOX 0,2	36,691	0,246	41,0 \pm 2,7	7,5 \pm 0,5
C DOX 1,0	10,182	0,068	11,4 \pm 0,5	2,2 \pm 0,1
C OR 0,2	36,432	0,244	40,7 \pm 0,3	7,3 \pm 0,1
C OR 1,0	31,448	0,211	35,1 \pm 1,3	6,0 \pm 0,2

*HPLC analýzou bylo zjištěno množství DHO [ng] ve 100 μ l nástřiku (m). Toto množství bylo přepočítáno na 250 μ l jednotlivých vzorků. Celkové množství DHO vytvořeného v jednotlivých mikrosomech bylo převedeno na látkové množství (n) a vyjádřeno v [nmol]. Hodnoty n byly získány dosazením do vzorce:

$$n \text{ [nmol]} = \frac{m \text{ [ng]} \cdot 2,5}{372,85}$$

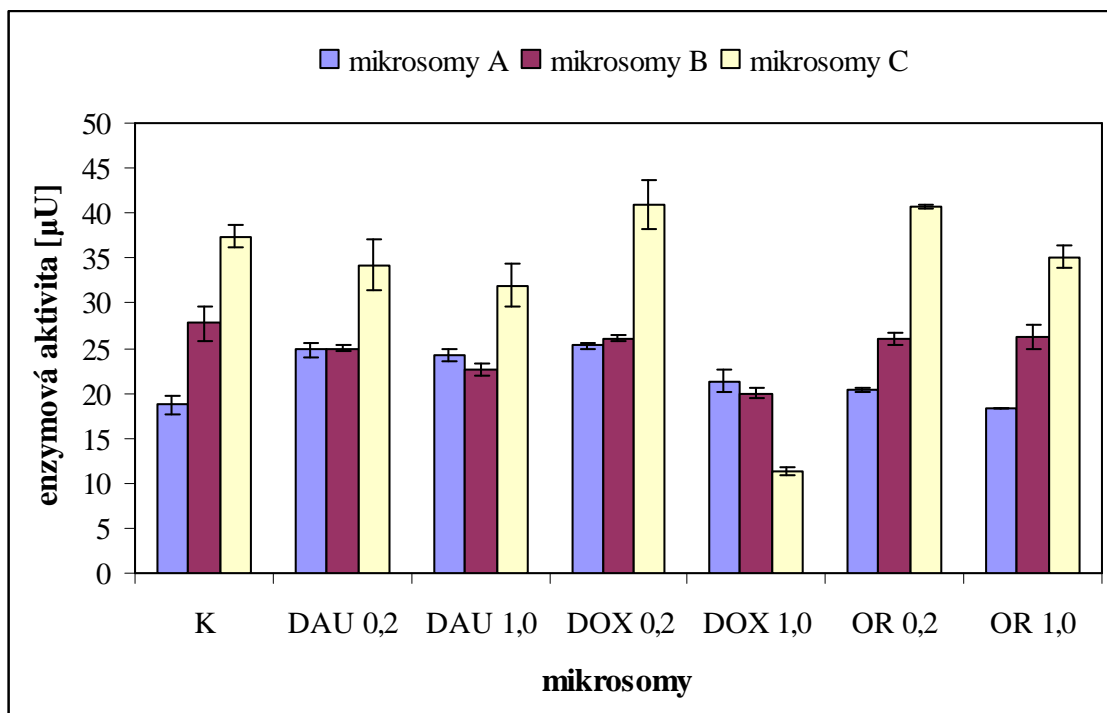
2,5 přepočít na 250 μ l připravených vzorků
372,85 .. M_r DHO

**Hodnoty enzymové aktivity byly získány dosazením do vzorce:

$$\text{enzymová aktivita } [\mu\text{U}] = \frac{n \text{ [nmol]}}{60} \cdot 10 \cdot 1000$$

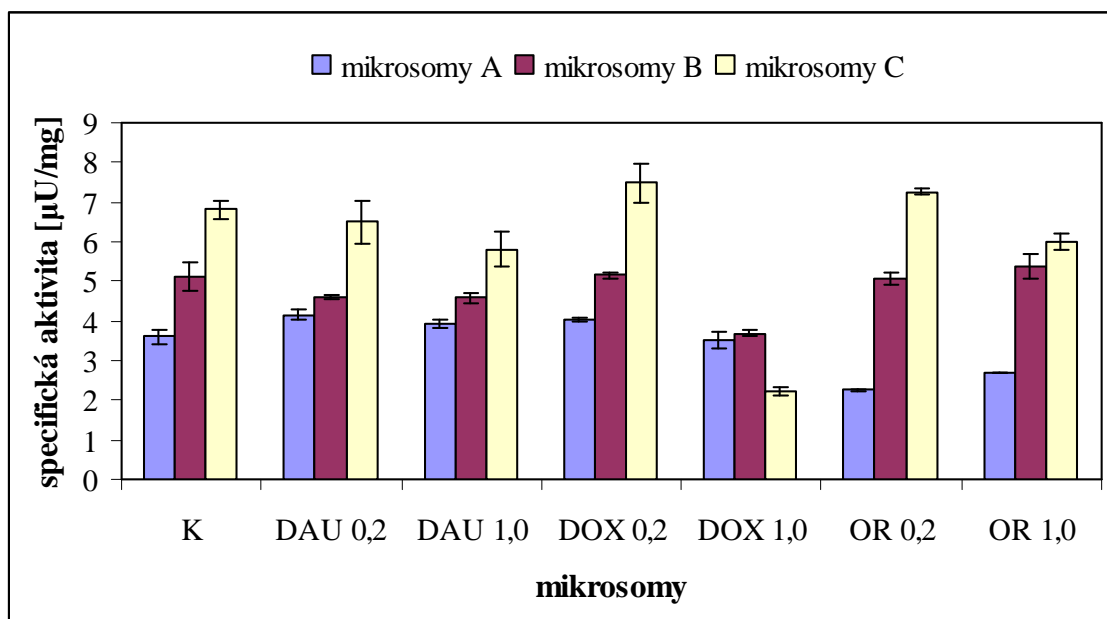
60 přepočít n DHO vytvořeného za 1 hod na n DHO vytvořené za 1min
10 přepočít ze 100 μ l na 1ml mikrosomů
1000 převod z [mU] na [μ U]

***Specifická enzymová aktivita byla získána vztahem aktivity na koncentraci bílkoviny (viz 5.2).



Obrázek 2020. Grafické vyjádření aktivity 11β-HSD 1 v 1ml mikrosomů.

V rámci stejné řady mikrosomů (A, B, C) byly porovnávány aktivity enzymu 11β-HSD 1 v jednotlivých ovlivněných mikrosomech s aktivitou v mikrosomech kontrolních. Statisticky významné rozdíly v aktivitě 11β-HSD 1 byly prokázány nepárovým Studentovým t-testem se spolehlivostí 0,95 u mikrosomů A DAU 0,2; A DAU 1,0; A DOX 0,2; A DOX 1,0; C DOX 0,2; C OR 0,2.



Obrázek 2121. Grafické vyjádření specifické aktivity 11β-HSD 1 v mikrosomech.

Specifické aktivity lépe ukazují vzájemné rozdíly v aktivitě enzymu, protože berou v úvahu koncentraci bílkovin v mikrosomech. Statisticky významné zvýšení specifické aktivity 11 β -HSD 1 oproti kontrole bylo prokázáno se spolehlivostí 0,95 jen u mikrosomů A DAU 0,2; A DAU 1,0; A DOX 0,2; C DOX 0,2 a C OR 0,2. Nejnižší specifické aktivity byly nalezeny v mikrosomech A, nejvyšší specifické aktivity v mikrosomech C.

5.4 KVANTIFIKACE IZOLOVANÉ m-RNA METODOU QRT-PCR

Ke kvantifikaci m-RNA pro 11 β -HSD 1 izolované z cytostatiky ovlivněných a kontrolních hepatocytů byla použita QRT-PCR, jíž předcházela reverzní transkripce. Princip, vlastní provedení a postup při zpracování výsledků QRT-PCR byly podrobně popsány v kapitole 4.2.7. Jako housekeepingový gen byl sledován gen pro porfobilinogendeaminasu (PBGD). Pro analýzu dat získaných z PCR byla užitá metoda relativní kvantifikace - tzv. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metoda.

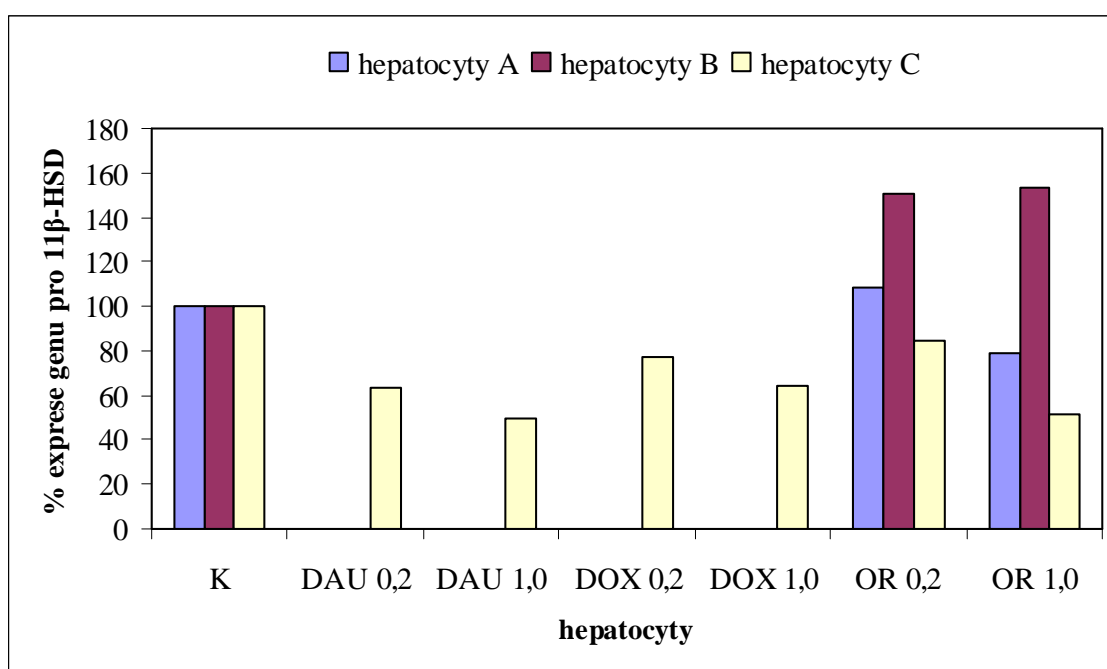
V době vzniku této diplomové práce byly k dispozici výsledky kvantifikace m-RNA pro 11 β -HSD 1 pouze u vzorků uvedených v tabulce 19. Mediátorová RNA izolovaná z hepatocytů A a B ovlivněných daunorubicinem a doxorubicinem o koncentraci 0,2 a 1,0 μ M byla předána ke kvantifikaci, pro tuto práci však zatím nebyly výsledky jejich PCR analýzy dostupné.

Tabulka 1919. Hodnoty C_T pro 11 β -HSD a PBGD a % exprese genu pro 11 β -HSD.

Vzorky	$C_{T(HSD)}$	$C_{T(PBGD)}$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	% exprese
A K	21,18	22,30	0,00	1,00	100
A OR 0,2	21,43	22,66	-0,11	1,08	108
A OR 1,0	21,69	22,47	0,34	0,79	79
B K	21,80	22,02	0,00	1,00	100
B OR 0,2	21,69	22,50	-0,59	1,51	151
B OR 1,0	21,26	22,10	-0,62	1,54	154
C K	20,74	22,19	0,00	1,00	100
C DAU 0,2	21,48	22,27	0,66	0,63	63
C DAU 1,0	21,74	22,18	1,01	0,50	50
C DOX 0,2	21,30	22,37	0,38	0,77	77
C DOX 1,0	25,11	25,92	0,64	0,64	64
C OR 0,2	21,03	22,24	0,24	0,85	85
C OR 1,0	21,62	22,11	0,96	0,51	51

Hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$ u kontrol jsou vždy 1,00. Aby bylo možno považovat expresi genu pro 11 β -HSD 1 v hepatocytech ovlivněných sledovanými cytostatiky za významně zvýšenou oproti expresi v hepatocytech neovlivněných, měla by být hodnota $2^{-\Delta\Delta C_T}$ alespoň 2,00.

Expresé genu pro 11 β -HSD 1 v hepatocytech ovlivněných cytostatiky byla vyjádřena procentuálně (100% představuje expresi v hepatocytech cytostatiky neovlivněných).



Obrázek 2222. Grafické znázornění genové exprese 11 β -HSD 1.

Dostupné výsledky PCR byly značně nejednotné. Expresé genu pro 11 β -HSD 1 v hepatocytech C inkubovaných se sledovanými cytostatiky byla v porovnání s expresí stejného genu v kontrole ve všech případech nižší. Výrazněji zvýšenou expresi genu pro 11 β -HSD 1 vykazovaly hepatocyty B ovlivněné oracinem o koncentraci 0,2 μ M (151%) a 1,0 μ M (154%).

6 DISKUSE

Cílem této diplomové práce je zjistit vliv antracyklinových antibiotik doxorubicinu a daunorubicinu a nového potenciálního cytostatika oracinu na mikrosomální reduktasu karbonylové skupiny 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu typu 1 (11 β -HSD 1). Téma práce vychází z již známých poznatků o biotransformaci antracyklinů a oracinu. Významnou cestou biotransformace jak antracyklinů, tak oracinu je redukce karbonylové skupiny v jejich molekule na hydroxyskupinu. Byla prokázána zásadní role 11 β -HSD 1 v detoxikaci oracinu, kdy je oracin konvertován na chirální metabolit 11-dihydrooracin redukcí karbonylové skupiny v poloze C11 [82-84]. Vzhledem k chemické struktuře antracyklinů (přítomnost karbonylu v postranním řetězci molekuly) se v jejich biotransformaci na mikrosomální úrovni předpokládá účast 11 β -HSD 1 [39,40,137]. Indukce cytosolických i mikrosomálních reduktas karbonylu již byla předmětem zájmu řady studií. Ukázalo se, že nejen cytosolické (CR, ALR 2, DD2), ale i mikrosomální reduktasy jsou indukovatelné daunorubicinem [42,52]. Výsledky studia indukčního vlivu daunorubicinu, doxorubicinu a oracinu na 11 β -HSD 1 by mohly být přínosem pro doplnění poznatků o redukčním metabolismu těchto látek.

Pro posouzení ovlivnění genové exprese 11 β -HSD 1 a její aktivity bylo zvoleno několik metod blíže popsanych v experimentální části (kapitola 4). Vliv cytostatik na 11 β -HSD 1 byl zjišťován ve třech na sobě nezávislých experimentech (A, B, C), které byly vyhodnoceny zvlášť. Pokusy byly realizovány *in vitro* za využití primární kultury hepatocytů izolovaných z jater zdravých samců laboratorního potkana. Hepatocyty byly inkubovány 40 hodin (37°C, atmosféra s 5% CO₂) s živným médiem obsahujícím daunorubicin (DAU), doxorubicin (DOX) či oracin (OR) o koncentracích 0,2 a 1,0 μ M. Některé hepatocyty byly inkubovány pouze s čistým médiem. Ty nebyly cytostatiky ovlivněny a sloužily jako kontrola, se kterou se porovnávaly jednotlivé výsledky.

Dílním cílem bylo zjistit, zda vlivem přítomnosti cytostatika v živném médiu hepatocytů vzrostla aktivita 11 β -HSD 1. Pro tento účel byly z hepatocytů připraveny mikrosomální frakce. V každé získané mikrosomální frakci (A, B, C ovlivněné i neovlivněné) byla stanovena koncentrace bílkovin, jejíž hodnoty bylo využito pro vyjádření specifické aktivity sledovaného enzymu. Aktivita mikrosomální reduktasy karbonylové skupiny 11 β -HSD 1 byla zjišťována jednak spektrofotometricky s využitím pravděpodobného substrátu metyraponu a jednak byla provedena HPLC analýza po inkubaci mikrosomů s oracinem.

Při použití spektrofotometrické metody pro zjištění aktivity 11 β -HSD 1 nebyla ani v kontrolních ani v cytostatiky ovlivněných mikrosomech detekována žádná redukce metyraponu. Spektrofotometricky se podařilo stanovit v jednotlivých mikrosomech jen aktivitu 3 α -HSD pro 4-pyridinkarboxaldehyd, která byla zjišťována za účelem ověření použitelnosti spektrofotometrické metody pro stanovení aktivit mikrosomálních reduktas. V našem případě se tedy spektrofotometrie osvědčila jen pro určení aktivity 3 α -HSD, zatímco pro stanovení aktivity 11 β -HSD 1 se ukázala být nedostatečně citlivou. Účast 3 α -HSD na redukci karbonylové skupiny antracyklinů a oracinu není prokázána, tudíž není možno z naměřených aktivit 3 α -HSD usuzovat na daunorubicinem, doxorubicinem či oracinem navozenou indukci jejich biotransformačních enzymů.

Nejvyšší aktivity 3 α -HSD byly při pH 6,0 naměřeny u mikrosomů A. Aktivity signifikantně vyšší oproti kontrole byly nalezeny jen v mikrosomech A ovlivněných doxorubicinem a daunorubicinem o koncentraci 0,2 μ M a v mikrosomech C inkubovaných v přítomnosti oracinu o koncentraci 1,0 μ M. Přestože byly mikrosomální frakce připravovány stále stejným způsobem, koncentrace bílkovin (a tudíž i enzymů) byla u jednotlivých vzorků odlišná, a to i v rámci stejné řady (A, B, C). Pro přesnější porovnání byly jednotlivé aktivity enzymu vztaženy na 1mg bílkovin. Takto byly získány údaje o specifické aktivitě enzymu v mikrosomech. Nejvyšší specifické aktivity 3 α -HSD vykazovaly mikrosomální frakce A. Významně zvýšená specifická aktivita 3 α -HSD oproti kontrole byla zaznamenána v mikrosomech A ovlivněných doxorubicinem a daunorubicinem o koncentraci 0,2 μ M, v mikrosomech B ovlivněných doxorubicinem 1,0 μ M, daunorubicinem 0,2 μ M a oracinem 0,2 i 1,0 μ M. V mikrosomech C nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ve specifické aktivitě 3 α -HSD v ovlivněných mikrosomech oproti kontrole.

Protože se nepodařilo zjistit redukční aktivitu 11 β -HSD 1 vůči metyraponu spektrofotometrickou metodou, byly mikrosomální frakce inkubovány s oracinem, který je významným substrátem pro 11 β -HSD 1. Množství oracinu, které bylo během reakce zredukováno na 11-dihydrooracin, bylo detekováno chromatograficky za využití HPLC. Tato metoda je vysoce citlivá a poskytla nám informace o aktivitě 11 β -HSD 1 v jednotlivých mikrosomálních frakcích. Nejvyšší aktivity byly nalezeny v mikrosomech C, výjimku tvořila mikrosomální frakce ovlivněná doxorubicinem o koncentraci 1,0 μ M, kde byla aktivita 11 β -HSD 1 výrazně nižší v porovnání s kontrolou. Statisticky významné zvýšení aktivity sledovaného enzymu oproti kontrole

bylo prokázáno u mikrosomů A inkubovaných v přítomnosti daunorubicinu a doxorubicinu o koncentraci 0,2 i 1,0 μ M a u mikrosomů C ovlivněných doxorubicinem a oracinem o koncentraci 0,2 μ M. V mikrosomech B ovlivněných cytostatiky se hodnoty aktivit 11 β -HSD 1 podobaly aktivitě zjištěné v mikrosomech neovlivněných.

Vztažením aktivity enzymu v jednotlivých mikrosomálních frakcích na koncentraci bílkoviny byly získány specifické aktivity. Nejvyšší specifické aktivity 11 β -HSD 1 vykazovaly mikrosomy řady C s výjimkou mikrosomů ovlivněných doxorubicinem o koncentraci 1,0 μ M. Naopak nejnižší specifické aktivity byly naměřeny v mikrosomech A. V rámci stejné řady připravených mikrosomů (A, B, C) byly srovnávány specifické aktivity 11 β -HSD 1 detekované v jednotlivých ovlivněných mikrosomech se specifickou aktivitou enzymu v kontrolních mikrosomech. Signifikantně vyšší hodnoty specifické aktivity 11 β -HSD 1 byly zjištěny u mikrosomů A ovlivněných doxorubicinem o koncentraci 0,2 μ M, daunorubicinem o koncentraci 0,2 i 1,0 μ M a u mikrosomů C ovlivněných doxorubicinem a oracinem o koncentraci 0,2 μ M. Specifické aktivity 11 β -HSD 1 v ostatních mikrosomech byly jen nevýznamně vyšší nebo dokonce nižší než v kontrolních mikrosomech. Porovnáním působení doxorubicinu, daunorubicinu a oracinu o koncentraci 0,2 a 1,0 μ M na specifickou aktivitu 11 β -HSD 1 v mikrosomech A, B a C bylo zjištěno, že se jejich vliv často různil v každém z pokusů. Např. v mikrosomech A daunorubicin v koncentraci 0,2 μ M specifickou aktivitu zvýšil, v mikrosomech B a C ji naopak snížil (i když jen nepatrně).

K posouzení vlivu antracyklinů a oracinu na genovou expresi 11 β -HSD 1 v potkaních hepatocytech byla na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně provedena kvantitativní PCR v reálném čase. Tato metoda je velice přesná a citlivá, proto je v dnešní době široce využívána. Vlastnímu provedení PCR předcházela izolace kompletní RNA z cytostatiky ovlivněných i kontrolních hepatocytů a reverzní transkripce, při níž byla sledovaná m-RNA přepsána do c-DNA, která poté sloužila jako templát v průběhu QRT-PCR. Výsledky PCR analýzy nebyly v době vzniku této diplomové práce kompletní, RNA izolovaná z hepatocytů A a B ovlivněných daunorubicinem a doxorubicinem o koncentraci 0,2 a 1,0 μ M byla předána ke kvantifikaci, avšak její výsledky nám zatím nebyly k dispozici. Dostupné výsledky byly nejednotné a nejednoznačné. V hepatocytech A ovlivněných oracinem o koncentraci 0,2 μ M byla exprese genu pro 11 β -HSD 1 jen nevýznamně zvýšena, působení oracinu o koncentraci 1 μ M na hepatocyty A způsobilo dokonce pokles genové exprese oproti

kontrola. Také v hepatocytech C ovlivněných sledovanými cytostatiky byla exprese genu pro 11 β -HSD 1 nižší než u hepatocytů cytostatiky neovlivněných. Odlišné výsledky byly získány u hepatocytů B, které po ovlivnění oracinem vykazovaly výraznější vzestup exprese sledovaného genu (151% při koncentraci 0,2 μ M a 154% při koncentraci 1,0 μ M). Aby bylo možno hovořit o signifikantní indukci, musela by být exprese sledovaného genu v ovlivněných hepatocytech alespoň dvojnásobná oproti kontrole a musela by být potvrzena i v opakovaně provedených pokusech. Námi provedenými experimenty nebyla indukce 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 1 na genové úrovni potvrzena u žádného ze zkoumaných cytostatik.

Je třeba zmínit, že u hepatocytů C ovlivněných doxorubicinem o koncentraci 1,0 μ M došlo s největší pravděpodobností v průběhu jejich přípravy k chybě. Tato domněnka vznikla na základě již výše zmíněné skutečnosti, že specifická aktivita 11 β -HSD 1 stanovená v mikrosomech získaných z těchto hepatocytů byla výrazně nižší než v ostatních mikrosomech C, a podporuje ji fakt, že i hodnota C_T zjištěná při QRT-PCR z těchto hepatocytů izolované RNA byla naprosto odlišná od C_T hodnot RNA izolovaných z ostatních hepatocytů C.

Vzhledem ke značně nejednotným a nejednoznačným výsledkům jak stanovení aktivity 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy typu 1, tak i kvantifikace exprese genu pro tento enzym, se nepodařilo v této diplomové práci prokázat některými studii vyslovenou hypotézu, že daunorubicin, doxorubicin a oracin mají indukční vliv na mikrosomální reduktasu karbonylu 11 β -HSD 1. Z tohoto výsledku však nelze vyvozovat konečné závěry. Je nutné podotknout, že použité metody (zj. PCR) jsou vysoce náročné na přesnost a rychlost, a tudíž i sebemenší nepřesnost v provedení práce se projeví ve výsledcích experimentu. Pro úspěšné zvládnutí některých použitých postupů a metod je často zapotřebí i určité zkušenosti a praxe.

7 ZÁVĚR

Na základě provedených experimentů a vyhodnocení jejich výsledků jsme dospěli k následujícím závěrům:

- V mikrosomálních frakcích potkaních hepatocytů ovlivněných daunorubicinem, doxorubicinem a oracinem o koncentraci 0,2 a 1,0 μ M bylo v některých případech zaznamenáno statisticky významné zvýšení specifické aktivity 11 β -HSD typu 1 oproti mikrosomům cytostatiky neovlivněných. Zvýšení aktivity 11 β -HSD 1 v důsledku působení jednotlivých cytostatik však nebylo ve třech samostatně provedených pokusech jednotné, nelze tedy vyvozovat jednoznačné závěry o indukčních schopnostech sledovaných cytostatik.
- Po izolaci celkové RNA z hepatocytů ovlivněných sledovanými cytostatiky a z hepatocytů neovlivněných byla kvantifikována m-RNA pro 11 β -HSD 1. Výsledky nepotvrdily předpoklad o indukci této mikrosomální reductasy karbonylové skupiny vlivem působení daunorubicinu, doxorubicinu ani oracinu.

V této diplomové práci nebyl prokázán jednoznačný a výrazný vliv daunorubicinu, doxorubicinu a oracinu na aktivitu a expresi 11 β -HSD 1 potkaních hepatocytů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
AKR	aldo-ketoreduktasy (Aldo-Keto Reductase superfamily)
ALR	aldehydreduktasa
ANT	antracyklin(y)
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CR	karbonylreduktasa
CSF	faktor stimulující kolonie (Colony-Stimulating Factor)
CYP450	cytochrom P450
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DAU	daunorubicin
dCTP	deoxycitidintrifosfát
DD	dihydrodioldehydrogenasa
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DHO	11-dihydrooracin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
dTTP	deoxythymidintrifosfát
E-20-M	ekdyson-20-monooxygenasa
EGTA	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)
G-CSF	faktor stimulující granulocytové kolonie
GIT	gastrointestinální
Gly	glycin
GM-CSF	faktor stimulující granulocytové-makrofágové kolonie
GR	glukokortikoidní receptory
GSH	glutathion
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
IL	interleukin

K	kontrola
konc.	koncentrace
LRP	Lung Resistance related Protein
Lys	lysin
MDR	mnohočetná léková rezistence (MultiDrug Resistance)
MIK	mikrosomy
MR	mineralokortikoidní receptory
m-RNA	mediátorová RNA (Messenger RNA)
MRP	protein sdružený s MDR (Multidrug Resistance-associated Protein)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma)
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaná forma)
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
OR	oracin
PBGD	porfobilinogendeaminasa
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
P-gp	P-glykoprotein
QRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase (Quantitative Real-Time PCR)
RNA	ribonukleová kyselina
RNasy	ribonukleasy
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (Short-chain Dehydrogenase/Reductase superfamily)
Ser	serin
SOD	superoxiddismutasa
TEA	triethylamin
Tyr	tyrosin
UDP	uridindifosfát

POUŽITÁ LITERATURA

1. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: Harperova biochemie, 3. české vydání, str. 66-9, H&H, Jinočany, 2001
2. Lincová D., Farghali H. a spol.: Základní a aplikovaná farmakologie, str. 497-517, Karolinum-Galén, Praha, 2002
3. Suchopár J., Šimek R., Valentová Š., Buršík J. a spol.: Remedia Compendium, str. 345-67, Panax, Praha, 1996
4. Hays J.D., Wolf C.R.: Molecular mechanism of drug resistance, Biochem J 22, str. 281, 1990
5. Hrdina R., Geršl V., Klimtová I., Šimůnek T., Macháčková J., Adamcová M.: Anthracycline-induced cardiotoxicity, Acta Medica 43(3), str. 75-82, 2000
6. Hartl J., Palát K.: Farmaceutická chemie IV., str.174-6, Univerzita Karlova, Praha, 1992
7. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2002, monografie Daunorubicini hydrochloridum a Doxorubicini hydrochloridum, Grada, Praha, 2003
8. AISLP: SPC přípravku Adriblastina, Pfizer s.r.o., Praha, ČR, 2004
9. AISLP: Compendium InfoPharm (CompIP verze 2.4), Infopharm a.s., Praha, ČR, 2003
10. Olson R.D., Mushlin P.S.: Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses, FASEB J 13, str. 199-212, 1990
11. Dorr R.T.: Cytoprotective agens for anthracyclines, Semin Oncol 23 (Suppl 8), str. 23-34, 1996
12. Herman E.H., Ferrans V.J., Myers C.E., van Vleet J.F.: Comparison of the effectiveness of (\pm)-1,2-bis(2,5-deoxopiperanizyl-1-yl)-propane (ICRF-187) and *N*-acetylcysteine in preventing chronic doxorubicin cardiotoxicity in beagles, Cancer Res 45, str. 276-81, 1985
13. Legha S.S., Wang Y.M., Mackay B., Ewer M., Hortobagy G.N., Benjamin S.R., Ali M.K.: Clinical and pharmacologic investigation of the effects of α -tocopherol on adriamycin cardiotoxicity, Ann NY Acad Sci 393, str. 411-8, 1982
14. Myers C., Bonow R., Palmieri S., Jenkins J., Corden B., Locker G., Doroshov J., Epstein S.A., A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by *N*-acetylcysteine, Semin Oncol 10, str. 53-5, 1983
15. Olson R.D., Mushlin P.S., Brenner D.E., Fleischer S., Chang B.K., Cusack B.J., Boucek Jr R.J.: Doxorubicin cardiotoxicity may be due to its metabolite doxorubicinol, Proc Natl Acad Sci USA 85, str. 3585-9, 1988
16. Forrest G.L., 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, str. 5158-64, 2000
17. Cusack B.C., Mushlin P.S., Voulelis L.D., Li X., Boucek R.J., Olson R.D.: Daunorubicin-induced cardiac injury in the rabbit: a role of daunorubicinol, Toxicol Appl Pharmacol 118, str. 177-185, 1993

18. Klugmann F.B., Decorti G., Candussio L. et al.: Amelioration of 4'-epidoxorubicin-induced cardiotoxicity by sodium cromoglycate, *Eur J Cancer Clin Oncol* 25, str. 361-8, 1989
19. Klugmann F.B., Decorti G., Candussio L., Grill V., Mallardi F., Baldini L.: Inhibitors of adriamycin-induced histamine release *in vitro* limit adriamycin cardiotoxicity *in vivo*, *Br J Cancer* 54, str. 743-8, 1986
20. Halali-Rutman I., Herschko C., Link G., Rutman A.J., Shainberg A.: Inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum: A putative mechanism for the cardiotoxicity of adriamycin, *Biochem Pharmacol* 54, str. 211-4, 1997
21. Miwa N., Kanaide H., Meno H., Nakamura M.: Adriamycin and altered membrane functions in rat hearts, *Br J Exp Path* 67, str. 747-55, 1986
22. Hoyano Y., Furukawa Y., Oguchi T., Kasama M., Imamura H., Chiba S.: Acute presynaptic inhibition by doxorubicin of negative chrono- and inotropic responses to parasympathetic nerve stimulation in isolated, blood-perfused dog atrium, *J Cardiovasc Pharmacol* 27, str. 37-41, 1996
23. Geršl V., Bajgar J., Krs O., Hrdina R., Palička V., Mazurová Y.: Changes in cholinesterase activities after daunorubicin administration to rabbits, *Human & Experimental Toxicology* 15, 834-8, 1996
24. Nagami K., Yoshikawa T., Suzuki M., Wainai Y., Anzai T., Handa S.: Abnormal beta-adrenergic transmembrane signaling in rabbits with adriamycin-induced cardiomyopathy, *Jpn Circ J* 61, 249-55, 1997
25. Olson L.E., Bedja D., Alvey S.J., Cardounel A.J., Gabrielson K.L., Reeves R.H.: Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1, *Cancer Research* 63, str. 6602-6, 2003
26. Behnia K., Boroujerdi M.: Inhibition of aldo-keto reductases by phenobarbital alters metabolism pharmacokinetics and toxicity of doxorubicin in rats, *J Pharm Pharmacol* 51, str. 1275-82, 1999
27. Felsted R.L., Gee M., Bachur N.R.: Rat liver daunorubicin reductase, an aldo-keto reductase, *J Biol Chem* 249, str. 3672-9, 1974
28. Takanashi S., Bachur N.R.: Daunorubicin metabolites in human urine, *J Pharmacol Exp Ther* 195, str. 41-9, 1975
29. Huffman D.H., Benjamin R.S., Bachur N.R.: Daunorubicin metabolism in acute nonlymphocytic leukemia, *Clin Pharmacol Ther* 13, str. 895-905, 1972
30. Benjamin R.S., Rigs C.E., Bachur N.R.: Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man, *Clin Pharmacol Ther* 14, 592-600, 1973
31. Bachur N.R.: Daunorubicinol, a major metabolite of daunorubicin, *J Pharmacol Exp Ther* 177, str. 573-8, 1971
32. Gewirtz D.A., Yanovich S.: Metabolism of adriamycin in hepatocytes isolated from the rat and the rabbit, *Biochem Pharmacol* 36, str. 1793-8, 1987
33. Kvasničková E.: *Xenobiochemie*, str. 42-8, Univerzita Karlova, Praha, 1995

34. 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, str. 989-98, 2003
35. Jez J.M., Penning T.M.: The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update, *Chem Biol Interact* 130-132, str. 499-525, 2001
36. Oppermann U.C., Filling C., Jornvall H.: Forms and functions of human SDR enzymes, *Chem Biol Interact* 130-132, str. 699-705, 2001
37. Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A.: Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochem Pharmacol* 50, str. 221-7, 1995
38. Hyndman D.J., Takenoshita R., Vera N.L., Pang S.C., Flynn T.G.: Cloning, sequencing and enzymatic activity of an inducible aldo-keto reductase from Chinese hamster ovary cells, *J Biol Chem* 272, str. 13286-91, 1997
39. Maser E.: Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction – the pluripotency of several hydroxysteroid dehydrogenases, *Biochem Pharmacol* 49, str. 421-40, 1995
40. Maser E., Bannenberg G.: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase mediates reductive metabolism of xenobiotic carbonyl compounds, *Biochem Pharmacol* 47, str. 1805-12, 1994
41. Pröpper D., Maser E.: Carbonyl reduction of daunorubicin in rabbit liver and heart, *Pharmacol & Toxicol* 80, str. 240-5, 1997
42. Ax W., Soldan M., Koch L., Maser E.: Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction, *Biochem Pharmacol* 59, str. 293-300, 2000
43. Okey A.B.: Enzyme induction in the cytochrome P-450 system, *Pharmacol Ther* 45, str. 241-98, 1990
44. Gibson G.G., Skett P.: Introduction to drug metabolism, Nelson Thornes Publishers, Cheltenham, United Kingdom, 2001
45. Boobis A.R., Sesardic D., Murray B.P., Edwards R.J., Singleton A.M., Rich K.J., Murray S., De La Torres R., Segura J., Pelkonen O., Pasanen M., Kobayashi S., Zhi-Guang T., Davies D.S.: Species variation in the response of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors, *Xenobiotica* 20, str. 1139-61, 1990
46. Rice J.M., Diwan B.A., Ward J.M., Nims R.W., Lubet R.A.: Phenobarbital and related compounds: approaches to interspecies extrapolation, *Prog Clin Biol Res* 374, str. 231-49, 1992
47. Lu C., Li A.P.: Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog, *Chem Biol Interact* 134, str. 271-81, 2001
48. Rodrigues A.D.: Drug-drug interactions, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA, 2002

49. Schott B., Robert J.: Comparative activity of anthracycline 13-hydroxymetabolites against rat glioblastoma cells in culture, *Biochem Pharmacol* 38, str. 4069-74, 1989
50. Ozols R.F., Willson J.K.V., Weltz M.D., Grotzinger K.R., Myers C.E., Young R.C.: Inhibition of human ovarian cancer colony formation by adriamycin and its major metabolites, *Cancer Res* 40, str. 4109-17, 1980
51. Dessypris E.N., Brenner D.E., Hande K.R.: Toxicity of doxorubicin metabolites to human marrow erythroid and myeloid progenitors *in vitro*, *Cancer Treat Rep* 70, str. 487-90, 1986
52. 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, str. 117-23, 1996
53. Gibson G.G., Skett P.: Introduction to drug metabolism, Nelson Thornes Publishers, Gheltenham, 2001
54. Smolen A., Anderson A.D.: Partial purification and characterization of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductase from rat heart, *Biochem Pharmacol* 51, str. 317-23, 1996
55. Inazu N., Hayashi M., Hiura M., Satoh T.: Effect of psychotropic drugs on aldo-keto reductase activity in rat ovary and adrenal gland, *Biochem Pharmacol* 52, str. 1581-91, 1996
56. Mylari B.L., Beyer T.A., Siegel T.W.: A highly specific aldose reductase inhibitor, ethyl 1-benzyl-3-hydroxy-2(5H)-oxopyrrol-4-karboxylát, and its congeners, *J Med Chem* 34, str. 1011-8, 1991
57. Endicott J.A., Ling V.: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, *Annu Rev Biochem* 58, str. 137-71, 1989
58. Zaman G.J.R., Flens M.J., van Leusden M.R., de Haas M., Mulder H.S., Lankelma J., Pinedo H.M., Scheper R.J., Baas F., Broxterman H.J., Borst P.: The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, str. 8822-6, 1994
59. Scheffer G.L., Wijngaard P.L.J., Flens M.J., Izquierdo M.A., Slovak M.L., Pinedo H.M., Meijer C.J.L.M., Clevers H.C., Scheper R.J.: The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein, *Nature Med* 1, str. 578-82, 1995
60. Muller C., Bailly J.D., Goubin F., Laredo J., Jaffrezou J.P., Bordier C., Laurent G.: Verapamil decreases P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemic cell lines, *Int J Cancer* 56, str. 749-54, 1994
61. Shapiro A.B., Ling V.: Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein, *Biochem Pharmacol* 53, str. 587-96, 1997
62. Deffie A.M., Alam T., Seneviratne C., Beenken S.W., Batra J.L., Shea T.C., Henner W.D., Goldenberg G.J.: Multifactorial resistance to adriamycin: Relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux and P-glycoprotein in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia, *Cancer Res* 48, str. 3595-602, 1988
63. Kramer R.A., Zakher J., Kim G.: Role of glutathione redox cycle in acquired and *de novo* multidrug resistance, *Science* 241, str. 694-7, 1988

64. Gessner T., Vaughan L.A., Beehler B.C., Bartels C.J., Baker R.M.: Elevated pentose cycle and glukuronyltransferase in daunorubicin-resistant P388 cells, *Cancer Res* 50, str. 3921-7, 1990
65. Batist G., Tulpule A., Sinha B.K., Katki A.G., Myers G.E., Cowan K.H.: Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells, *J Biol Chem* 261, str. 15544-9, 1986
66. Capranico G., Riva A., Tinelli S., Dasdia T., Zunino F.: Markedly reduced levels of anthracycline-induced DNA strand breaks in resistant P388 leukemia cells and isolated nuclei, *Cancer Res* 47, str. 3752-6, 1987
67. Volm M., Mattern J., Effert T., Pommerenke E.W.: Expression of several resistance mechanism in untreated human kidney and lung carcinomas, *Anticancer Res* 12, str. 1063-7, 1992
68. Rekha G.K., Sreerama L., Sladek N.E.: Intrinsic cellular resistance to oxazaphosphorines exhibited by a human colon carcinoma cell line expressing relatively large amounts of a class-3 aldehyde dehydrogenase, *Biochem Pharmacol* 48, str. 1943-52, 1994
69. Inoue S., Sharma R.C., Schimke R.T., Simoni R.D.: Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase, *J Biol Chem* 268, str. 5894-8, 1993
70. Michalský J.: International Patent Application, PCT/CS92/00026, 1992
71. Melka M.: Oracin. Preclinical Summary Report of RIPB (Researche Inst. for Pharmacy and Biochemistry), Prague, 1993
72. Miko M., Poturnajová M., Soucek R.: Cytotoxicity and mode of action of the potential cytostatic drug oracin, *Neoplasma* 49, str. 167-71, 2002
73. 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, str. 127-30, 1997
74. 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, str. 645-51, 1996
75. Marhan J.: Mutagenicity of cytostatic drugs in a bacterial system. I. Ames test, *Folia Microbiol* 40, str. 457-61, 1995
76. 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, str. 169-75, 1996
77. 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), str. 377-80, 1996
78. 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, str. 197-201, 1998

79. 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 and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin, *Enantiomer* 5, str. 263-70, 2000
80. Wsól V., Skálová L., Szotáková B., Kvasničková E.: Sex-related differences in stereospecificity of oracin reductases in rat *in vitro* and *in vivo*, *Chirality* 11, str. 505-9, 1999
81. Davankov V.: The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction?, *Chirality* 9, str. 99-102, 1997
82. 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, str. 495-500, 2000
83. 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, str. 459-68, 2003
84. 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, str. 253-61, 2004
85. Szotáková B., Wsól V., Skálová L., Kvasničková E.: Role of cytochrome P4501A in biotransformation of the potential anticancer drug oracin, *Exp Toxicol Pathol* 51 (4-5), str. 428-31, 1999
86. Ellis E.M., Hayes J.D.: Substrate specificity of an aflatoxin-metabolizing aldehyde reductase, *Biochem J* 312, str. 535-41, 1995
87. Jez J.M., Bennett M.J., Schlegel B.P., Lewis M., Penning T.M.: Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem J* 326, str. 625-36, 1997
88. Jez J.M., Flynn T.G., Penning T.M.: A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem Pharmacol* 54, str. 639-47, 1997
89. Kopečná V.: Stanovení aktivit redukčních enzymů v subcelulárních frakcích jater hospodářských zvířat, Rigorózní práce, FaF HK 2002
90. Felsted R.L., Bachur N.R.: Mammalian carbonyl reductases, *Drug Metab Rev* 11, str. 1-60, 1980
91. Testa B.: The nature and functioning of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases. In: *The metabolism of drugs and other xenobiotics. Biochemistry of redox reactions*, edited by Testa B. and Caldwell J., str. 41-61, 70-121, 398-9, Academic Press, London, 1995
92. Maser E., Oppermann U.C.: Role of type-1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes, *Eur J Biochem* 249, str. 365-9, 1997
93. Tannin G.M., Agarwal A.K., Monder C., New M.L., White P.C.: The human gene for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Structure, tissue distribution and chromosomal localization, *J Biol Chem* 266, str. 16653-8, 1991
94. Seckl J.R.: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action?, *Front Neuroendocrinol* 18, str. 49-99, 1997

95. Albiston A.L., Obeyesekere V.R., Smith R.E., Krozowski Z.S.: Cloning and tissue distribution of the human 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme, *Mol Cell Endocrinol* 105, str. R11-R17, 1994
96. Maser E.: The purification and properties of a novel carbonyl reducing enzyme from mouse liver microsomes, *Adv Exp Med Biol* 328, str. 339-50, 1993
97. Agarwal A.K., Rogerson F.M., Mune T., White P.C.: *Genomics* 29, str. 195-9, 1995
98. Ghosh D., Wawrzak Z., Weeks C.M., Duax W.L., Erman M.: The refined three-dimensional structure of $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases, *Structure* 2, str. 629-40, 1994
99. Monder C.: The forms and functions of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase, *J Steroid Biochem Molec Biol* 45, str. 161-5, 1993
100. Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D.: Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry* 34, str. 6003-13, 1995
101. Tsigelny I., Baker M.E.: Structures stabilizing the dimer interface on human 11β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and human 15 -hydroxyprostaglandin dehydrogenase and their homologs, *Biochem Biophys Res Commun* 217, str. 859-68, 1995
102. Maser E., Friebertshäuser J., Völker B.: Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen, *Chem-Biol Interact* 143-144, str. 435-48, 2003
103. Ozols J.: Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11β -hydroxysteroid dehydrogenase, *J Biol Chem* 270, 2305-12, 1995
104. Naray-Fejes-Toth A., Fejes-Toth G.: Subcellular localization of the type 2 11β -hydroxysteroid Dehydrogenase, *J Biol Chem* 271, str. 15436-42, 1996
105. Edwards C.R., Steward P.M., Burt D., Brett L., McIntyre M.A., Sutanto W.S., de Kloet E.R., Monder C.: Localization of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase - tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor, *Lancet* 2, str. 986-9, 1988
106. Funder J.W., Pearce P.T., Smith R., Smith A.I.: Mineralocorticoid action: target specificity is enzyme, not receptor mediated, *Science* 242, str. 583-5, 1988
107. Brown R.W., Chapman K.E., Edwards C.R., Seckl J.R.: Human placental 11β -hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform, *Endocrinology* 132, str. 2614-21, 1993
108. Seckl J.R., Chapman K.E.: Medical and physiological aspects of the 11β -hydroxysteroid dehydrogenase system, *Eur J Biochem* 249, str. 361-4, 1997
109. Evans R.M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* 240, str. 889-95, 1988
110. Stewart P.M., Corrie J.E.T., Shackleton C.H.L., Edwards C.R.W.: Syndrome of apparent mineralocorticoid excess: a defect in the cortisol-cortisone shuttle, *J Clin Invest* 82, str. 340-9, 1988

111. Steward P.M., Valentino R., Wallace A.M., Burt D., Shackleton C.H.L., Edwards C.R.W.: Mineralocorticoid activity of liquorice: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age, *Lancet* 11, str. 821-4, 1987
112. Murphy B.E.P., Clark S.J., Donald I.R., Pinsky M., Vedady D.L.: Conversion of maternal cortisol to cortison during placental transfer to the human fetus, *Am J Obstet Gynecol* 118, str. 538-41, 1974
113. Walker B.R., Connacher A.A., Lindsay R.M., Webb D.J., Edwards C.R.W.: Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation, *J Clin Endocrinol Metab* 80, str. 3155-9, 1995
114. Belai I., Darvas B., Bauer K., Tag El-Din M.H.: Effects of anti-ecdysteroid azole analogues of metyrapone on the larval development of the fleshfly, *Neobellieria bullata*, *Pestic Sci* 44, str. 225-32, 1995
115. Rekká E.A., Soldan M., Belai I., Netter K.J., Maser E.: Biotransformation and detoxification of insecticidal metyrapone analogues by carbonyl reduction in the human liver, *Xenobiotika* 26, str. 1221-9, 1996
116. Hecht S.S.: Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines – a model for cancer prevention strategies, *Drug Metab Rev* 26, str. 373-90, 1994
117. Hecht S.S., Young R., Chen C.B.: Metabolism in the F344 rat of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific carcinogen, *Cancer Res* 40, str. 4144-50, 1980
118. Maser E., Richter E., Friebertshäuser J.: The identification of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as carbonyl reductase of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Eur J Biochem* 238, str. 484-9, 1996
119. Monks T.J., Hanzlik R.P., Cohen G.M., Ross D., Graham D.G.: Contemporary issues in toxicology: quinone chemistry and toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* 112, str. 2-16, 1992
120. Lind C., Cadenas E., Hochstein P., Ernster L.: DT-diaphorase: purification, properties and function, *Methods Enzymol* 186, str. 287-301, 1990
121. Wermuth B., Platt K.L., Seidel A., Oesch F.: Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxification in man, *Biochem Pharmacol* 35, str. 1277-82, 1986
122. Maser E.: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase acts as carbonyl reductase in microsomal phase I drug metabolism, *Exp Toxic Pathol* 48, str. 266-73, 1996
123. Švecová L.: Zavedení metody QRT-PCR pro studium indukce 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy, Diplomová práce, FaF HK 2005
124. Isom H.C., Georgoff I.: Quantitative assay for albumine - producing liver cell after simian virus transformation of rat hepatocytes maintained in chemically defined medium, *Proc Natl Acad Sci USA* 8, str. 6378-82, 1984
125. 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, str. 76-85, 1985

-
126. Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I.J., Kador P.F., Lee Y.S., Tsai J.Y., Fujisawa S., Lizak M.J., Sinz A., Sato S.: Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats, *Biochem Pharmacol* 58, str. 517-24, 1999
 127. Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A.: Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonylreductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochem Pharmacol* 50, str. 221-7, 1995
 128. Penning T.M., Mukharji I., Barrows S., Talalay P.: Purification and properties of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase of rat liver cytosol and its inhibition by anti-inflammatory drugs, *Biochem J.* 222(3), str. 601-11, 1984
 129. Felsted R.L., Richter D.R., Jones D.M., Bachur N.R.: Isolation and characterization of rabbit liver xenobiotic carbonyl reductases, *Biochem Pharmacol* 29, str. 1503-16, 1980
 130. Nečas O. a spol.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, 3.české vydání, str. 155, H&H, Jinočany, 2000
 131. Qiagen: *RNeasy Mini Handbook*, 2001
 132. Červinka M.: *Úvod do genového inženýrství*, str. 20-23, Univerzita Karlova, Praha, 1988
 133. Korabečná M.: *Aplikace molekulární genetiky v klinické praxi*, str.9-11, Karolinum, Praha, 1999
 134. Qiagen: *QuantiTect Probe PCR Handbook*, 2003
 135. Livak K.J., Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods* 25, str. 402-8, 2001
 136. Mgr. Krčmář Pavel, PhD., *Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně: ústní sdělení*
 137. Walker E.A., Stewart P.M.: 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections, *TEM*, 14(7), str. 334-339, 2003