

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

CHARAKTERIZÁCIA ĽUDSKEJ WARFARIN REDUKTÁZY

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Petra Malátková, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Simona Sokolová

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

Ďakujem svojej školiteľke PharmDr. Petre Malátkovej, Ph.D. za vynikajúce vedenie, cenné rady a trpezlivosť pri vypracovávaní tejto práce. Ďalej ďakujem PharmDr. Adamovi Skarkovi, Ph.D. za UHPLC analýzu a celej Katedre biochemických vied za vytvorenie príjemného prostredia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Simona Sokolová

Školitel: PharmDr. Petra Malátková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Charakterizácia ľudskej warfarin reduktázy

Warfarin je v súčasnosti terapeuticky široko používané antikoagulačné liečivo. Vzhľadom na úzke terapeutické okno warfarinu je dôležité kompletne poznať jeho metabolizmus v ľudskom tele. Na metabolizme warfarinu sa podieľajú oxidačné, redukčné a konjugačné reakcie. Redukčný metabolizmus warfarinu zatiaľ nebol podrobne študovaný. Premenou postrannej karbonylovej skupiny warfarinu vzniká redukovaný metabolit warfarin-alkohol. Je známe, že ľudské cytosolické a mikrozomálne frakcie vykazujú redukčnú aktivitu voči warfarinu, ale konkrétne enzýmy katalyzujúce redukciu nie sú zatiaľ známe. Cieľom tejto práce bolo identifikovať enzým/enzýmy podieľajúce sa na redukcii warfarinu a stanoviť kinetiku redukčných premien. Ľudská cytosolická a mikrozomálna pečennová frakcia a rekombinantné enzýmy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3 boli inkubované s warfarinom o rôznych koncentráciách. UHPLC kvantifikáciou vzniknutého warfarin-alkoholu boli stanovené špecifické aktivity jednotlivých enzýmov a frakcií. Bola potvrdená aktivita cytosolickej a mikrozomálnej frakcie. Cytosolická frakcia vykazovala vyššiu aktivitu v produkcii warfarin-alkoholu než frakcia mikrozomálna. Z testovaných enzýmov boli identifikované AKR1C3 a CBR1 ako hlavné enzýmy zodpovedné za tvorbu warfarin-alkoholu. Ostatné enzýmy vykazovali len nízku alebo žiadnu aktivitu.

ABSTRACT

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

Candidate: Simona Sokolová

Supervisor: PharmDr. Petra Malátková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Characterization of human warfarin reductase

Warfarin is widely used anticoagulant drug. Considering the narrow therapeutic window of warfarin, it is important to fully understand its metabolism in human body. Oxidative, reductive and conjugation reactions are involved in warfarin metabolism. However, the reductive metabolism of warfarin has not been studied in details until now. The reduced metabolite of warfarin, i.e. warfarin-alcohol, is produced by the conversion of the carbonyl group of the side chain. It is known that human liver cytosolic and microsomal fractions exhibit warfarin reductase activity but the specific enzymes catalysing the reduction of warfarin are not known yet. The aim of this study was to identify the enzyme(s) participating in reduction of warfarin and to describe enzyme kinetics. Human liver cytosolic and microsomal fractions and recombinant enzymes AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 and CBR3 were incubated with warfarin at various concentrations. The produced warfarin-alcohol was quantified by UHPLC and the specific activities of enzymes and subcellular fractions were determined. The warfarin reductase activity was confirmed in cytosolic and microsomal fractions. The reduction of warfarin was higher in the liver cytosol than liver microsomes. From the enzymes tested, AKR1C3 and CBR1 were found as the main enzymes participated in the production of warfarin-alcohol. Other enzymes showed only low or no activity.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH.....	6
ÚVOD.....	8
TEORETICKÁ ČASŤ	9
1 METABOLIZMUS XENOBIOTÍK.....	9
2 CYTOSOLICKÉ KARBONYL-REDUKUJÚCE ENZÝMY	11
2.1 Aldo-ketoreduktázy.....	12
2.1.1 AKR1A1	15
2.1.2 AKR1B1	16
2.1.3 AKR1B10	17
2.1.4 AKR1C	17
2.1.5 AKR1D1	19
2.2 Karbonylreduktázy.....	20
2.2.1 CBR1	21
2.2.2 CBR3	22
2.2.3 CBR4	23
3 WARFARIN.....	24
3.1 Oxidačný metabolizmus warfarinu	26
3.2 Redukčný metabolizmus warfarinu.....	27
3.3 Konjugačné reakcie.....	29
4 CIEĽ PRÁCE	31
EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	32
5 MATERIÁL A METODIKA	32
5.1 Prístroje	32
5.2 Chemikálie	32
5.3 Biologické vzorky	33
5.4 Príprava roztoku liečiva	34

5.5	Inkubácia subcelulárnych frakcií a enzýmov s warfarinom.....	34
5.6	UHPLC stanovenie metabolitov	35
5.7	Test účinnosti extrakcie.....	36
5.8	Optimalizácia extrakcie I.	37
5.9	Optimalizácia extrakcie II.	38
5.10	Test účinnosti extrakcie warfarin-alkoholu v porovnaní s kumachlórom.....	39
5.11	Test väzby na proteíny	39
5.12	Screening enzýmov	40
5.13	Stanovenie kinetiky redukcie warfarinu.....	40
6	VÝSLEDKY.....	42
6.1	Test účinnosti extrakcie.....	42
6.2	Optimalizácia extrakcie I.	43
6.3	Optimalizácia extrakcie II.	44
6.4	Test väzby warfarin-alkoholu na proteíny	45
6.5	Účinnosti extrakcie warfarin-alkoholu v porovnaní s kumachlórom.....	46
6.6	Screening enzýmov	47
6.7	Screening enzýmov II.	49
6.8	Stanovenie kinetiky redukcie warfarinu.....	50
6.8.1	Subcelulárne frakcie	50
6.8.2	AKR1C3	54
6.8.3	CBR1	56
6.9	Redukčná aktivita subcelulárnych frakcií a enzýmov k warfarinu	58
7	DISKUSIA	60
8	ZÁVER.....	64
9	ZOZNAM SKRATIEK	65
10	LITERATÚRA	66

ÚVOD

Na metabolizme xenobiotík sa podieľajú mnohé enzýmy, a to predovšetkým oxidačné, redukčné a konjugačné. Kompletné poznanie metabolizmu liečiv v ľudskom tele je dôležité pre správne nastavenie terapie. Napriek tomu, že redukčným enzýmom je v porovnaní s enzýmami oxidačnými venovaná menšia pozornosť, v metabolizme zohrávajú tiež dôležitú úlohu.

Warfarin je liečivo s úzkym terapeutickým oknom, preto je dôležité čo najdôkladnejšie poznať jeho metabolizmus, ktorý ovplyvňuje množstvo aktívnej formy v organizme. Warfarin je z veľkej miery metabolizovaný oxidačnými enzýmami, avšak je známe, že i redukčné enzýmy sa podieľajú na jeho metabolizácii. Zatiaľ ale neboli určené konkrétne enzýmy redukujúce warfarin.

Na Katedre biochemických vied sa výskumná skupina AKR|SDR zaoberá skúmaním uplatnenia redukčných enzýmov, okrem iného, i v metabolizme xenobiotík. Táto práca sa zameriava na warfarin a redukčné enzýmy, uplatňujúce sa pri jeho metabolizme, so snahou identifikovať tieto enzýmy a stanoviť kinetiku redukčných premien.

TEORETICKÁ ČASŤ

1 METABOLIZMUS XENOBIOTÍK

Väčšina xenobiotík, medzi ktoré patria i liečivá, je z ľudského tela vylučovaná po biotransformácii, len niektoré môžu byť priamo vylúčené bez zmeny. Metabolická premena môže byť tiež potrebná na aktiváciu molekuly liečiva. Metabolizmus liečiv zahŕňa oxidačné, redukčné, hydrolytické a konjugačné reakcie, ktoré sú katalyzované širokým spektrom enzýmov (*Dostálek, 2006; WatCut [online]*).

Metabolizmus liečiv môžeme rozdeliť na dve fázy. I. fáza zahŕňa oxidačné, redukčné a hydrolytické reakcie, ktoré vedú k zvýšeniu polaritu molekuly xenobiotika, a to vznikom polárnych funkčných skupín (hydroxylovej, karbonylovej, karboxylovej alebo aminoskupiny). V I. fáze metabolizmu sa najčastejšie uplatňujú oxidačné procesy. Dominujú hydroxylačné reakcie katalytované nadrodinou cytochrómov P450 (CYP450), pričom je do molekuly substrátu zavedená nová hydroxylová skupina. CYP450 sú membránové proteíny lokalizované v endoplazmatickom retikule a v mitochondriách. Podieľajú sa na metabolizme xenobiotík i endogénnych látok. Okrem hydroxylácie patria medzi oxidačné reakcie i epoxidácie, N-oxidácie, S-oxidácie, deaminácie a desulfurácie. Na katalýze oxidačných reakcií sa podieľajú okrem enzýmov nadrodiny CYP450 i flavinové monooxygenázy, alkoholdehydrogenázy, aldehyddehydrogenázy, aldehydoxidázy, aminooxidázy, cyklooxygenázy, peroxidázy, xantinoxidázy, superoxiddismutázy a glutathionperoxidázy (*Ledvina et al., 2009*).

Redukčnému metabolizmu podliehajú molekuly obsahujúce karbonylovú, nitro- alebo azoskupinu, redukciu môžu tiež podliehať dvojité väzby. Redukciou vznikajú polárne hydroxylové skupiny alebo aminoskupiny. Mnohé enzýmy sú schopné v závislosti od podmienok katalyzovať oxidačné aj redukčné reakcie. Medzi hlavné redukčné enzýmy patria aldo-ketoreduktázy (AKR), oxidoreduktázy s krátkym reťazcom (SDR), ďalej xantinoxidázy, alkoholdehydrogenázy, cytochrómy P450, aldehydoxidázy a peroxidázy (*Utrecht & Trager, 2007*).

Hydrolytické reakcie zabezpečujú rozštiepenie esterovej, amidovej, éterovej alebo epoxidovej väzby, pričom vzniká voľná hydroxyskupina prípadne aminoskupina. Hydrolyzované môžu byť tiež konjugáty, vzniknuté v II. fáze metabolizmu. Na katalýze

hydrolytických reakcií sa podieľajú hlavne esterázy, amidázy a éterázy (*Utrecht & Trager, 2007; Dostálek, 2006*).

II. fáza biotransformácie je konjugačná, dochádza v nej k interakcii medziproduktu z I. fázy s endogénnym konjugačným činidlom. Reakciou tak vzniká látka spravidla polárnejšia, čo umožňuje jednoduchšie vylúčenie z organizmu. Najčastejšie dochádza k naviazaniu zvyšku kyseliny glukuronovovej, sírovej, octovej alebo glutatiónu, pričom každú reakciu katalyzujú zodpovedajúce enzýmy: UDP-glukuronyltransferázy, sulfotransferázy, N-acetyltransferázy, glutatión-S-transferázy (*Dostálek, 2006*).

Xenobiotikum nemusí podstúpiť obidve fázy metabolizmu. V prípade, že je látka dostatočne polárna, môže byť priamo vylúčená bez ďalšej biotransformácie, alebo môže rovno podstúpiť konjugáciu (*Ledvina et al., 2009*).

2 CYTOSOLICKÉ KARBONYL-REDUKUJÚCE ENZÝMY

Mnohé endogénne látky, ale i liečivá, zložky potravy a chemické polutanty obsahujú karbonylovú skupinu, alebo sa na karbonylové zlúčeniny premieňajú počas ich metabolizmu. Karbonylové skupiny (aldehydické a ketonické) majú vysokú vnútornú energiu, a preto sú vysoko reaktívne; často sú tiež nositeľom účinku molekuly (*Opperman, 2007*).

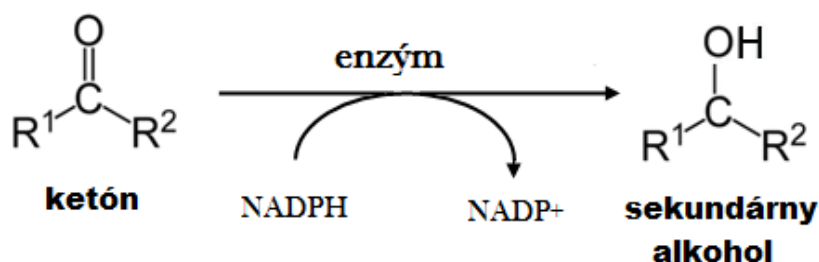
V porovnaní s oxidačnými enzýmami CYP450 je karbonyl-redukujúcim enzýmom venovaná menšia pozornosť. Avšak s rozvojom molekulárnej biológie bolo identifikovaných niekoľko karbonyl-redukujúcich enzýmov, katalyzujúcich premenu ako endogénnych látok, tak aj xenobiotík, a bolo dokázané, že karbonyl-redukujúce enzýmy plnia radu dôležitých funkcií (*Hoffmann & Maser, 2007*).

Väčšina ľudských karbonyl-redukujúcich enzýmov je lokalizovaná v cytosole. Cytosolické enzýmy katalyzujúce redukciu karbonylovej skupiny, patria do nadrodín aldo-ketoreduktáz (AKR) a oxidoreduktáz s krátkym reťazcom (SDR) (*Škarydová, 2011*). Za využitia NAD(P)H ako kofaktoru, karbonyl-redukujúce enzýmy katalyzujú premenu karbonylovej skupiny, ako súčasť I. fázy metabolizmu endogénnych látok i xenobiotík, a tiež sa podieľajú na biosyntéze endogénnych látok. Enzýmy sú substrátovo špecifické, čo znamená, že daný enzým katalyzuje premenu len určitých špecifických substrátov. Jedna molekula môže byť tiež substrátom pre viaceré enzýmy (*Barski et al., 2008*).

Katalýzou karbonyl-redukujúcimi enzýmami dochádza k premene aldehydických a ketónových skupín na zodpovedajúce primárne alebo sekundárne alkoholické skupiny s nižšou chemickou reaktivitou (Obrázok 1). Redukované metabolity sú hydrofilnejšie, a teda jednoduchšie eliminované z organizmu, alebo môžu podstúpiť konjugáciu v II. fáze metabolizmu (*Penning, 2014a; Barski et al., 2008*).

Redukčné reakcie na karbonylovej skupine sú stereošpecifické, enzýmy využívajú NAD(P)H ako kofaktor. Väčšina AKR i SDR preferuje NADPH pred NADH. Tak ako aj iné enzýmy, aj AKR a SDR dokážu interagovať s oxidovanou i redukovanou formou kofaktoru. Nakoľko v metabolicky aktívnych bunkách prevažuje redukovaná forma kofaktoru NAD(P)⁺, sú uprednostňované redukčné reakcie. Proces redukcie prebieha v dvoch krokoch. Najskôr je hydridový ión prenesený z NAD(P)H na karbonylovú skupinu substrátu, následne je pridaný protón z aminokyseliny

aktívneho miesta enzýmu, a tým dôjde k redukcii karbonylu na alkohol (Barski *et al.*, 2008).



Obrázok 1: Schéma redukcie ketónovej skupiny na sekundárny alkohol (podľa *Biocatalytic synthesis [online]*).

Redukciou karbonylovej skupiny môžu vznikat' i biologicky aktívnejšie látky. Metabolizmus karbonylovej skupiny môže byť teda kľúčovým v procese regulácie aktivity molekuly. Karbonyl-redukujúce enzýmy majú preto aj protektívnu úlohu pred toxickými aldehydmi, vznikajúcimi peroxidáciou lipidov, a regulačnú funkciu pri steroidogenéze (Barski *et al.*, 2008; Hoffmann & Maser, 2007).

2.1 Aldo-ketoreduktázy

Nadrodina AKR združuje enzýmy katalyzujúce redukciu aldehydických a ketonických skupín na primárne a sekundárne alkoholy. Dodnes bolo popísaných približne 190 proteínov patriacich do tejto enzýmovej nadrodiny. Jednotlivé enzýmy sú podľa sekvenčnej podobnosti rozdelené do 16 rodín, z ktorých niektoré sú ešte ďalej rozdelené na podrodiny (Tabuľka 1). Enzýmy jednej podrodiny sú štruktúrne homologické aspoň na 60 %. V označení jednotlivých AKR je enzýmová rodina vyjadrená arabským číslom a podrodina veľkým písmenom. U človeka bolo identifikovaných 13 rôznych AKR, ktoré patria do troch rodín (Tabuľka 2) (Penning, 2014a; Jez *et al.*, 1997).

Väčšina AKR sú metabolicky aktívne proteíny. Zúčastňujú sa redukčných reakcií karbonylových skupín monosacharidov, steroidov, prostaglandínov, chinónových zlúčenín, medziproduktov lipidového metabolizmu a tiež xenobiotík (Penning, 2014a).

V rámci druhu sú gény pre AKR exprimované vo viacerých orgánoch. U človeka najvyššiu karbonyl-redukčnú aktivitu vykazujú bunky pečene a obličiek (Barski, 2008).

Tabuľka 1: Prehľad rodín AKR (podľa Penning, 2014a).

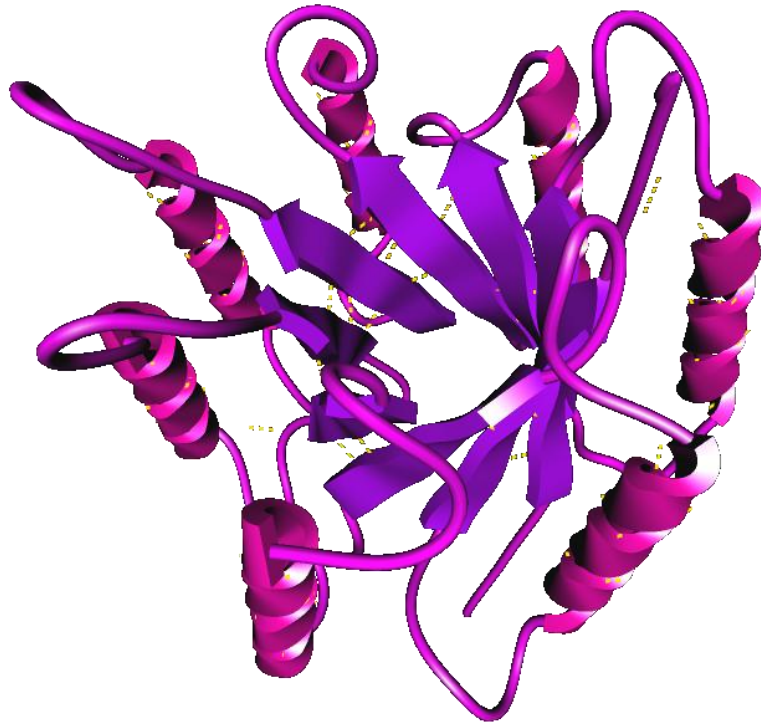
Rodiny	Proteíny
AKR1	aldehydreduktázy, aldózareduktázy, 5 β -steroidreduktázy
AKR2	manóza a xylózareduktázy
AKR3	AKR kvasiniek
AKR4	chalkón a kodeinonreduktázy
AKR5	reduktázy kyseliny glukónovej
AKR6	β -podjednotky 1 napätovo riadeného draselného kanálu
AKR7	aflatoxinaldehydreduktázy
AKR8	pyridoxalreduktázy
AKR9	arylalkoholdehydrogenázy
AKR10	AKR rodu <i>Streptomyces</i>
AKR11	AKR rodu <i>Bacillus</i>
AKR12	aldehydreduktázy pre cukry u rodu <i>Streptomyces</i>
AKR13	reduktázy hypertermofilných baktérií
AKR14	reduktázy <i>E. coli</i>
AKR15	reduktázy rodu <i>Mycobacterium</i>
AKR16	reduktázy rodu <i>V. cholera</i>

Tabuľka 2: Prehľad ľudských AKR a chromozómových lokalizácií ich génov
(podľa Penning, 2014a).

Gén	Proteín	Chromozómová lokalizácia
AKR1A1	aldehydoreduktáza	1p33 – p32
AKR1B1	aldózareduktáza	7q35
AKR1B10	aldózareduktáza tenkého čreva	7q33
AKR1B15	aldózareduktáza	7q33
AKR1C1	20 α -hydroxysteroiddehydrogenáza dihydrodioldehydrogenáza 1	10p15 – 10p14
AKR1C2	3 α -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 3 dihydrodioldehydrogenáza 2	10p15 – 10p14
AKR1C3	3 α -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 2 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 5 prostaglandín F syntháza	10p15 – 10p14
AKR1C4	3 α -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 1 dihydrodioldehydrogenáza 4	10p15 – 10p14
AKR1D1	3-ketosteroid-5 β -reduktáza	7q32 – 7q33
AKR1E2	1,5-anhydro-D-fruktózareduktáza	10p15.2
AKR6A3	β -podjednotka 1 napät'ovo riadeného draselného kanálu, člen 1	3q26.1
AKR6A5	β -podjednotka 1 napät'ovo riadeného draselného kanálu, člen 2	1p36.3
AKR6A9	β -podjednotka 1 napät'ovo riadeného draselného kanálu, člen 3	17p13.1
AKR7A2	aflatoxinaldehydoreduktáza 2	1p35.1 – p36.23
AKR7A3	aflatoxinaldehydoreduktáza 3	1p35.1 – p36.23

Enzýmy AKR sú štruktúrne veľmi podobné. Väčšina pozostáva z jedného monoméru s veľkosťou 34 – 37 kDa, avšak najnovšie dôkazy potvrdili i existenciu multimérnych foriem enzýmov v rodinách AKR2, AKR6 a AKR7. Špecifickým znakom tejto rodiny je štruktúrny motív $(\alpha/\beta)_8$ súdka, tiež známy ako „TIM barrel“ (triozofosfátisomeráza). Je to sekundárna štruktúra tvorená vnútorným kruhom, zloženým z ôsmich β -skladaných listov, a vonkajšou časťou, pozostávajúcou

z ôsmich α -hélixov, čo vytvára symetrické zoskupenie (Obrázok 2). Medzi jednotlivými enzýmami sú drobné rozdiely v tomto usporiadaní spôsobené ďalšími slučkami a hélixovými štruktúrami. Variácie v štruktúrnej skladbe umožňujú väzbu rozličných substrátov. Štruktúrny motív AKR a SDR sa líši, ale katalytické miesta sú podobné. U SDR je katalytické miesto tvorené aminokyselinami Tyr, Asn, Ser, Lys, zatiaľ čo u AKR sú to aminokyseliny Tyr, Asp, His, Lys (Jez *et al.*, 1997; Vega, 2003).



Obrázok 2: Štruktúra $(\alpha/\beta)_8$ (IDAV: Institute for data and analysis [online]).

2.1.1 AKR1A1

Aldehydreduktáza (AKR1A1) ako kľúčový enzým v biosyntéze kyseliny askorbovej, bol jedným z prvých identifikovaných enzýmov nadrodiny AKR. Tento monomérny cytosolický enzým sa vyskytuje takmer vo všetkých tkanivách, pričom najvyššiu expresiu vykazuje v proximálnych tubuloch obličiek. U hlodavcov sa pravdepodobne zúčastňuje fyziologického procesu redukcie D-glukuronátu ako medzikrok v biosyntéze kyseliny askorbovej. Ľudské telo však vitamín C nedokáže syntetizovať, preto ešte nie je odhalená fyziologická úloha AKR1A1 u človeka.

AKR1A1 katalyzuje tiež opačnú reakciu, a to oxidáciu *trans*-dihydrodiolových zlúčenín na *o*-chinóny (Barski, 2005).

2.1.2 AKR1B1

Z podrodiny AKR1B sú u človeka dobre charakterizované dva enzýmy: AKR1B1 a AKR1B10, známe tiež ako aldózareduktázy zúčastňujúce sa redukcie aldehydov na alkoholy (napr. glukózy na sorbitol, retinalu na retinol) (Rižner, 2012; Barski et al., 2008).

AKR1B1 sa nachádza v cytoplazme, jadre, jadierku, cytosole bunky i v extracelulárnom priestore. Zúčastňuje sa prvého kroku metabolizmu polyolových sacharidových látok, kde sprostredkováva premenu glukózy na zodpovedajúci alkohol sorbitol. Táto premena za fyziologických podmienok nespôsobuje žiadne komplikácie, avšak pri diabetickej hyperglykémii je produkované väčšie množstvo hyperosmoticky pôsobiaceho sorbitolu, ktorý sa kvôli pomalej redukcii sorbitoldehydrogenázou kumuluje v bunkách, čo má za následok hyperosmotický stres bunky. Enzým AKR1B1 je teda považovaný za potenciálny mediátor komplikácií diabetu, preto je intenzívnejšie študovaný, so snahou vyvinúť liečivá, ktoré by inhibíciou AKR1B1 zabraňovali diabetickej retinopatii, nefropatii a neuropatii (Penning, 2014a; PhosphoSitePlus [online], OMIM [online]).

Enzým AKR1B1 zohráva významnú úlohu v proliferácii hladkej svaloviny ciev počas procesu aterosklerózy a v sprostredkovaní bunkovej odpovede rastovými faktormi a cytokínmi. Svojou účasťou na syntéze prostaglandínov AKR1B1 nepriamo stimuluje produkciu cytokínov a mediátorov zápalu (Ramana, 2002).

Špecifickým znakom enzýmu AKR1B1 je jeho citlivosť k oxidácii. Oxidáciu cysteínových zvyškov lokalizovaných v aktívnom mieste enzýmu, sa urýchli katalýza. Deje sa to v dôsledku zníženia afinity enzýmu k NADPH, a preto sa rýchlejšie uvoľňuje NADP⁺, čo je krok limitujúci rýchlosť katalýzy (Barski et al., 2008).

2.1.3 AKR1B10

Aminokyselinová štruktúra AKR1B10 je zo 71 % identická s AKR1B1, substrátová špecifickosť aj citlivosť k inhibítorm je tiež podobná AKR1B1. AKR1B10 je aldózareduktáza vyskytujúca sa najmä v tenkom čreve, ale tiež v hrubom čreve a pečeni (*Barski et al., 2008*).

Svojou aktivitou pôsobí AKR1B10 proti tvorbe kyseliny retinovej, signálnej molekuly v procese regulácie bunkovej proliferácie. Koncentrácia kyseliny retinovej v bunke je závislá na množstve retinalu, z ktorého vzniká ireverzibilnou reakciou. Pri zvýšenej aktivite AKR1B10 je retinal spätnou reakciou premieňaný na alkohol retinol, a teda je znemožnená produkcia kyseliny retinovej (*Rižner, 2012; Ruiz et al., 2009*).

Zvýšená expresia enzýmu AKR1B10 bola zaznamenaná pri karcinóme pľúc, javí sa teda ako potenciálny diagnostický nádorový marker (*Fokumoto, 2005*).

2.1.4 AKR1C

Do podrodiny AKR1C je zaradených 25 enzýmov, z toho 4 sa vyskytujú u človeka. Izoformy AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4 sú ľudské hydroxysteroiddehydrogenázy. Enzýmy podrodiny AKR1C sa podieľajú na redukcii 3-, 17- a 20-ketoskupiny steroidných látok, čím sa v ľudskom tele zúčastňujú na biosyntéze a metabolizme androgénov, estrogénov a progesterónu. Podieľajú sa tiež na metabolizme prostaglandínov, redukcii retinaldehydu a metabolizme xenobiotík. Enzýmy AKR1C sú schopné katalyzovať nielen redukcie, ale aj opačné reakcie, a to oxidácie dihydrodiolových aromatických uhlíkov. Smer katalyzovanej reakcie závisí na afinite enzýmu ku kofaktoru a na pomere redukovaného a oxidovaného kofaktora. Medzi jednotlivými AKR1C enzýmami je vysoká podobnosť v sekvencii aminokyselín (84 – 98 %). Spektra substrátov redukovaných jednotlivými enzýmami sa často tiež prekrývajú (*Barski et al., 2008; Penning et al., 2000*).

Hlavnými substrátmi AKR1C sú steroidné látky. Substrát sa musí správne naviazať do aktívneho miesta enzýmu. Pre redukciu 3-ketoskupiny je potrebné, aby do aktívneho miesta zapadol kruh A steroidného cyklu. Pri redukcii 20-ketoskupiny

do aktívneho miesta zapadá kruh D, rovnako i pri redukcii 17-ketoskupiny sa naviaže kruh D, avšak molekula substrátu je priestorovo obrátená (*Penning et al., 2000*).

AKR1C sú cytosolické enzýmy. Všetky tieto enzýmy sú exprimované v pečeni, v extrahepatálnej lokalizácii sa už ale odlišujú. V pľúcach sú najviac zastúpené AKR1C1 – AKR1C3, v prostate AKR1C2 a AKR1C3, v prsnej žľaze AKR1C3, v endometriu AKR1C1 – AKR1C3 (*Penning et al., 2000*).

Účasťou na metabolizme steroidných hormónov sa enzýmy AKR1C podieľajú na regulácii koncentrácií aktívnych a inaktívnych foriem hormónov v jednotlivých orgánoch. Nerovnováha v procesoch biosyntézy a odbúravania môže viesť k rozvoju benignej hyperplázie prostaty, endometrióze a k rozvoju hormón-dependentných nádorových ochorení (*Rižner & Penning, 2014*).

Na biosyntéze steroidných hormónov sa AKR1C podieľajú v spolupráci s 5 α -reduktázami (SRD5A1 – SDR5A2) a 5 β -reduktázami (AKR1D1). V metabolizme androgénnych hormónov sa AKR1C podieľajú na tvorbe najviac farmakologicky účinného 5 α -dihydrotestosterónu (5 α -DHT) a tiež na jeho odbúravaní. 3- a 17-ketoreduktázy a uplatňujú pri premene androsten-3,17-diónu na testosterón. Tvorba 5 α -DHT z testosterónu je následne katalyzovaná 5 α -reduktázami. AKR1C katalyzujú tiež inaktiváciu 5 α -DHT na 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (*Penning, 2014b*).

V metabolizme estrogénnych hormónov AKR1C enzýmy katalyzujú premenu estrónu na aktívny hormón estradiol, kedy je redukovaná 17-ketoskupina estrónu. Najvyššiu katalytickú účinnosť v tejto premene vykazuje AKR1C3. Na metabolizme progesterónu sa podieľa AKR1C1, ale i AKR1C2 a AKR1C3, katalyzujúce redukciiu progesterónu na menej aktívny 20-hydroxymetabolit (*Rižner & Penning, 2014*).

Enzýmy AKR1C4 a AKR1D1, s výraznou expresiou v pečeni, hrajú dôležitú úlohu v biosyntéze žľových kyselín. AKR1D1 katalyzuje 5 β -redukciiu dvojitej väzby, AKR1C4 následne katalyzuje redukciiu 3-ketoskupiny za vzniku 5 β -cholestan-3 α ,7 α -diolu, prekursoru žľových kyselín (*Penning, 2000; Russell & Setchell, 1992*).

Enzýmy AKR1C sa tiež podieľajú na biotransformácii liečiv. Inhalačne podávané syntetické kortikoidy budesonid a flunizolid sú substrátmi AKR1C. Dydrogesterón, používaný pri menštruačných poruchách a na udržanie tehotenstva, je katalýzou AKR1C1 a AKR1C2 metabolizovaný na 20 α -hydroxymetabolit. Syntetický hormón tibolon, používaný v postmenopauzálnnej terapii, podstupuje bioaktiváciu sprostredkovanú enzýmami AKR1C za vzniku redukovaného 3-hydroxymetabolitu. Antineoplastika daunorubicín a doxorubicín podliehajú redukciiu za vzniku

kardiotoxických metabolitov bez terapeutického účinku. Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAH), polutanty z prostredia, sú prostredníctvom AKR1C aktivované na reaktívne hydroxymetabolity schopné poškodiť DNA (*Rižner & Penning, 2014; Penning, 2007*).

AKR1C1 sa nazýva tiež 20 α -hydroxysteroiddehydrogenáza, u človeka sa podieľa hlavne na katalýze redukcie hormónu progesterónu na jeho inaktívny 20-hydroxymetabolit (*Barski et al., 2008*).

AKR1C2 sa od enzýmu AKR1C1 štruktúrne odlišuje len v siedmich aminokyselinách, pričom v aktívnom mieste sa líši len jednou aminokyselinou. Podieľa sa na syntéze žlčových kyselín a následne sa uplatňuje ako ich transportný proteín. AKR1C2 má najvyššiu 3-ketoreduktázovú aktivitu, katalyzuje inaktiváciu 5 α -DHT na 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (*Penning, 2014b*).

AKR1C3 pôsobí ako 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza pri premene estrónu na účinný estradiol, androsten-3,17-diónu na testosterón a 5 α -androstan-3,17-diónu na 5 α -dihydrotestosterón. AKR1C3 sa uplatňuje tiež ako prostaglandín F syntáza. (*Penning, 2014b*).

AKR1C4 je najviac katalyticky aktívny enzým z podrodiny AKR1C, pričom jeho katalytická účinnosť je 10 až 30-krát vyššia v porovnaní s ostatnými členmi podrodiny. Tento enzým sa nachádza takmer výhradne v pečňových bunkách (*Penning, 2000; Barski et al., 2008*).

Indometacin, flufenamová kyselina, fenolftaleín a diazepam pôsobia ako inhibítory všetkých ľudských AKR1C enzýmov (*Malátková et al., 2014*).

2.1.5 AKR1D1

AKR1D1 (3-ketosteroid-5 β -reduktáza) je cytosolický enzým podieľajúci sa na biosyntéze žlčových kyselín a na metabolizme steroidných hormónov. Na rozdiel od enzýmov AKR1C, AK1D1 nekatalyzuje redukciu karbonylovej skupiny, ale podieľa sa na hydrogenácii dvojitej väzby, vychádzajúcej z uhlíka C4 steroidného skeletu. Po redukcii sú kruhy A a B v *cis*-konformácii, na rozdiel od 5 α -reduktáz (enzýmy SRD5A1 – SRD5A3), ktoré sprostredkujú redukciu vedúcu k *trans*-konformácii. Enzým AKR1D1 je najviac exprimovaný v pečňových bunkách, čo zodpovedá jeho funkčnému uplatneniu (*Chen & Penning, 2014*).

2.2 Karbonylreduktázy

Karbonylreduktázy (CBR) patria do nadrodiny oxidoreduktáz s krátkym reťazcom (SDR). Za využitia NADPH ako koenzýmu katalyzujú redukciu veľkého množstva ako endogénnych látok, tak aj xenobiotík. Prvýkrát bola karbonylreduktáza izolovaná z ľudského mozgu. Výskyt ďalších karbonylreduktáz bol neskôr potvrdený vo všetkých tkanivách živočíchov a tiež v niektorých pletivách rastlín, baktériách a v kvasinkách (*Zelinski et al., 1994, Forrest & Gonzales, 2000; Ris & Warteburg, 1973*).

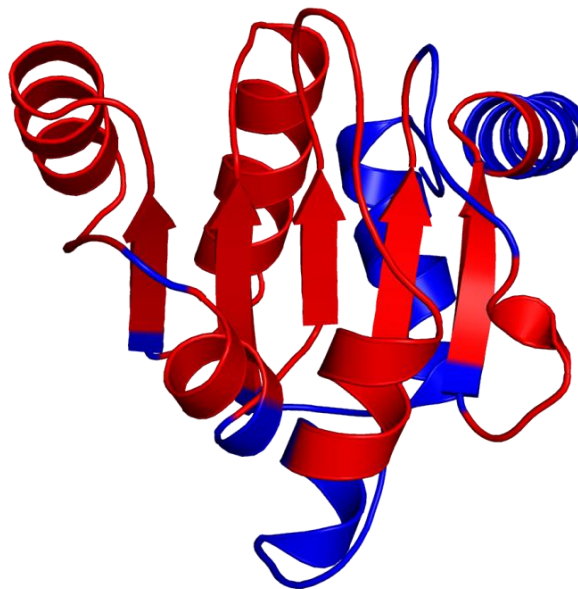
CBR sa podieľajú hlavne na katalýze redukcie reaktívnej karbonylovej skupiny, zahŕňajúcej ako aldehydy, tak aj ketóny, na skupinu alkoholovú. Pri niektorých reakciách sprostredkujú ale i oxidáciu alkoholovej skupiny, pričom sa ako kofaktor uplatňuje NADP⁺. CBR sa zúčastňujú biosyntézy i metabolizmu endogénnych látok: prostaglandínov, steroidov, biogénnych amínov, polycyklických aromatických uhlíkov, reaktívnych aldehydov produkovaných peroxidáciou lipidov, a tiež metabolizmu liečiv, ktoré majú v štruktúre karbonylovú skupinu na postrannom reťazci (napr. antracyklíny doxorubicín a daunorubicín). Vznik alkoholovej skupiny prostredníctvom tejto reakcie v I. fáze metabolizmu umožňuje následnú konjugáciu a exkréciu (*Hoffmann & Maser, 2007; Ahmed et al., 1981*).

CBR boli pôvodne zaradené medzi aldo-ketoreduktázy na základe ich enzymatickej aktivity a substrátovej špecificity, ktorou sa im pripodobňujú, avšak odlišujú sa v primárnej štruktúre, ktorá je podobná práve enzýmom nadrodiny SDR. Odlíšiť CBR od aldehydoreduktáz a alkoholdehydrogenáz, ktoré tiež metabolizujú podobné substráty, je možné pomocou substrátov s aromatickou ketónovou skupinou, a tiež pomocou flavonoidových inhibítorov (rutínu, kvercetínu, kvercitrínu) (*Hoffmann & Maser, 2007; Wermuth, 1988; Bohren et al., 1989; Sawada & Hara, 1979*).

CBR boli detegované pomocou imunohistochemického farbenia vo všetkých tkanivách, avšak množstvá sa výrazne líšili. Vysoké množstvo bolo detegované v parenchymálnych bunkách pečene, v pokožke, epiteliálnych bunkách žalúdka, tenkého čreva, proximálnych tubuloch obličiek, v centrálnej nervovej sústave. V ľudskom tele sú tieto enzýmy široko distribuované na rozdiel od iných živočíchov, u ktorých je expresia výraznejšie lokalizovaná. U človeka sa vyskytujú izoformy CBR1,

CBR3 a CBR4. Zatiaľ čo CBR1 a CBR3 sa vyskytujú v cytosole, CBR4 je lokalizovaná v mitochondriách (Malátková *et al.*, 2012; Matsunaga *et al.*, 2006).

Štruktúru CBR tvorí približne 250 aminokyselinových zvyškov. Napriek tomu, že SDR enzýmy sa najčastejšie vyskytujú ako diméry či tetraméry, CBR1 a CBR3 sú monoméne proteíny. Štruktúrnym znakom celej nadrodiny SDR je prítomnosť Rossmannovho záhybu, ktorý je tvorený paralelnými štruktúrami β -skladaných listov, obklopenými po stranách vždy 2 – 3 α -hélixami (Obrázok 3). Podobnosť jednotlivých enzýmov v rámci rodiny je relatívne nízka: 15 – 30 %. CBR obsahujú na N-konci sekvenciu GlyXXXGlyXGly, ktorá slúži na väzbu kofaktora. Ďalším typickým znakom pre SDR je Tyr v polohe 194. Vďaka týmto štruktúrnym znakom je možné odlíšiť CBR od iných enzýmov (Kavanagh *et al.*, 2008; Forrest & Gonzales, 2000).



Obrázok 3: Schematické znázornenie štruktúry Rossmannovho záhybu (Grishin Lab [online]).

2.2.1 CBR1

Ľudská CBR1 je monomérený proteín, vyskytujúci sa v cytosole, s distribúciou hlavne v pečeni, pokožke, tráviacom trakte (žalúdok, duodenum, jejunum), proximálnych tubuloch obličiek a vo všetkých častiach CNS (intenzívnejšie v šedej hmote, neurónoch, gliových bunkách). Malé množstvá enzýmu boli nájdené aj v ďalších

tkanivách. Gén pre ľudskú CBR1 bol prvýkrát identifikovaný na 21. chromozóme, čo bolo neskôr spresnené na lokalizáciu 21q22.12. CBR1 sa nachádza aj u iných živočíchov, ako napríklad prasa, králik, potkan, myš (*Forrest & Gonzales, 2000; Wirth & Wermuth, 1992*).

CBR1 má veľmi širokú substrátovú špecificitu. Významnými substrátmi CBR1 sú *p*- a *o*-chinonové zlúčeniny. Medzi endogénne substráty patrí menadión, ubichinón, tokoferolchinón (antioxidačne pôsobiaci vitamín E) a prostaglandíny. V metabolizme vitamínu K enzým CBR1 katalyzuje redukciu menadiónu (vitamín K₃) na menadiol, ubichinón (koenzým Q) ako súčasť respiračného reťazca je prostredníctvom CBR1 redukovaný na antioxidačne pôsobiaci ubichinol. CBR1 v metabolizme prostaglandínov pôsobí ako prostaglandín-9-ketoreduktáza, kedy redukuje 9-ketoskupinu prostaglandínu E₂, a tiež sa uplatňuje ako 15-hydroxyprostaglandíndehydrogenáza pri oxidácii 15-hydroxyskupiny (*Malátková et al., 2010; Wermuth, 1981*).

V metabolizme xenobiotík sa CBR1 uplatňuje pri redukcii chinónových zlúčenín, ktoré sú veľmi reaktívne a môžu poškodzovať DNA a spôsobovať oxidačný stres v bunke. CBR1 je hlavný hepatálny enzým, metabolizujúci chinónové zlúčeniny odvodené od PAH. Z liečiv sú substrátmi CBR1 haloperidol, loxoprofén, dolasetron. Cytostatika doxorubicín a daunorubicín sú prostredníctvom CBR1 premenené na metabolity vykazujúce kardiotoxicitu (*Malátková et al., 2010; Oppermann, 2007*).

Medzi inhibítory CBR1 patrí indometacín, furosemid a flavonoidy kvercetín a rutín (*Wermuth, 1981*).

2.2.2 CBR3

CBR3 je tiež cytosolický enzým, veľmi podobný CBR1 (homológia 79 % v sekvencii aminokyselín), jeho gén je 62 kb vzdialený od génu pre CBR1. Kľúčovým rozdielom v štruktúre je zámena aminokyseliny prolinu na pozícii 244, ktorá sa vyskytuje u CBR1, za valín, ktorý je naopak typický pre CBR3, čím sa zmení konformácia aktívneho miesta pre substrát. Táto zmena má za následok výrazne nižšiu substrátovú špecificitu oproti CBR1, a navyše k rovnakým substrátom vykazuje CBR3 nižšiu aktivitu. Enzým bol identifikovaný vo viacerých tkanivách, pričom najväčšia expresia bola zaznamenaná v pankrease. V porovnaní s CBR1 je expresia CBR3

celkovo nižšia vo väčšine tkanív (*Malátková et al. 2010; Miura, 2008; Hoffmann & Maser, 2007*).

CBR3 sa na rozdiel od CBR1 nepodieľa na redukcii 9-ketoskupiny prostaglandínov a tiež nevykazuje 3-ketosteroidreduktázovú aktivitu. Substrátmi CBR3 nie sú *p*-chinónové zlúčeniny, ale len *o*-chinóny. CBR3 sa podieľa na redukcii doxorubicínu a daunorubicínu, pričom doxorubicín je lepším substrátom pre CBR3 ako CBR1, ale CBR1 je v cytosole pečene zastúpená približne v 10-krát väčšom množstve. Okrem isatinu nebol zatiaľ objavený endogénny substrát pre CBR3 (*Malátková et al., 2010*).

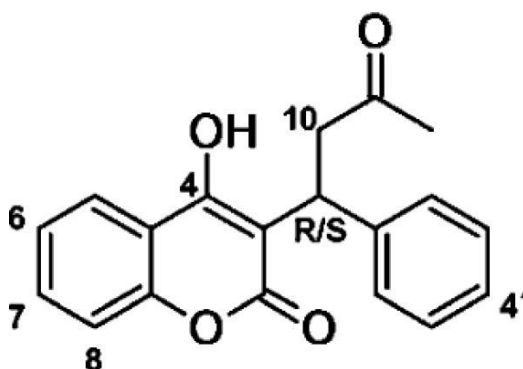
2.2.3 CBR4

CBR4 je lokalizovaná v mitochondriálnej matrix. Gén pre tento enzým je lokalizovaný na 4. chromozóme, konkrétne 4.q32.3. Proteín je zložený z 237 aminokyselín a vykazuje nízku podobnosť s ostatnými CBR, len 23 %.

Enzým vykazuje redukčnú aktivitu voči *o*- a *p*-chinónovým zlúčeninám. Hlavnou odlišnosťou CBR4 od ostatných CBR je neschopnosť redukovať iné karbonylové zlúčeniny (alifatické a aromatické, aldehydy a ketosteroidy). Úloha CBR4 v endogennom metabolizme nie je úplne známa, je možná protektívna funkcia enzýmu pred cytotoxickými chinónovými zlúčeninami. Nedávno bola CBR4 identifikovaná ako enzým podieľajúci sa na syntéze mastných kyselín v mitochondriách (*Malátková et al., 2010; Matsunaga et al., 2006*).

3 WARFARIN

Warfarin je liečivo kumarínovej štruktúry vyznačujúce sa antikoagulačnými účinkami (Obrázok 4). Prvýkrát bol syntetizovaný na univerzite vo Visconsine, na liečebné účely začal byť používaný od roku 1950. V súčasnej modernej medicíne je warfarin stále v širokej miere predpisovaný k prevencii žilnej trombózy, pľúcnej embólie, pri atriálnej fibrilácii a po operáciách (Burton *et al.*, 2006).

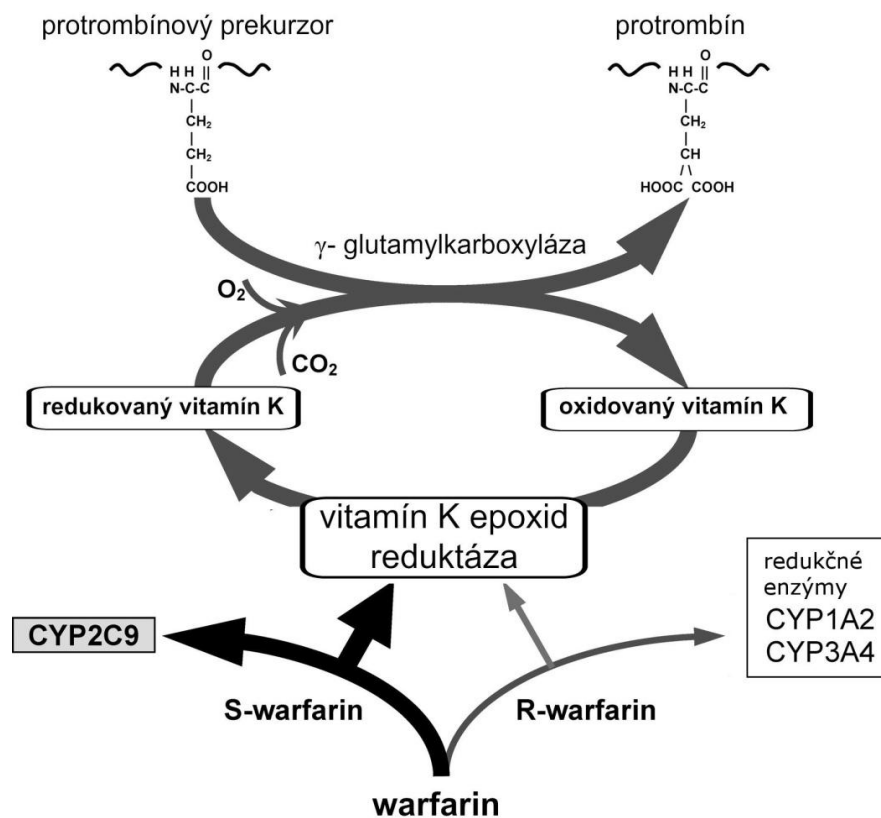


Obrázok 4: Chemická štruktúra warfarinu (Warfarin. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]).

Farmakologický účinok warfarinu je sprostredkovaný väzbou na vitamín K-epoxid reduktázový komplex (VKORC1). Naviazaný warfarin inhibuje funkciu VKORC1 a nedochádza k redukcii vitamínu K, dôležitého pre aktiváciu zrážacích faktorov (Obrázok 5) (Johnson, 2014).

Terapeuticky používaný warfarin je racemická zmes (*S*)- a (*R*)-stereoizoméru. Existencia dvoch stereoizomérov je podmienená prítomnosťou chirálneho uhlíka na pozícii C9. Stereoizoméry sa odlišujú vo farmakologickej aktivite i v metabolizme. (*S*)-warfarin má silnejšie antikoagulačné účinky, čo je vysvetľované tým, že je 3 až 5-krát silnejším inhibítorom VKORC1 ako (*R*)-warfarin. Biologický polčas (*S*)-warfarinu je 2 až 4-krát kratší ako polčas (*R*)-warfarinu. Jednotlivé stereoizoméry warfarinu sú enzýmami I. fázy metabolizované odlišne. (*R*)-warfarin je metabolizovaný predovšetkým prostredníctvom redukcie karbonylovej skupiny, zatiaľ čo oxidačný metabolizmus sprostredkovaný CYP450 zohráva malú úlohu. U (*S*)-warfarinu je naopak

dominantný práve oxidačný metabolizmus (Kaminsky & Zhang, 1996; Hermans & Thijssen, 1993; Choonara et al., 1986).



Obrázok 5: Schéma cieľového pôsobenia warfarínu s vyznačenými hlavnými metabolickými dráhami (Ansell, 2008, upravené).

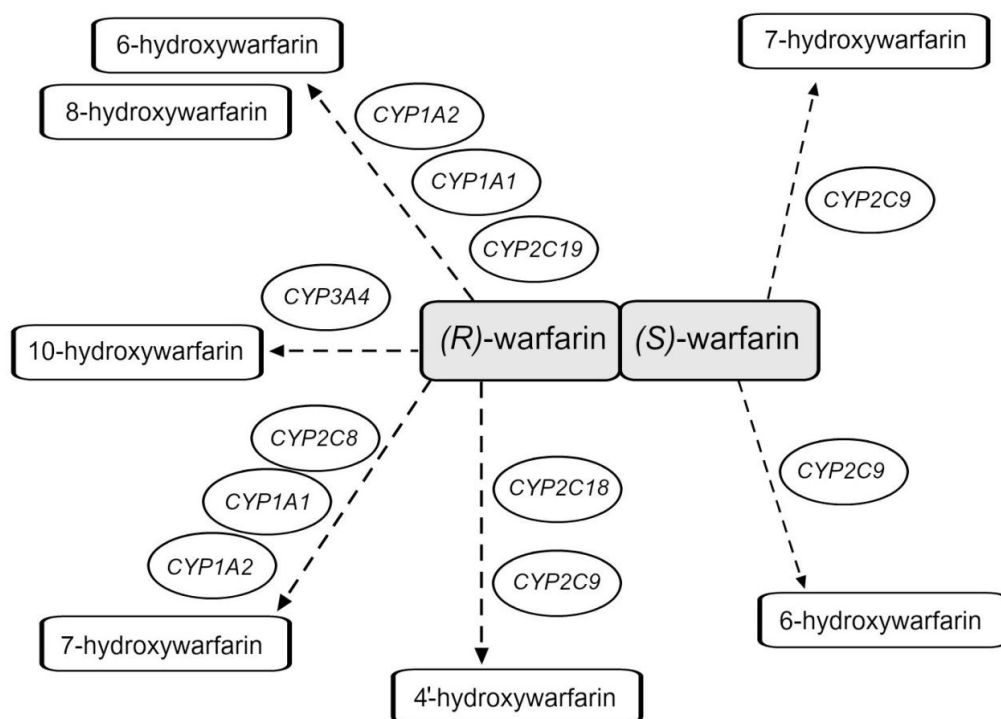
Hlavne na začiatku terapie warfarínom hrozí riziko nadmerne zníženej koagulácie s následným rizikom krvácania, ako dôsledok intraindividuálnej variability odpovede organizmu na podané liečivo. Vzhľadom na úzke terapeutické okno warfarínu je dôležité čo najdôkladnejšie poznať metabolizmus warfarínu pre správne nastavenie dávky. Rozdiely v hepatálnom metabolizme warfarínu sú významným determinantom odlišnej farmakologickej odpovede. Účinok warfarínu je do veľkej miery ovplyvnený genetikou pacienta. Významný je polymorfizmus génu pre CYP2C9, enzýmu metabolizujúceho (*S*)-warfarín, a génu pre VKORC1, cieľového proteínu účinku warfarínu. V európskej populácii sú známe dva varianty CYP2C9, ktoré sú zodpovedné za tieto komplikácie: CYP2C9*2 a CYP2C9*3. Pre pacientov s týmito variantmi

CYP2C9 je potrebné znížiť dávky podávaného warfarinu na zníženie rizika krvácania (Sconce, 2005; Johnson, 2014).

V ľudskom tele je warfarin v I. fáze metabolizovaný prostredníctvom hydroxylácie molekuly alebo prostredníctvom redukcie karbonylovej skupiny. Ústredná metabolická dráha warfarinu prebieha za katalýzy oxidačných cytochrómov P450, čím vznikajú monohydroxylované metabolity. Karbonylová skupina na postrannom reťazci podlieha redukčnému metabolizmu, ktorý katalyzujú NADPH-dependentné karbonyl-redukujúce enzýmy. Takto vzniknuté metabolity ďalej podstupujú v II. fáze metabolizmu konjugáciu sprostredkovanú glukuronyl- a sulfotransferázami (Kaminsky & Zhang, 1997; Hermans & Thijssen, 1989).

3.1 Oxidačný metabolizmus warfarinu

Na katalýze oxidačných reakcií warfarinu sa podieľajú viaceré izoformy CYP450, vykazujúce odlišnú stereoselektivitu a regioselektivitu. Hydroxylová skupina je touto reakciou zavedená do jednej z piatich pozícií v molekule warfarinu, pričom vznikajú 6-, 7-, 8-, 10- alebo 4'-hydroxylované metabolity. Každá z izoforiem CYP450 produkuje niekoľko metabolitov, a to v definovanom pomere. Jednotlivé izoformy CYP450 sprostredkujú metabolickú premenu na rôznych miestach, tieto enzýmy sa teda správajú regioselektívne. CYP1A2 je stereoselektívny pre (*R*)-warfarin a regioselektívny pre vznik 6- a 8-hydroxywarfarinu. Pre (*S*)-warfarin je prevládajúcou metabolickou dráhou premena sprostredkovaná CYP2C9 za vzniku 7-hydroxylovaného metabolitu. Dominanciu katalýzy CYP2C9 v biotransformácii warfarinu potvrdzuje i prevaha (*S*)-7-hydroxywarfarinu pri analýze metabolitov v ľudskom moči. Na metabolizme (*R*)-warfarinu sa podieľajú viaceré izoformy CYP450, dominuje hydroxylácia v polohe C6, na ktorej sa podieľajú hlavne CYP1A2 a CYP3A4. Oxidáciu (*R*)-warfarinu však katalyzujú aj izoformy CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19 (Obrázok 6) (Miller et al., 2009; Zhang et al., 1995; Rettie et al., 1992).



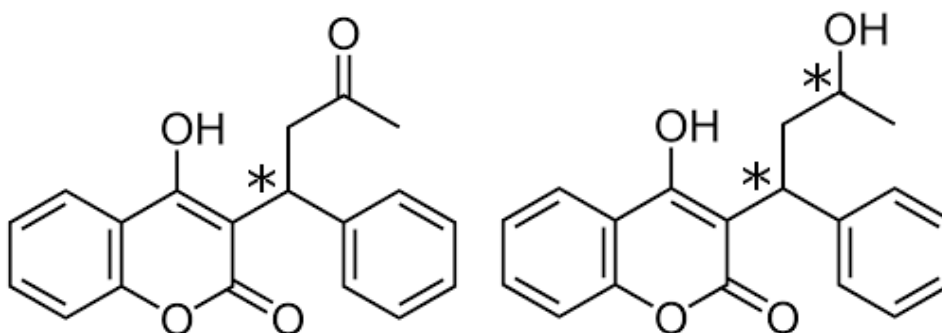
Obrázok 6: Metabolické cesty warfarínu katalyzované CYP450 (podľa THORN, PharmGKB [online]).

3.2 Redukčný metabolizmus warfarínu

Súčasťou metabolizmu warfarínu je tiež redukcia karbonylovej skupiny na postrannom reťazci. Táto premena je katalyzovaná NAD(P)H-dependentnými karbonyl-redukujúcimi enzýmami, umiestnenými v endoplazmatickom retikule a v cytosole, za vzniku redukovaného metabolitu (warfarín-alkoholu) (Obrázok 7). Uvádza sa, že asi 15 – 20 % perorálne podaného warfarínu je metabolizovaných práve redukciou postrannej karbonylovej skupiny (*Hermans & Thijssen, 1992*). Koncentrácie warfarín-alkoholov v ľudskej plazme a v moči neboli doteraz dostatočne študované, preto nie je možné spoľahlivo odhadnúť, v akej miere sa redukčné reakcie podieľajú na metabolizme warfarínu (*Malátková & Wsól, 2014*).

Redukciou karbonylovej skupiny na alkoholickú sa v molekule objavuje ďalšie chirálne centrum, čo dáva vzniku ďalších dvoch možných stereoizomérov. Preto redukciou racemického warfarínu môžu vzniknúť až 4 diastereoizomérmé alkoholy.

Metabolizmus karbonylovej skupiny je stereošpecifický a stereoselektívny. Redukcii podliehajú oba enantioméry warfarinu, avšak preferenčne je redukovaný (*R*)-warfarin. Redukciou vzniká prednostne (*S*)-izomér, čo potvrdzuje aj prítomnosť (*S,R*)-warfarin-alkoholu ako najviac zastúpeného metabolitu v plazme. Ďalším značne zastúpeným metabolitom je (*S,S*)-warfarin-alkohol. V porovnaní s warfarinom je farmakologická aktivita warfarin-alkoholu minimálne 4-krát nižšia (Malátková & Wsól, 2014; Jones & Miller, 2011; Hermans & Thijssen, 1989; Chan, 1972).



Obrázok 7: Štruktúra warfarinu (vľavo) a jeho redukovaného metabolitu warfarin-alkoholu (vpravo) (Warfarin. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online], upravené).

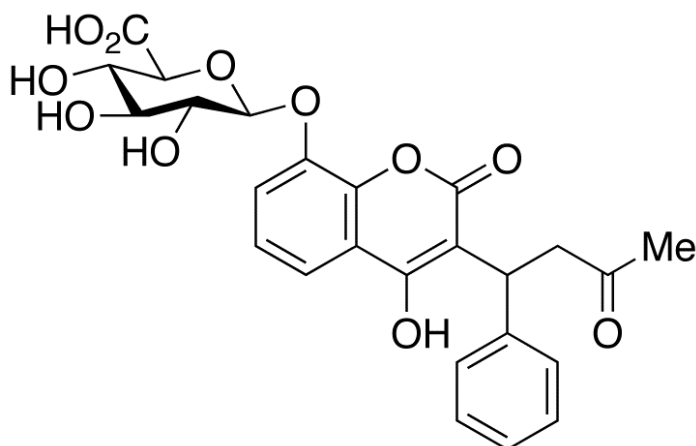
Predpokladá sa, že na redukcii warfarinu sa podieľajú minimálne 2 enzýmy. Pri súčasnom podaní sulfínpyrazonu a warfarinu došlo k zníženiu tvorby (*S,R*)-warfarin-alkoholu. Sulfínpyrazon, podaný spolu s warfarinom, pôsobil ako inhibítor enzýmu produkujúceho (*S,R*)-warfarin-alkohol, keďže po podaní bol zaznamenaný pokles tvorby (*S,R*)-warfarin-alkoholu. Tvorba (*S,S*)-warfarin-alkoholu sa nezmenila, a preto sa predpokladá, že na jeho tvorbe sa podieľa iný enzým (Malátková & Wsól, 2014; Toon et al., 1986)

Pri *in vitro* skúmaní metabolizácie warfarinu vykazovali karbonyl-reduktázovú aktivitu cytosolické a mikrozómové frakcie rôznych živočíšnych druhov. Ľudské mikrozómy i cytosol vykazovali preferenciu pre (*R*)-warfarin, ktorý bol redukovaný na (*R,R*)/(*S,R*)-warfarin-alkohol. Ako inhibítory cytosolickej redukcie warfarinu boli identifikované látky kvercetín, indometacín, prostaglandín E2 a furosemid. Na základe týchto inhibítorov sa predpokladá, že na cytosolickej redukcii warfarinu sa podieľa

enzým z rodiny AKR1 alebo nadrodiny SDR. Konkrétne enzýmy podieľajúce sa na redukcii karbonylovej skupiny warfarinu ale ešte neboli identifikované (*Hermans & Thijssen, 1989, 1993*).

3.3 Konjugačné reakcie

V II. fáze metabolizmu warfarinu dochádza ku konjugácii hydroxylovaných metabolitov, ktoré vznikli v I. fáze, s endogénnymi zlúčeninami. Metabolity warfarinu sú konjugované najčastejšie s kyselinou glukuronovou za katalýzy UDP-glukuronyltransferázy (UGT) (Obrázok 8). Aj samotný warfarin má v molekule hydroxylovú skupinu, ktorá by mohla byť potenciálnym miestom konjugácie (*Zielinska et al., 2007*).



Obrázok 8: Glukuronid 8-hydroxywarfarinu (*Toronto Research Chemicals [online]*).

Proces konjugácie nie je u človeka veľmi preskúmaný. V pečenej bunkách potkana je 4-hydroxywarfarin prednostne konjugovaný s kyselinou glukuronovou za katalýzy UGT, avšak 6-hydroxywarfarin podstupuje konjugáciu so sulfátom a 7- a 8-hydroxywarfarin podstupujú obidve premeny. Zatiaľ nie je známy enzým, ktorého substrátom by bol 10-hydroxywarfarin. Všeobecne je proces konjugácie dôležitý pre transport metabolizovaných xenobiótik do moču a/alebo do žlče a pre ich následnú exkréciu z tela (*Zielinska et al., 2007; Ritter, 2000; Jansing, 1992*).

U človeka existuje asi 20 rôznych izoforiem UGT patriacich do 2 podrodín. Najvyššiu aktivitu v konjugácii metabolitov warfarinu vykazuje izoforma UGT1A10.

Tento extrahepatálny enzým katalyzuje glukuronidáciu 4'-, 6-, 7- a 8-hydroxywarfarinu. Podobnú metabolickú účinnosť má aj izoforma UGT1A8, vykazuje ale vyššiu substrátovú špecifickosť pre 7- a 8-hydroxywarfarin. Z hepatálnych enzýmov sa na konjugácii hydroxylovaných metabolitov warfarinu podieľajú izoformy UGT1A1 a UGT1A9 (*Zielinska et al. 2007; Ritter, 2000*).

V ľudskom moči bolo detegovaných 24 metabolitov warfarinu, čím bolo dokázané, že ľudské telo má schopnosť priamo glukuronidovať warfarin i jeho metabolity. Vysoká koncentrácia týchto glukuronidovaných metabolitov tiež dokazuje, že glukuronidácia je dôležitým procesom II. fáze metabolizmu pre účinné vylúčenie warfarinu (*Miller et al., 2009*).

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je identifikovať enzým(y) podieľajúce sa na redukcii warfarinu a stanoviť kinetiku týchto enzymatických premien. Jednotlivé čiastkové ciele práce sú:

- stanoviť optimálne podmienky na získavanie produktu redukcie,
- stanoviť mieru extrakcie warfarinu a warfarin-alkoholu,
- študovať redukcii warfarinu v cytosole a mikrozómoch,
- identifikovať cytosolické enzýmy redukujúce warfarin.

EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Prístroje

Minicentrifúga Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf, Nemecko)
Multipette plus (Eppendorf, Nemecko)
Thermomixer komfort (Eppendorf, Nemecko)
Trepáčka Vortex Genius 3 (IKA, Nemecko)
UHPLC Agilent 1290 Infinity
Kolona Zorbax C18 Eclipse plus 2,1×50 mm, veľkosť póru 1,8 μm
Ultrazvuková vaňa UC 005 AJ1 (Tesla, Slovensko)
Vákuový koncentrátor Eppendorf 50 301 (Eppendorf, Nemecko)

5.2 Chemikálie

Acetón (Merk, Nemecko)
Acetonitril (Sigma-Aldrich, Nemecko)
Amoniak 25 % (Lachema, Česká Republika)
Dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Penta, Česká Republika)
Ethylacetát (Kulich, Česká Republika)
Glukóza-6-fosfát (Sigma-Aldrich, Nemecko)
Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Roche, Švajčiarsko)
Glycerol 85 % (Kulich, Česká Republika)
Hexan (Merk, Nemecko)
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Penta, Česká Republika)
Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich, Nemecko)
Chloroform (Merk, Nemecko)
Kumachlór (Sigma-Aldrich, Nemecko)
Kyselina chlorovodíková 35 % (Penta, Česká Republika)
Kyselina sírová 96 % (Penta, Česká Republika)

Methanol (Lachema, Česká Republika)

Nikotinamidadeninindinukleotidfosfát (NADP⁺) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Warfarin (Toronto Reserch Chemicals, Kanada)

Warfarin-alkohol (Toronto Reserch Chemicals, Kanada)

5.3 Biologické vzorky

Enzýmy a subcelulárne frakcie boli pripravené na Katedre biochemických vied pred začatím tejto práce. Stručné metodiky prípravy sú uvedení nižšie.

Subcelulárne frakcie:

Cytosol $c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Mikrozómy $c = 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Vzorky tkaniva ľudskej pečene boli homogenizované. Homogenizát bol následne centrifugovaný (5 000 g, 20 min.), supernatant bol podrobený ďalšej centrifugácii (20 000 g po dobu 60 min.) a tretia centrifugácia (105 000 g, 60 min.) viedla k oddeleniu cytosolu a mikrozómov. Centrifugácie prebiehali pri teplote 4 °C. Cytosolická frakcia bola uskladnená pri teplote –80 °C, mikrozomálny sediment bol po vyčistení od zvyškov cytosolu resuspendovaný v 0,1 M Na-fosfátovom pufri (pH 7,4) s 20 % glycerolom a uskladnený rovnako pri –80 °C. Koncentrácia frakcií bola určená metódou kyseliny bicinchoninovej (BCA) (Skarydova, 2013).

Purifikované rekombinantné enzýmy:

AKR1A1 $c = 1,90 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1B1 $c = 1,63 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1B10 $c = 1,61 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1C1 $c = 1,84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1C2 $c = 1,96 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1C3 $c = 1,92 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

AKR1C4 $c = 1,77 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

CBR1 $c = 1,85 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

CBR3 $c = 1,85 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Ľudská cDNA pečňových buniek pre gény jednotlivých enzýmov bola amplifikovaná pomocou PCR. Fragmenty PCR boli naklonované do vektorov pET28b a následne prenesené do *E. coli* kmeňa HB101, kde bola sekvencia namnožená, kmeň BL21 (DE3) bol následne použitý na expresiu proteínov. Proteíny boli purifikované na princípe afinitnej chromatografie. Enzýmová aktivita bola zistená pomocou definovaných substrátov. Enzýmy boli uložené v 20 mM roztoku K-fosfátového pufru (pH 7,4) s 20 – 40 % glycerolom. Koncentrácia jednotlivých enzýmov bola určená metódou BCA (Skarydova 2013; Sambrook, 2012; Lundova 2011).

5.4 Príprava roztoku liečiva

Rozpustením kryštalického warfarinu v acetóne bol pripravený zásobný roztok s koncentráciou 50 mM. Nariedením tohto zásobného roztoku acetónom a 0,1 M Na-fosfátovým pufrom boli pripravené roztoky s nižšími koncentraciami, a tie boli neskôr pridávané do inkubačnej sústavy. Finálna koncentrácia acetónu v inkubačnej sústave bola 1,4%.

5.5 Inkubácia subcelulárnych frakcií a enzýmov s warfarinom

Regeneračný roztok (rozpis na 10 vzoriek):

- NADP⁺ 2 mg
- Glukóza-6-fosfát 6 mg
- 0,1 M MgCl₂ 100 µl
- 0,1 M Na-fosfátový pufr; pH 7,4 100 µl
- 35 j. glukóza-6-fosfátdehydrogenáza 5 µl

Inkubačná sústava (rozpis na 1 vzorku):

- subcelulárna frakcia/enzým 20 µl
- regeneračný systém 20 µl
- roztok warfarinu 10 µl
- 0,1 M Na-fosfátový pufr; pH 7,4 50 µl

Regeneračný roztok bol pripravený rozpustením zodpovedajúceho množstva glukóza-6-fosfátu a NADP⁺ v Na-fosfátovom pufrí a MgCl₂. Nakoniec bola pridaná glukóza-6-fosfátdehydrogenáza. Do mikroskúmaviek Eppendorf bolo k 50 µl Na-fosfátového pufru pridaných 20 µl regeneračného roztoku a 20 µl enzýmu, prípadne subcelulárnej frakcie. V inkubačnej sústave bolo vždy 100 µg subcelulárnej frakcie alebo 20 µg enzýmového proteínu. Do kontrolných vzoriek bolo namiesto enzýmu pridané rovnaké množstvo pufru. Takto pripravené vzorky boli preinkubované 5 minút pri teplote 37 °C v thermomixéri. Následne bolo do každej skúmavky pridaných 10 µl roztoku warfarinu. Celkový objem inkubačnej sústavy bol 100 µl. Po 30 minútach inkubácie bolo pridaných 40 µl 25 % amoniaku, čím bola enzymatická reakcia zastavená a vzorky boli uložené približne na 10 minút do ľadu. Do každej skúmavky bolo následne pridaných 1000 µl ethylacetátu a skúmavky boli vytrepávané na trepačke 15 minút. Vzorky boli centrifugované na 13 000 otáčkach 2 minúty, aby došlo k oddeleniu ethylacetátovej vrstvy, ktorá bola následne odobraná do nových mikroskúmaviek a odparená dosucha pri izbovej teplote vo vákuovej odparke.

5.6 UHPLC stanovenie metabolitov

Množstvo metabolitu vzniknutého metabolickou premenou warfarinu po inkubácii s enzýmami bolo detegované pomocou UHPLC prístroja Agilent 1290 Infinity. Vzorky boli pred analýzou rozpustené za pomoci ultrazvuku v 50 µl roztoku methanol + voda (1 : 1, v/v). Nástrek vzorky bol v objeme 1 µl. Bola použitá kolona Zorbax C18 Eclipse plus 2,1 × 50 mm, s veľkosťou póru 1,8 µm, pri teplote 30 °C a rýchlosti prietoku mobilnej fázy 0,65 ml/min.

Mobilná fáza: 10 mM octan amónny : methanol (v/v) v pomere uvedenom nižšie.

Gradient mobilnej fázy:

0 – 2,19 min:	70 : 30
2,2 – 3,19 min:	60 : 40
3,2 – 4,99 min:	50 : 50
5 – 7 min:	70 : 30

Na detekciu bol použitý fluorescenčný detektor pri vlnových dĺžkach excitácie/emisie 310 nm/390 nm. Retenčné časy vnútorného štandardu kumachlóru (CMC), warfarinu (WAR) a redukovaného warfarin-alkoholu (WAR-OL) boli stanovené na základe porovnania so štandardmi.

Warfarin-alkohol bol detegovaný ako 2 páry diastereoizomérov:

- warfarin-alkohol 1 (*RS/SR*-warfarin-alkohol),
- warfarin-alkohol 2 (*RR/SS*-warfarin-alkohol).

5.7 Test účinnosti extrakcie

Pracovné roztoky:

- 25 mM roztok warfarinu v acetóne a fosfátovom pufrí (1 : 1, v/v), z ktorého boli pripravené roztoky s koncentráciou 2 mM a 7 mM v 14 % acetóne
- warfarin-alkohol (100 µg/ml) v methanol + voda + 0,1 M Na-fosfátový pufer (5 : 5 : 90, v/v/v)
- kumachlór (200 µg/ml) v methanol + 0,1M Na-fosfátový pufer (1 : 9, v/v)
- AKR1C3

Inkubačná sústava bola pripravená podľa všeobecného postupu inkubácie popísanom v kapitole 5.5 s 20 µg AKR1C3. Nebol ale pridaný substrát a neprebíhala inkubácia, ale do sústavy bol hneď pridaný amoniak na inaktiváciu enzýmu. Následne bolo pridaných 10 µl roztoku warfarinu o koncentrácii 2 mM alebo 7 mM, aby finálna koncentrácia warfarinu v sústave bola 200 µM alebo 700 µM. Do každej vzorky bolo pridaných 5 µl roztoku warfarin-alkoholu (100 µg/ml) a 5 µl roztoku kumachlóru (200 µg/ml). Vzorky boli vytrepané jedenkrát alebo dvakrát 1 ml ethylacetátu. Ethylacetátová vrstva bola odparená pri izbovej teplote a látky boli analyzované pomocou UHPLC.

5.8 Optimalizácia extrakcie I.

Pracovné roztoky:

- warfarin (1000 µg/ml) v methanole
- warfarin-alkohol (100 µg/ml) v methanol + voda + 0,1 M Na-fosfátový pufer (5 : 5 : 90, v/v/v)
- kumachlór (200 µg/ml) v methanol + 0,1 M Na-fosfátový pufer (1 : 9, v/v)
- 8,5% roztok glycerolu v 0,1 M Na-fosfátovom pufri (v/v)

Inkubácia warfarinu prebiehala podľa podmienok popísaných v kapitole 5.5. Namiesto enzýmu bol pridaný 8,5 % glycerol v množstve 20 µl, aby bolo zloženie inkubačnej sústavy rovnaké ako pri bežnej inkubácii s enzýmom. Na zastavenie inkubácie bolo použitých vždy 40 µl jedného z činidiel (25 % NH₃, 1 M HCl, 1 M H₂SO₄). Následne bolo do sústavy pridaných 5 µl roztoku warfarinu (1000 µg/ml), 5 µl roztoku warfarin-alkoholu (0,1 mg/ml) a 5 µl roztoku kumachlóru (0,2 mg/ml). Na extrakciu bol použitý ethylacetát, chloroform alebo zmes hexanu a ethylacetátu (4 : 1, v/v) vždy v množstve 1000 µl (viď tabuľka 3). Po odparení boli extrahované látky analyzované pomocou UHPLC.

Tabuľka 3: Rozpis inaktivačných a extrakčných činidiel pre jednotlivé vzorky v teste k optimalizácii extrakcie I.

Vzorka	Zastavenie reakcie	Extrakčné činidlo
1A	NH ₃	ethylacetát
1B	NH ₃	hexan + ethylacetát (4 : 1)
1C	NH ₃	chloroform
2A	HCl	ethylacetát
2B	HCl	hexan + ethylacetát (4 : 1)
2C	HCl	chloroform
3A	H ₂ SO ₄	ethylacetát
3B	H ₂ SO ₄	hexan + ethylacetát (4 : 1)
3C	H ₂ SO ₄	chloroform

5.9 Optimalizácia extrakcie II.

Pracovné roztoky:

- warfarin (1000 µg/ml) v methanole
- warfarin-alkohol (1000 µg/ml) v 50 % methanole (v/v)
- warfarin-alkohol (100 µg/ml) v methanol + voda + 0,1 M Na-fosfátový pufer (5 : 5 : 90, v/v/v)
- kumachlór (200 µg/ml) v methanol + 0,1 M Na-fosfátový pufer (1 : 9, v/v)
- 8,5 % roztok glycerolu v 0,1 M Na-fosfátovom puffri (v/v)

V tomto teste bola pripravená inkubačná sústava rovnako ako v postupe 5.5. Namiesto enzýmu bol pridaný 8,5 % roztok glycerolu vo fosfátovom puffri. Následne bolo pridaných 40 µl 1 M H₂SO₄ a roztoky analyzovaných látok: 5 µl roztoku kumachlóru (200 µg/ml), 5 µl alebo 10 µl roztoku warfarinu (1000 µg/ml) a 5 µl roztoku warfarin-alkoholu (100 µg/ml) alebo 5 µl roztoku warfarin-alkoholu (1000 µg/ml), u ktorých bola zisťovaná extrakčná účinnosť (viď tabuľka 4). Na extrakciu bolo použitých buď 1000 µl hexanu, 2 × 800 µl hexanu alebo 2 × 800 µl zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1, v/v).

Tabuľka 4: Rozpis látok pridávaných do jednotlivých vzoriek v teste k optimalizácii extrakcie II.

Extračné činidlo	Extrakčný objem (µl)	Pridané látky (µg)		
		CMC	WAR	WAR-OL
Hexan	1000	1	5	0,5
Hexan	1000	1	10	5
Hexan	2 × 800	1	5	0,5
Hexan	2 × 800	1	10	5
Hexan + ethylacetát	2 × 800	1	5	0,5
Hexan + ethylacetát	2 × 800	1	10	5

CMC = kumachlór

WAR = warfarin

WAR-OL = warfarin-alkohol

5.10 Test účinnosti extrakcie warfarin-alkoholu v porovnaní s kumachlórom

Pracovné roztoky:

- warfarin-alkohol (1000 µg/ml) v 50 % methanole
- warfarin-alkohol (100 µg/ml) v methanol + voda + 0,1 M Na-fosfátový pufer (5 : 5 : 90, v/v/v)
- kumachlór (200 µg/ml) v methanol + 0,1 M Na-fosfátový pufer (1 : 9, v/v)

V tomto teste bola pripravená inkubačná sústava so 100 µg cytosolu alebo s 20 µg AKR1C3. Do reakcie nebol pridaný warfarin, ale po 30 minútach inkubácie bolo do každej vzorky pridaných 40 µl 1M H₂SO₄ a následne 5 µl roztoku kumachlóru (200 µg/ml) a 5 µl roztoku warfarin-alkoholu (100 µg/ml) alebo 2,5 µl roztoku warfarin-alkoholu (1000 µg/ml). Celkom boli teda pripravené 4 druhy vzoriek. Po extrakcii do zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1) a odparení boli vzorky analyzované pomocou UHPLC.

5.11 Test väzby na proteíny

Pracovné roztoky:

- warfarin-alkohol (0,5 µg/ml) v 14 % acetóne
- warfarin-alkohol (50 µg/ml) v 14 % acetóne

Inkubačná sústava v tomto teste bola pripravená podľa postupu 5.5. V skúšobných vzorkách bol použitý enzým AKR1C2, kontrolné vzorky obsahovali zodpovedajúce množstvo pufru. Regeneračný systém neobsahoval NADP⁺ ani glukózu-6-fosfát. Do inkubačnej sústavy bolo pridaných 10 µl roztoku warfarin-alkoholu (0,5 µg/ml alebo 50 µg/ml), čo zodpovedalo množstvu 5 ng alebo 500 ng. Vzorky boli inkubované 30 min. pri teplote 37 °C a následne bolo pridané jedno z činidiel na zastavenie reakcie: 40 µl H₂SO₄, 50 µl acetonitrilu alebo 40 µl NH₃. Vzorky boli extrahované do zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1, v/v).

5.12 Screening enzýmův

Pracovné roztoky:

- warfarin (2 mM) v 14 % acetóne a 0,1 M Na-fosfátovom pufri
- warfarin (7 mM) v 14 % acetóne a 0,1 M Na-fosfátovom pufri

Warfarin bol inkubovaný so 100 μg subcelulárnej frakcie cytosolu alebo mikrozómov alebo s 20 μg enzýmův AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, AKR1B1, AKR1B10, AKR1A1, CBR1 a CBR3. Kontrolné vzorky obsahovali namiesto enzýmu 20 μl pufri. Koncentrácia warfarinu v inkubačnej sústave bola 200 μM alebo 700 μM . Pripravené boli vždy 4 paralelné vzorky. Inkubácia prebiehala podľa postupu v podkapitole 5.5, zastavená 40 μl NH_3 . Vzorky boli extrahované do 1000 μl ethylacetátu. Pri HPLC analýze bol nástrek vzorky 1 μl .

5.13 Stanovenie kinetiky redukcie warfarinu

Zo zásobného acetónového roztoku warfarinu s koncentráciou 50 mM boli pripravené roztoky s koncentraciami 0,75 – 7 mM nariedením 28 % roztokom acetónu a 0,1 M Na-fosfátovým pufrom tak, aby bol vo všetkých roztokoch warfarinu zachovaný obsah acetónu 14 %. Finálny obsah acetónu v inkubačnej sústave bol 1,4 %. Inkubácia prebiehala podľa popisu uvedeného v podkapitole 5.5. Koncentrácia warfarinu v jednotlivých vzorkách bola 75 – 700 μM (Tabuľka 5) Na zastavenie enzymatickej reakcie bolo použitých 40 μl 1 M H_2SO_4 . Metabolity boli extrahované 1000 μl zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1, v/v) a po odparení boli vzorky analyzované pomocou UHPLC. Kinetické parametre boli zistené v programe Graph Pad Prism 6.0. Tvorba warfarin-alkoholu bola vyhodnotená s použitím kinetiky Michaelis-Mentenovej. Enzymatická aktivita bola vyjadrená ako špecifická aktivita, ktorá predstavuje pmol vytvoreného warfarin-alkoholu na 1 mg proteínu za 1 minútu. Vnútná clearance (CL_{int}) vyjadruje účinnosť enzýmu a bola vypočítaná ako pomer V_{max} a K_m ($\text{CL}_{\text{int}} = V_{\text{max}}/K_m$). Pre každý enzým boli vykonané 3 – 4 paralelné stanovenia, výsledky boli vyjadrené ako priemer týchto stanovení \pm smerodajná odchýlka.

Tabuľka 5: Koncentrácie warfarínu v inkubačnej sústave.

Koncentrácia WAR (μM)	
Screening enzýmov	Kinetika
200	75
700	150
	200
	300
	500
	700

6 VÝSLEDKY

6.1 Test účinnosti extrakcie

Do inkubačnej sústavy bez enzýmu (ten bol nahradený pufrom) bol pridaný warfarin, warfarin-alkohol a vnútorný štandard kumachlór. Reakcia bola zastavená pridaním NH_3 . Bola zisťovaná účinnosť extrakcie týchto látok pri jednonásobnej a dvojnásobnej extrakcii 1000 μl ethylacetátu, a to porovnaním extrahovaného množstva s množstvom pridaným do sústavy (Tabuľka 6).

Tabuľka 6: Účinnosť extrakcie warfarinu, warfarin-alkoholu a kumachlóru.

Extrakcia ethylacet.	Pridané množstvo (ng/nástrek)			Detegované množstvo (ng/nástrek)			Extrakčná účinnosť (%)		
	WAR	WAR-OL	CMC	WAR	WAR-OL	CMC	WAR	WAR-OL	CMC
1×1000 μl	123	10	20	19,73	1,43	16,55	16,0	14,3	82,8
2×1000 μl	123	10	20	45,10	3,58	20,89	36,7	35,8	104,4
1×1000 μl	432	10	20	62,64	1,51	14,36	14,5	15,1	71,8
2×1000 μl	432	10	20	156,63	3,18	20,85	36,3	31,8	104,3

WAR = warfarin

WAR-OL = warfarin-alkohol

CMC = kumachlór

Účinnosť extrakcie warfarinu i warfarin-alkoholu bola nízka. Pri jednonásobnej extrakcii sa extrahovalo len 14 – 15 % warfarin-alkoholu a pri dvojnásobnej extrakcii 32 – 36 %. Podobne nízka účinnosť extrakcie bola aj u samotného warfarinu. Kumachlór vykazoval vyššiu extrakčnú účinnosť, ktorá bola pri jednonásobnej extrakcii 72 – 83 % a pri dvojnásobnej extrakcii 104 %.

6.2 Optimalizácia extrakcie I.

V tomto teste bola zisťovaná schopnosť extrakcie daných látok z inkubačnej sústavy pri rôznych podmienkach s cieľom nájsť také podmienky, pri ktorých by bola extrakčná účinnosť čo najvyššia, a to predovšetkým pre redukovaný metabolit warfarin-alkohol. Na zastavenie enzymatickej premeny bolo použité vždy jedno z činidiel: 25 % NH₃, 1 M HCl, 1 M H₂SO₄. Ako extrakčné činidlo bol použitý ethylacetát, roztok hexanu a ethylacetátu (4 : 1, v/v) alebo chloroform. Účinnosť extrakcie pri jednotlivých postupoch je zaznamenaná v Tabuľka 7.

Tabuľka 7: Účinnosť extrakcie jednotlivých látok za použitia daných inaktivačných a extrakčných činidiel.

Činidlo na zastavenie reakcie	Extrakčné činidlo	Účinnosť extrakcie (%)		
		CMC	WAR	WAR-OL
NH ₃	ethylacetát	74,7	18,0	6,7
NH ₃	hexan + ethylacetát	0,8	0,1	0,0
NH ₃	chloroform	0,0	0,1	0,0
HCl	ethylacetát	105,0	78,4	52,7
HCl	hexan + ethylacetát	105,2	78,4	70,7
HCl	chloroform	0,6	0,3	0,4
H ₂ SO ₄	ethylacetát	102,6	77,2	47,0
H ₂ SO ₄	hexan + ethylacetát	105,4	78,7	71,6
H ₂ SO ₄	chloroform	0,5	0,3	0,3

Pri použití chloroformu nedošlo takmer k žiadnej extrakcii ani jednej z analyzovaných látok, a to nezávisle na činidle použitom na zastavenie enzymatickej reakcie.

Pri použití NH₃ a extrakcii do zmesi hexanu a ethylacetátu bola extrakcia veľmi nízka (kumachlór 0,8 %) alebo nulová. Do ethylacetátu boli extrahované všetky analyzované látky, ale účinnosť extrakcie nebola dostatočná (kumachlór 74,7 %, warfarin 18,0 %, warfarin-alkohol 6,7 %).

Najvyššia extrakčná účinnosť u všetkých analyzovaných látok bola pri použití HCl alebo H₂SO₄, a to pri extrakcii do ethylacetátu i do zmesi hexanu a ethylacetátu. Pri použití HCl sa do ethylacetátu extrahovalo 105 % kumachlóru a 78,4 % warfarinu,

a do zmesi hexanu a ethylacetátu 105,2 % kumachlóru a 78,4 % warfarinu. Pri použití H_2SO_4 sa do ethylacetátu extrahovalo 102,6 % kumachlóru a 77,2 % warfarinu, a do zmesi hexanu a ethylacetátu 105,4 % kumachlóru a 78,7 % warfarinu. Účinnosť extrakcie pre kumachlór a warfarin bola teda v týchto 4 postupoch približne rovnaká. Účinnosť extrakcie warfarin-alkoholu sa líšila v závislosti od použitého extrakčného činidla. Pri použití HCl a extrakcii do ethylacetátu bola účinnosť extrakcie 52,7 %, no pri extrakcii do zmesi hexanu a ethylacetátu sa zvýšila na 70,7 %. Podobne aj pri použití H_2SO_4 sa do ethylacetátu extrahovalo 47 % warfarin-alkoholu a do zmesi hexanu a ethylacetátu 71,6 %.

Na základe týchto výsledkov sa najvhodnejšie k ďalšej práci javila kombinácia HCl alebo H_2SO_4 a zmesi hexanu a ethylacetát (4 : 1), kde bola extrakčná účinnosť všetkých látok najvyššia.

6.3 Optimalizácia extrakcie II.

Bola zisťovaná účinnosť extrakcie pri použití samotného hexanu a tiež rozdiel účinnosti jednonásobnej a dvojnásobnej extrakcie. Neprebíhala inkubácia, ale hneď bolo do inkubačnej sústavy pridaných 40 μ l H_2SO_4 . Následne bola vykonaná jednonásobná extrakcia 1000 μ l hexanu, prípadne dvojnásobná extrakcia vždy 800 μ l hexanu alebo zmesi hexanu a ethylacetátu (Tabuľka 8).

Tabuľka 8: Účinnosť extrakcie jednotlivých analyzovaných látok za použitia daných extrakčných podmienok.

Extrakčné činidlo	Extrakčný objem (μ l)	Pridané množstvo (ng/nástrek)			Extrakčná účinnosť (%)		
		CMC	WAR	WAR-OL	CMC	WAR	WAR-OL
Hexan	1000	1	5	0,5	113,0	66,1	40,3
Hexan	1000	1	10	5	101,5	56,9	34,9
Hexan	2 \times 800	1	5	0,5	118,9	72,5	47,7
Hexan	2 \times 800	1	10	5	111,0	66,8	48,3
Hexan + ethylacetát	2 \times 800	1	5	0,5	117,2	72,8	58,4
Hexan + ethylacetát	2 \times 800	1	10	5	118,6	72,1	58,8

Pri použití samotného hexanu nebola dosiahnutá vyššia extrakčná účinnosť analyzovaných látok ako pri použití extrakčnej zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1). Dvojnásobná extrakcia bola síce účinnejšia, ale hodnoty nedosahovali predchádzajúcich výsledkov (viď podkapitola 6.2). Dvojnásobná extrakcia roztokom hexanu a ethylacetátu tiež nepriniesla výrazné rozdiely, účinnosť extrakcie warfarinu bola 72,8 % a warfarin-alkoholu 58,4 %, a teda v porovnaní s jednonásobnou extrakciou roztokom hexanu a ethylacetátu bola dokonca o niečo nižšie.

Na základe predchádzajúcich výsledkov bola k analýze kinetiky enzýmov zvolená H₂SO₄ na zastavenie enzymatickej reakcie a extrakcia do 1000 µl zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1). Účinnosť extrakcie warfarin-alkoholu nebola optimálna, ale žiadna účinnejšia metóda extrakcie nebola nájdená. Množstvo extrahovaného warfarin-alkoholu bolo ale dostatočné pre zistenie aktivít enzýmov a subcelulárnych frakcií.

6.4 Test väzby warfarin-alkoholu na proteíny

V tomto teste bol do inkubačnej sústavy pridaný warfarin-alkohol v množstve 5 ng alebo 500 ng a bola sledovaná jeho extrakčná účinnosť. Bola porovnávaná extrakcia z inkubačnej sústavy obsahujúcej enzým AKR1C2 s extrakciou z kontrolných vzoriek bez obsahu proteínu, so snahou zistiť, či nedochádza k väzbe warfarin-alkoholu na prítomné proteíny, čo by sa prejavilo znížením jeho extrahovaného a následne detegovaného množstva. Extrahované množstvo warfarin-alkoholu bolo detegované pomocou UHPLC a porovnané s množstvom pridaným do reakčnej sústavy (viď Tabuľka 9).

Tabuľka 9: Extrakčná účinnosť warfarin-alkoholu z inkubačnej sústavy s enzýmom a zo vzoriek bez obsahu proteínu.

Vzorka	Pridaný WAR-OL (ng/inkubáciu)	Detegované (ng/inkubáciu)		Extrakčná účinnosť WAR-OL (%)
		WAR-OL 1	WAR-OL 2	
AKR1C2	5	1,47	1,49	59,1
AKR1C2	500	22,53	22,16	8,9
Kontrola	5	1,60	1,64	64,8
Kontrola	500	22,56	22,64	9,0

U vzoriek, kde bolo pridaných 5 ng warfarin-alkoholu, bola zistená extrakčná účinnosť 59,1 % (64,8 % u kontrolných vzoriek) a u vzoriek s 500 ng pridaného warfarin-alkoholu 8,9 % (9,0 % u kontrolných vzoriek).

6.5 Účinnosti extrakcie warfarin-alkoholu v porovnaní s kumachlórom

Bola pripravená inkubačná sústava so 100 µg cytosolu alebo 20 µg AKR1C3. Do vzoriek bol pridaný roztok warfarin-alkoholu v množstve zodpovedajúcom 5 ng alebo 25 ng warfarin-alkoholu a 1 µg kumachlóru. Následne bola pridaná H₂SO₄ a vzorky extrahované do zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1).

Tabuľka 10: Extrakčná účinnosť warfarin-alkoholu a kumachlóru zo vzoriek s cytosolom alebo AKR1C3.

Frakcia/enzým	Pridané množstvo (ng)		Účinnosť extrakcie (%)	
	WAR-OL	CMC	WAR-OL	CMC
Cytosol	5	10	53,6	100,1
Cytosol	25	10	64,0	101,1
AKR1C3	5	10	65,2	100,1
AKR1C3	25	10	64,0	99,1

Kumachlór ako vnútorný štandard sa prakticky kompletne extrahoval (viď Tabuľka 10). Extrakčná účinnosť warfarin-alkoholu zo vzoriek s cytosolom bola 54 % pri nižšej koncentrácii pridaného warfarin-alkoholu a 64 % pri vyššej koncentrácii, účinnosť extrakcie warfarin-alkoholu zo vzoriek s AKR1C3 bola 64 % pri nižšej koncentrácii a 65 % pri vyššej koncentrácii.

6.6 Screening enzýmův

Rekombinantné enzýmy AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1, CBR3 a subcelulárne frakcie cytosolu a mikrozómov boli inkubované s warfarinom podľa postupu 5.12. Reakcia bola ukončená NH_3 a vzorky boli extrahované do ethylacetátu, pretože tento experiment bol uskutočnený pred optimalizáciou extrakcie. Od každého enzýmu boli pripravené 4 paralelné vzorky. Dve vzorky boli použité na vývin UHPLC analytickej metódy a dve vzorky na samotnú analýzu. Pomocou UHPLC bolo detegované množstvo vzniknutého warfarin-alkoholu. Z dvoch paraleliiek bol vypočítaný priemer a po odčítaní hodnoty kontroly bolo získaná hodnota množstva vzniknutého warfarin-alkoholu 1 a warfarin-alkoholu 2 v inkubačnom objeme. Z tejto hodnoty bola následne vypočítaná špecifická aktivita (Tabuľka 11). Prípadné záporné hodnoty vzniknuté po odpočítaní hodnôt kontroly boli nahradené nulou.

Tabuľka 11: Špecifická aktivita jednotlivých enzýmov/enzýmových frakcií.

Enzým/frakcia	Koncentrácia pridaného WAR (μM)	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
		WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
Cytosol	200	8,38	1,02	9,40
Cytosol	700	10,61	0,86	11,47
Mikrozómy	200	2,20	0,67	2,87
Mikrozómy	700	3,09	0,86	3,95
AKR1A1	200	0,00	0,00	0,00
AKR1A1	700	0,00	0,00	0,00
AKR1B1	200	12,22	2,15	14,37
AKR1B1	700	17,59	1,07	18,66
AKR1B10	200	0,00	0,00	0,00
AKR1B10	700	0,00	0,00	0,00
AKR1C1	200	37,19	1,34	38,53
AKR1C1	700	45,51	0,00	45,51
AKR1C2	200	35,44	1,61	37,06
AKR1C2	700	20,14	0,13	20,27
AKR1C3	200	1 749,29	145,41	1 894,70
AKR1C3	700	2 599,84	138,02	2 737,86
AKR1C4	200	0,00	3,89	3,89
AKR1C4	700	0,00	2,42	2,42
CBR1	200	0,00	4,70	4,70
CBR1	700	0,00	0,40	0,40
CBR3	200	0,00	3,76	3,76
CBR3	700	0,00	0,00	0,00

Viacere enzýmy vykazovali aktivitu pri inkubácii s warfarinom. Najvyššia aktivita v tvorbe warfarin-alkoholu 1 zo skúšaných enzýmov bola zistená u AKR1C3 so špecifickou aktivitou 1 749,29 pmol/min/mg pri nižšej koncentrácii substrátu (200 μM) a 2 599,84 pmol/min/mg pri vyššej koncentrácii (700 μM). Aktivitu vykazovali tiež enzýmy AKR1C1 (37,19 pmol/min/mg pri nižšej koncentrácii substrátu a 45,51 pmol/min/mg pri vyššej koncentrácii) a AKR1C2 (35,44 pmol/min/mg pri nižšej koncentrácii substrátu a 20,14 pmol/min/mg pri vyššej), ďalej enzýmovú aktivitu vykazovala cytosolická a mikrozomálna frakcia a AKR1B1.

Pri premene warfarinu na warfarin-alkohol 2 bola zistená najvyššia tvorba tohto metabolitu u enzýmu AKR1C3 so špecifickou aktivitou 141,51 pmol/min/mg pri nižšej koncentrácii substrátu a 135,60 pmol/min/mg pri vyššej koncentrácii. Ďalej vykazovali

aktivitu v tvorbe warfarin-alkoholu, aj keď zreteľne nižšiu, enzýmy AKR1C4, AKR1C1, AKR1C2, AKR1B1, CBR1, CBR3 a cytosolická a mikrozosomálna frakcia.

U enzýmov AKR1A1 a AKR1B10 nebola zaznamenaná tvorba warfarin-alkoholu.

6.7 Screening enzýmov II.

Enzýmy AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4, CBR1, CBR3, ktoré boli pri prvom screeningu aktívne, ale pri kinetickej analýze neprejavovali aktivitu, boli testované pri upravených podmienkach. Koncentrácia substrátu bola zvýšená z 700 μM na 1000 μM a nástrek pri UHPLC analýze bol zvýšený z 1 μl na 5 μl .

Spomedzi testovaných enzýmov najvyššiu produkciu warfarin-alkoholu vykazoval enzým CBR1, so špecifickou aktivitou 15,13 pmol/min/mg (Tabuľka 12). Aktivity ostatných enzýmov boli nízke, prípadne takmer nulové.

Tabuľka 12: Špecifická aktivita enzýmov pri koncentrácii warfarinu 1000 μM .

Enzým	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
	WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
AKR1B1	0,00	0,38	0,38
AKR1C1	1,88	0,81	2,69
AKR1C2	0,37	0,90	1,27
AKR1C4	0,14	0,66	0,81
CBR1	5,73	9,40	15,13
CBR3	0,00	0,36	0,36

6.8 Stanovenie kinetiky redukcie warfarinu

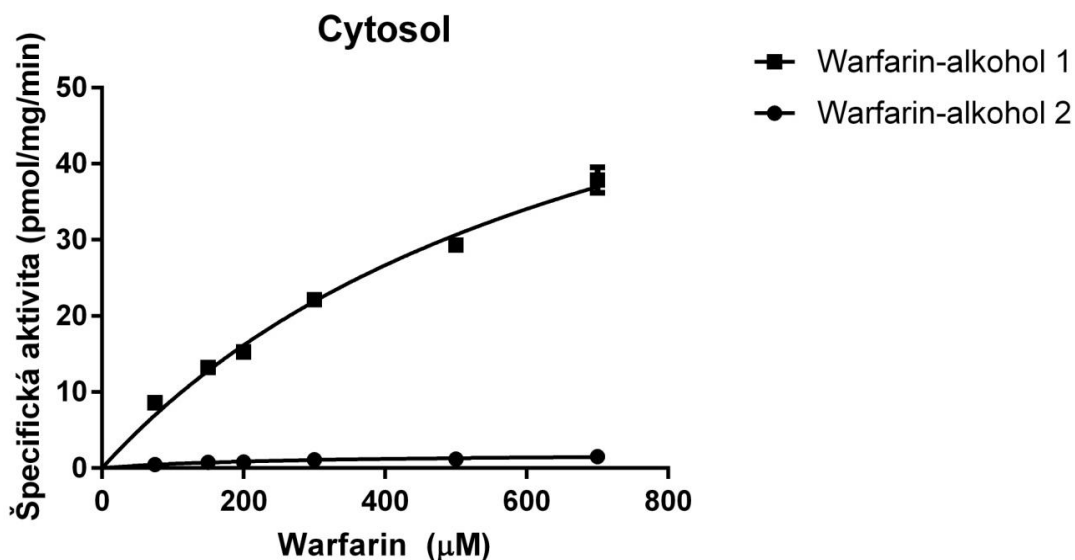
6.8.1 Subcelulárne frakcie

Bola uskutočnená inkubácia 100 μg cytosolických alebo mikrozomálnych proteínov s warfarinom o koncentráciách 75 – 700 μM . Z detegovaného množstva vzniknutého warfarin-alkoholu bola vypočítaná špecifická aktivita a následne bola zostrojená kinetická krivka v programe Graph Pad Prism 6.0.

V Tabuľke 13 sú uvedené špecifické aktivity cytosolickej frakcie pri jednotlivých koncentráciách warfarinu a na Obrázku 9 je zobrazený graf kinetiky produkcie warfarin-alkoholu.

Tabuľka 13: Špecifická aktivita cytosolickej frakcie v závislosti na koncentrácii substrátu.

Koncentrácia warfarinu (μM)	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
	WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
75	8,59	0,50	9,09
150	13,23	0,79	14,02
200	15,27	0,81	16,08
300	22,14	1,11	23,25
500	29,32	1,20	30,52
700	37,86	1,54	39,40



Obrázok 9: Graf kinetiky cytosolickej frakcie vyjadrujúci závislosť špecifickej aktivity cytosolu na koncentrácii warfarinu.

Tabuľka 14: Kinetické parametre cytosolickej frakcie.

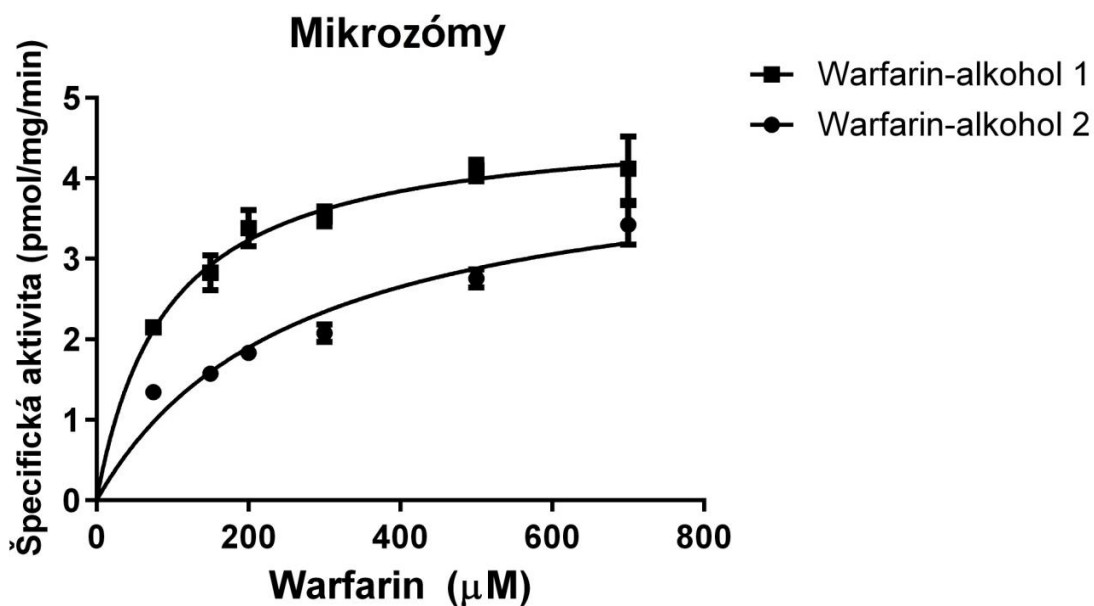
Kinetické parametre	WAR-OL 1	WAL-OL 2
V_{\max} (pmol/mg/min)	$76,38 \pm 5,948$	$1,97 \pm 0,169$
K_m (µM)	$746 \pm 93,41$	$247,3 \pm 50,78$
CL_{int} (µl/mg/min)	0,102	0,008
R^2	0,9842	0,8837

Ako znázorňuje Tabuľka 14, cytosolická frakcia vykazovala vyššiu aktivitu v tvorbe warfarin-alkoholu 1 ($V_{\max} = 76,38 \pm 5,948$ pmol/mg/min), tvorba warfarin-alkoholu 2 bola omnoho nižšia ($V_{\max} = 1,97 \pm 0,169$ pmol/mg/min). Vypočítaná hodnota vnútornej clearance tiež ukazovala výrazne vyšší podiel cytosolickej frakcie na tvorbe warfarin-alkoholu 1 než warfarin-alkoholu 2 (0,102 µl/mg/min pre WAR-OL 1 v porovnaní s 0,008 µl/mg/min pre WAR-OL 2).

V Tabuľke 15 sú uvedené špecifické aktivity mikrozomálnej frakcie pri jednotlivých koncentráciách warfarinu a na Obrázku 10 je zobrazený graf kinetiky produkcie warfarin-alkoholu.

Tabuľka 15: Špecifická aktivita mikrozomálnej frakcie v závislosti na koncentrácii substrátu.

Koncentrácia warfarinu (μM)	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
	WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
75	2,15	1,09	3,24
150	2,83	1,32	4,15
200	3,38	1,58	4,96
300	3,22	1,83	5,05
500	4,10	2,06	6,16
700	4,12	2,72	6,84



Obrázok 10: Graf kinetiky mikrozómnej frakcie vyjadrujúci závislosť špecifickej aktivity mikrozómov na koncentrácii warfarinu.

Tabuľka 16: Kinetické parametre mikrozosomálnej frakcie.

Kinetické parametre	WAR-OL 1	WAL-OL 2
V_{\max} (pmol/mg/min)	$4,73 \pm 0,153$	$4,40 \pm 0,377$
K_M (μM)	$92,71 \pm 11,29$	$264,30 \pm 53,53$
CL_{int} ($\mu\text{l/mg/min}$)	0,051	0,016
R^2	0,9262	0,889

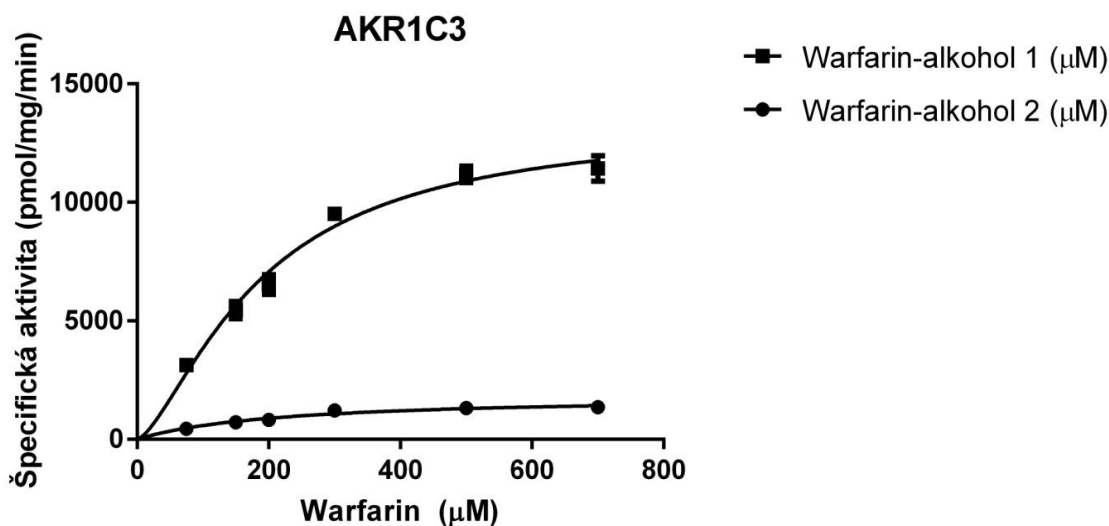
Ako vidno v Tabuľke 16, mikrozosomálna frakcia vykazovala preferenciu k tvorbe warfarin-alkoholu 1 ($V_{\max} = 4,73 \pm 0,153$ pmol/mg/min), tvorba warfarin-alkoholu 2 bola o niečo nižšia ($V_{\max} = 4,40 \pm 0,377$ pmol/mg/min). Vnútoraná clearance mikrozosomálnej frakcie pre tvorbu warfarin-alkoholu 1 bola 0,051 $\mu\text{l/mg/min}$, teda dvakrát nižšia v porovnaní s clearance cytosolu (0,102 $\mu\text{l/mg/min}$).

6.8.2 AKR1C3

Bola uskutočnená inkubácia 20 μg enzýmu AKR1C3 s warfarinom o koncentráciách 75 – 700 μM . V Tabuľke 17 sú uvedené špecifické aktivity AKR1C3 pri jednotlivých koncentráciách warfarinu a na Obrázku 11 je zobrazený graf kinetiky produkcie warfarin-alkoholu.

Tabuľka 17: Špecifická aktivita AKR1C3 v závislosti na koncentrácii warfarinu.

Koncentrácia warfarinu (μM)	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
	WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
75	3 135,18	448,07	3 583,26
150	5 457,72	723,58	6 181,30
200	6 525,55	817,38	7 342,93
300	9 517,79	1 223,39	10 741,18
500	11 179,67	1 322,56	12 502,24
700	11 430,56	1 349,60	12 780,16



Obrázok 11: Graf kinetiky AKR1C3 vyjadrujúci závislosť špecifickej aktivity enzýmu na koncentrácii warfarinu.

Tabuľka 18: Kinetické parametre AKR1C3.

Kinetické parametre	WAR-OL 1	WAL-OL 2
V_{\max} (pmol/mg/min)	17 136 ± 39,3	1 870 ± 118,5
K_M (μM)	297,2 ± 39,3	221,9 ± 35,16
CL_{int} (μl/mg/min)	57,66	8,43
R^2	0,961	0,930

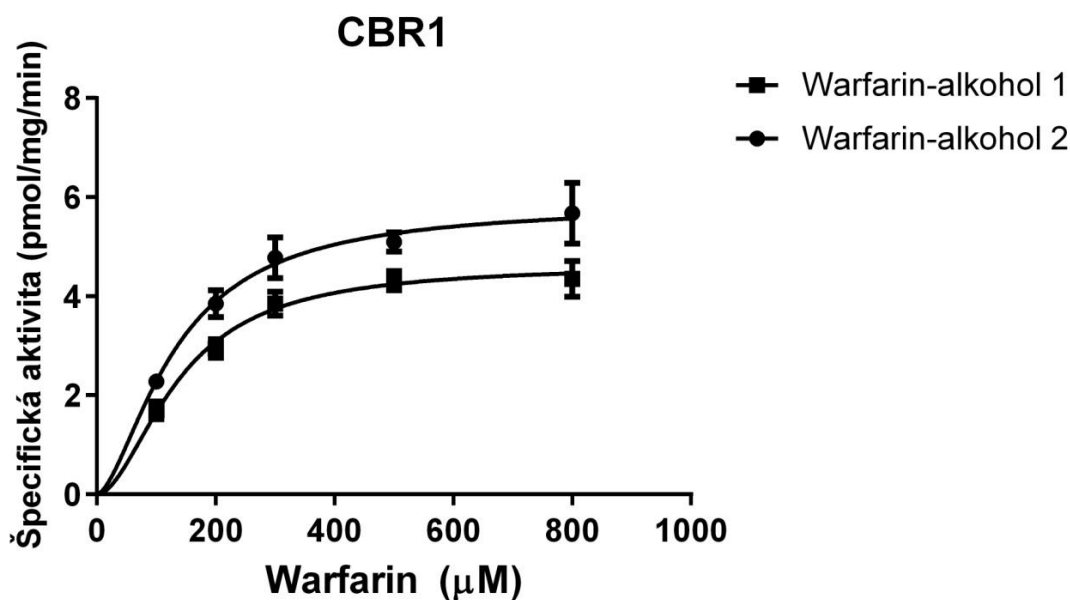
Z Tabuľka 18 vidno, že AKR1C3 vykazoval veľmi vysokú aktivitu v tvorbe warfarin-alkoholu 1 ($V_{\max} = 17\,136 \pm 39,3$ pmol/mg/min). Aktivita v tvorbe warfarin-alkoholu 2 bola niekoľkokrát nižšia ($V_{\max} = 1\,870 \pm 118,5$ pmol/mg/min). Vypočítaná hodnota vnútornej clearance tiež ukazovala vyšší podiel AKR1C3 na tvorbe warfarin-alkoholu 1 než warfarin-alkoholu 2 ($CL_{\text{int}} = 57,66$ μl/mg/min pre WAR-OL 1 v porovnaní s 8,43 μl/mg/min pre WAR-OL 2).

6.8.3 CBR1

Bola uskutočnená inkubácia 20 μg enzýmu CBR1 s warfarinom o koncentráciách 100 – 800 μM . V Tabuľke 19 sú uvedené špecifické aktivity CBR1 pri jednotlivých koncentráciách warfarinu a na Obrázku 12 je zobrazený graf kinetiky produkcie warfarin-alkoholu.

Tabuľka 19: Špecifická aktivita CBR1 v závislosti na koncentrácii warfarinu.

Koncentrácia warfarinu (μM)	Špecifická aktivita (pmol/min/mg)		
	WAR-OL 1	WAR-OL 2	WAR-OL 1+2
100	1,70	2,28	3,97
200	2,94	3,85	6,79
300	3,85	4,78	8,63
500	4,32	5,10	9,41
800	4,35	5,68	10,03



Obrázok 12: Graf kinetiky CBR1 vyjadrujúci závislosť špecifickej aktivity enzýmu na koncentrácii warfarinu.

Tabuľka 20: Kinetické parametre CBR1.

Kinetické parametre	WAR-OL 1	WAL-OL 2
V_{\max} (pmol/mg/min)	$5,786 \pm 0,339$	$7,055 \pm 0,376$
K_M (μM)	$191,8 \pm 31,25$	$175,7 \pm 27,04$
CL_{int} ($\mu\text{l/mg/min}$)	0,03	0,04
R^2	0,907	0,908

Z Tabuľka 20 vidno, že CBR1 vykazovala preferenciu v tvorbe warfarin-alkoholu 2 ($V_{\max} = 7,055 \pm 0,376$ pmol/mg/min), aktivita v tvorbe warfarin-alkoholu 1 bola o niečo nižšia ($V_{\max} = 5,786 \pm 0,339$ pmol/mg/min). Vypočítaná hodnota vnútornej clearance tiež ukazovala vyšší podiel CBR1 na tvorbe warfarin-alkoholu 2 než warfarin-alkoholu 1 ($CL_{\text{int}} = 0,04$ $\mu\text{l/mg/min}$ pre WAR-OL 2 v porovnaní s $0,03$ $\mu\text{l/mg/min}$ pre WAR-OL 1).

6.9 Redukčná aktivita subcelulárnych frakcií a enzýmov k warfarinu

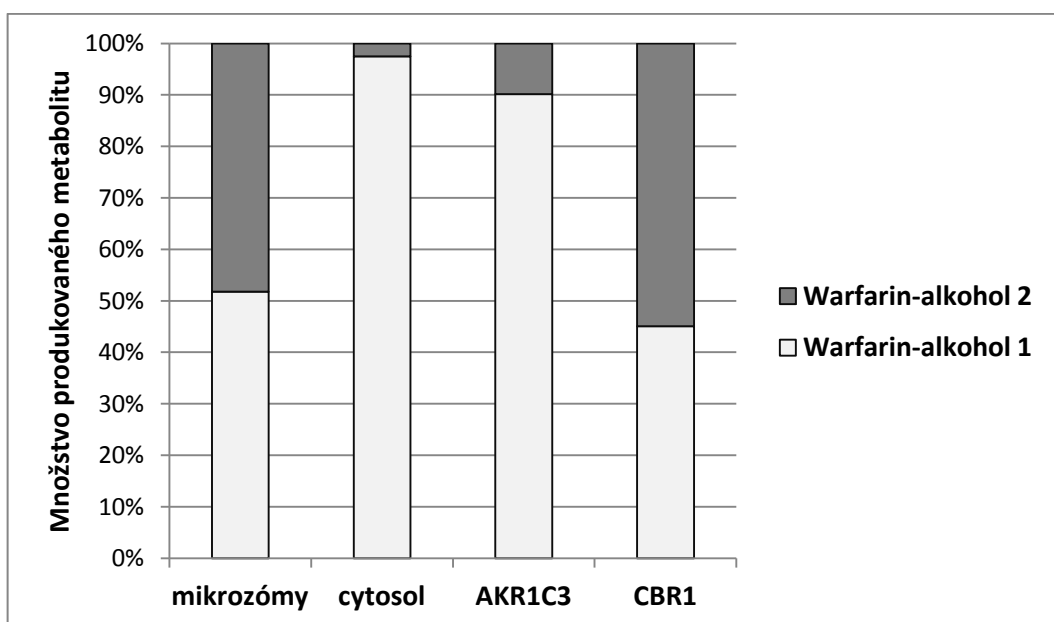
Tabuľka 21: Účinnosť jednotlivých frakcií/enzýmov v tvorbe warfarin-alkoholu 1 a warfarin-alkoholu 2 vyjadrená pomocou vnútornej clearance.

Frakcia/enzým	CL _{int} (µl/mg/min)	
	WAR-OL 1	WAR-OL 2
Mikrozómy	0,051	0,016
Cytosol	0,102	0,008
AKR1C3	57,66	8,43
CBR1	0,03	0,04

Tabuľka 21 zobrazuje vnútornú clearance mikrozómov, cytosolu, AKR1C3 a CBR1, ktorá vyjadruje účinnosť týchto frakcií/enzýmov v produkcii warfarin-alkoholu. Cytosol vykazoval dvakrát vyššiu účinnosť v produkcii warfarin-alkoholu v porovnaní s mikrozómami. V tvorbe warfarin-alkoholu bol najviac účinný enzým AKR1C3, druhým najúčinnnejším enzýmom bola CBR1.

Tabuľka 22: Podiel produkcie warfarin-alkoholu 1 a warfarin-alkoholu 2 u jednotlivých frakcií/enzýmov.

Frakcia/enzým	Množstvo produkovaného metabolitu (%)	
	WAR-OL 1	WAR-OL 2
Mikrozómy	51,8	48,2
Cytosol	97,5	2,5
AKR1C3	90,2	9,8
CBR1	45,1	54,9



Obrázok 13: Graf zobrazujúci podiel produkcie warfarin-alkoholu 1 a warfarin-alkoholu 2 jednotlivými subcelulárnymi frakciami/enzýmami.

Jednotlivé subcelulárne frakcie a enzýmy vykazovali odlišné preferencie k tvorbe warfarin-alkoholu 1 či warfarin-alkoholu 2 (vid' Tabuľka 22 a následne Obrázok 13). Cytosol a AKR1C3 vykazovali výraznú preferenciu pre tvorbu warfarin-alkoholu 1 (cytosol 97,5 %; AKR1C3 90,2 %). Tvorba warfarin-alkoholu 2 bola niekoľkokrát nižšia (cytosol 2,5 %; AKR1C3 9,8 %). Mikrozómy vykazovali miernu preferenciu pre tvorbu warfarin-alkoholu 1 (51,8 %) v porovnaní s tvorbou warfarin-alkoholu 2 (48,2 %). CBR1 naopak vykazovala preferenciu pre tvorbu warfarin-alkoholu 2 (54,9 %) v porovnaní s warfarin-alkoholom 1 (45,1 %).

7 DISKUSIA

Redukciou karbonylovej skupiny v molekule warfarinu vzniká warfarin-alkohol. Chirálné centrum v molekule warfarinu podmieňuje existenciu 2 stereoizomérov. Redukciou karbonylovej skupiny na alkoholickú vzniká ďalšie centrum chiralítity a teda z racemickej zmesi warfarinu môžu vzniknúť 4 stereoizoméry. V tejto práci boli detegované produkty redučného metabolizmu ako 2 páry diastereoizomérov: warfarin-alkohol 1 (*RS/SR*-warfarin-alkohol) a warfarin-alkohol 2 (*RR/SS*-warfarin-alkohol).

Prvý screening, pri ktorom boli subcelulárne frakcie a jednotlivé enzýmy inkubované s warfarinom o dvoch koncentráciách (200 a 700 μM), ukázal produkciu warfarin-alkoholu u cytosolickej a mikrozomálnej frakcie a u enzýmov AKR1B1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, CBR1 a CBR3. Najvyššia produkcia redukovaného metabolitu bola zaznamenaná u AKR1C3 so špecifickou aktivitou 2 599,84 pmol/mg/min pre tvorbu warfarin-alkoholu 1 a 138,02 pmol/mg/min pre tvorbu warfarin-alkoholu 2 pri koncentrácii warfarinu 700 μM . Enzýmy AKR1A1 a AKR1B10 nevykazovali produkciu warfarin-alkoholu. U enzýmov CBR1 a CBR3 vykazujúcich nízku aktivitu sa dá polemizovať nad správnosťou výsledkov, pretože v kontrolných vzorkách k týmto inkubáciám nebol detegovaný warfarin-alkohol a teda enzýmy po odpočítaní nulovej kontroly vykazovali nízku aktivitu. Avšak množstvo warfarin-alkoholu detegované v inkubačnej sústave s týmito enzýmami bolo porovnateľné s množstvom detegovaným v kontrolných vzorkách v iných inkubáciách.

Množstvo warfarin-alkoholu detegované po inkubáciách s jednotlivými enzýmami v screeningovom experimente ale nezodpovedalo skutočnému množstvu, ktoré vzniklo enzymatickou premenou. V teste extrakčnej účinnosti bolo zistené, že pri podmienkach screeningového experimentu, teda pri použití NH_3 na zastavenie enzymatickej reakcie a extrakcii do 1000 μl ethylacetátu, sa extrahovalo len 14 – 15 % warfarin-alkoholu. Bolo preto potrebné nájsť optimálnejšie podmienky, pri ktorých by bolo z reakcie získané také množstvo warfarin-alkoholu, ktoré by čo najviac zodpovedalo skutočnému množstvu vzniknutému enzymatickou premenou.

Činidlo použité k zastaveniu enzymatickej reakcie mohlo ovplyvňovať ionizáciu warfarin-alkoholu a teda i jeho extrakciu. Preto boli okrem bázičného NH_3 testované i kyseliny H_2SO_4 a HCl . Použitím kyselín k zastaveniu enzymatickej reakcie naozaj

došlo k zvýšeniu extrakcie všetkých analyzovaných látok, a to nezávisle na použitom extrakčnom činidle. Vyššia extrakčná účinnosť pri použití kyselín sa dá vysvetliť acidobazickými vlastnosťami warfarinu a warfarin-alkoholu. Obe látky sú slabými kyselinami, v kyslom prostredí je potlačená ich ionizácia a neionizované molekuly tak ochotnejšie prechádzajú do organickej fázy, teda do extrakčného činidla.

Ďalším cieľom bola optimalizácia extrakčného činidla. Testovaná bola teda účinnosť extrakcie nielen do ethylacetátu, ale i do chloroformu a do zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1). Chloroform sa ukázal ako nevhodný, analyzované látky sa vôbec neextrahovali, prípadne bola extrakcia veľmi nízka. Účinnosť extrakcie warfarinu a kumachlóru bola približne rovnaká pri extrakcii ethylacetátom i pri extrakcii zmesou hexanu a ethylacetátu a to nezávisle na činidle použitom na zastavenie enzymatickej reakcie. Rozdiel v účinnosti týchto extrakčných činidiel bol práve u warfarin-alkoholu. Kombinácia hexanu a ethylacetátu vykazovala omnoho vyššiu extrakčnú účinnosť pre warfarin-alkohol (71 – 72 %) v porovnaní so samotným ethylacetátom (približne 50 %). Nakoľko sa prídavkom hexanu zvýšila extrakčná účinnosť v porovnaní so samotným ethylacetátom, bola ďalej zisťovaná účinnosť samotného hexanu. Použitím samotného hexanu sa ale nezvýšila účinnosť extrakcie warfarin-alkoholu, naopak došlo k miernemu poklesu. Rovnako ani dvojnásobná extrakcia do zmesi hexanu a ethylacetátu nepriniesla zvýšenie extrakcie v porovnaní s jednonásobnou extrakciou.

Na základe predchádzajúcich výsledkov bola k ďalším inkubácia zvolená kombinácia H_2SO_4 na zastavenie enzymatickej reakcie a extrakcia do 1000 μ l zmesi hexanu a ethylacetátu (4 : 1), kedy bola dosiahnutá extrakčnú účinnosť 71,6 % u warfarin-alkoholu, 78,7 % u warfarinu a 105,4 % u kumachlóru. Extrakčná účinnosť nebola dokonalá, ale nebol nájdený účinnejší spôsob a pre kinetickú analýzu bola táto účinnosť dostatočná.

Kumachlór, ako látka štruktúrne blízka warfarinu a warfarin-alkoholu, mal byť použitý ako vnútorný štandard charakterizujúci proces získavania warfarin-alkoholu z inkubačnej sústavy. Pri optimalizovaných podmienkach extrakcie sa kumachlór kompletne extrahoval, u warfarin-alkoholu ale nebola dosiahnutá kompletná extrakcia a preto kumachlór nemohol byť použitý ako vnútorný štandard.

V ďalšom teste bola snaha zistiť, či nedochádza k väzbe vzniknutého warfarin-alkoholu na proteíny prítomné v inkubačnej sústave, čím by sa znížilo množstvo extrahovaného a následne detegovaného warfarin-alkoholu. Množstvo

warfarin-alkoholu extrahovaného z inkubačnej sústavy sa výrazne nelíšilo od množstva extrahovaného z kontrolných vzoriek bez obsahu proteínu. Dá sa teda predpokladať, že počas inkubácie za používaných podmienok nedochádzalo k väzbe warfarin-alkoholu na prítomné proteíny.

Kinetická analýza bola zhotovená u subcelulárnych frakcií cytosolu a mikrozómov a u aktívnych enzýmov AKR1C3 a CBR1. U niektorých enzýmov, ktoré boli pri screeningovom testovaní aktívne, bola kinetika raz (AKR1C4) alebo dvakrát (AKR1C1, AKR1C2, AKR1B1) zopakovaná, ale ani po zopakovaní nebol v reakčnej sústave detegovaný warfarin-alkohol, prípadne bolo množstvo na hranici detekcie. Preto bol vykonaný druhý screening za použitia vyšších koncentrácií warfarinu a pri vyššom nástreku pri UHPLC. Bola pri ňom potvrdená aktivita enzýmov zaznamenaná už pri prvom screeningu, táto aktivita bola ale u väčšiny takto testovaných enzýmov veľmi nízka. Enzýmy AKR1A1 a AKR1B10 neboli aktívne v produkcii warfarin-alkoholu už pri prvom screeningovom teste a preto neboli ďalej skúmané.

V tejto práci bola potvrdená aktivita cytosolickej i mikrozomálnej frakcie v produkcii warfarin-alkoholu. Katalýzou cytosolickej frakcie vznikal prednostne warfarin-alkohol 1, produkcia warfarin-alkoholu 2 bola omnoho nižšia. Mikrozomálna frakcia vykazovala tiež vyššiu aktivitu v produkcii warfarin-alkoholu 1. Aktivita cytosolu bola v porovnaní s mikrozómami približne dvakrát vyššia. Výsledky teda korešponujú s prácou Hermansa a Thijssena, ktorí už v roku 1989 zaznamenali aktivitu cytosolickej a mikrozomálnej frakcie v redukcii warfarinu, kedy obidve subcelulárne frakcie vykazovali preferenciu v produkcii warfarin-alkoholu 1, a aktivita cytosolu výrazne prevyšovala aktivitu mikrozómov.

Najvyššia tvorba warfarin-alkoholu zo všetkých testovaných enzýmov bola zaznamenaná u AKR1C3. Tento enzým vykazoval, rovnako ako i cytosolická a mikrozomálna frakcia, preferenciu k tvorbe warfarin-alkoholu 1 s kinetickými parametrami $V_{\max} = 17\,136 \pm 39,3$ pmol/mg/min a $K_m = 297,2 \pm 39,3$ μ M. Produkcia warfarin-alkoholu 2 bola niekoľkokrát nižšia, $V_{\max} = 1\,870 \pm 118,5$ pmol/mg/min a $K_m = 221,9 \pm 35,16$ μ M.

U CBR1 boli v kinetickej analýze použité vyššie koncentrácie warfarinu, než u ostatných enzýmov a subcelulárnych frakcií, a to 100 – 800 μ M. Špecifická aktivita CBR1 bola značne nižšia v porovnaní s AKR1C3. Na rozdiel od subcelulárnych frakcií a AKR1C3 bol u CBR1 preferenčne tvorený warfarin-alkohol 2 s kinetickými

parametry $V_{\max} = 7,055 \pm 0,376$ pmol/mg/min a $K_m = 175,7 \pm 27,04$ μ M, aktivita v tvorbe warfarin-alkoholu 1 bola o niečo nižšia.

V *in vitro* stanovení bola vnútorná clearance AKR1C3 pre tvorbu warfarin-alkoholu mnohonásobne vyššia v porovnaní s clearance CBR1. Navyše keď uvážime expresiu proteínu, ktorá je o niečo vyššia pre AKR1C3 (Bains, 2010), zdá sa, že funkcia AKR1C3 v redukcii warfarinu bude dôležitá aj *in vivo*.

Cytosol, mikrozómy a enzým AKR1C3 vykazovali väčšiu aktivitu v tvorbe warfarin-alkoholu 1, teda (*R,S*)- a/alebo (*S,R*)-warfarin-alkoholu, než v tvorbe warfarin-alkoholu 2, teda (*S,S*)- a/alebo (*R,R*)-warfarin-alkoholu. Predbežné výsledky štúdie chirálnej redukcie warfarinu realizované na Katedre biochemických vied ukazujú, že cytosol i AKR1C3 tvoria predovšetkým (*S,R*)-warfarin-alkohol. Podľa publikovaných informácií je v plazme pacientov hlavným redukčným metabolitom (*S,R*)-warfarin-alkohol (maximálna koncentrácia 860 ng/ml), nasledovaný (*S,S*)-warfarin-alkoholom (maximálna koncentrácia 130 ng/ml); enantioméry (*R,S*)- a (*R,R*)-warfarin-alkoholu dosahujú nízkych koncentrácií (Chan, 1972). Preferenčná tvorba warfarin-alkoholu 1 pozorovaná v tejto práci teda zodpovedá podmienkam *in vivo*.

Podiel produkovaného warfarin-alkoholu 1 cytosolickou frakciou bol 97,5 %. U enzýmu AKR1C3 bol podiel produkovaného warfarin-alkoholu 1 90,2 %, teda o niečo nižší. Je preto pravdepodobné, že na redukcii warfarinu sa podieľajú aj ďalšie enzýmy, zrejme z podrodiny AKR1C, u ktorých bola v screeningovom teste zaznamenaná nízka aktivita, a tieto enzýmy svojou aktivitou dopĺňujú cytosolickú produkciu warfarin-alkoholu 1.

Hermans a Thijssen v roku 1993 identifikovali inhibítory cytosolickej redukcie warfarinu, a to kvercetín, indometacín, furosemid a prostaglandín E₂. Na základe týchto inhibítorov sa odhaduje, že cytosolický enzým redukujúci warfarin patrí do nadrodiny SDR alebo do rodiny AKR1. V tejto práci boli identifikované reductázy AKR1C3 a CBR1 (člen nadrodiny SDR), ktoré spĺňajú tento predpoklad.

AKR1C3 i CBR1 sú cytosolické enzýmy, a vzhľadom na to, že cytosol vykazoval vyššiu redukčnú aktivitu ako mikrozómy, môžu byť AKR1C3 a CBR1 považované za hlavné enzýmy zodpovedné za redukcii warfarinu v ľudskom organizme. Pretože táto informácia doposiaľ nebola publikovaná, výsledky tejto práce výrazne prispievajú k pochopeniu redukčného metabolizmu warfarinu.

8 ZÁVER

V rámci tejto práce boli optimalizované podmienky extrakcie. Bola zistená extrakčná účinnosť pre warfarin-alkohol a tiež pre warfarin a kumachlór. Ďalej bolo overené, že nedochádza k nežiaducej väzbe vzniknutého warfarin-alkoholu na proteíny prítomné v inkubačnej sústave. Optimalizované podmienky boli použité k identifikácii enzýmov redukujúcich warfarin a k stanoveniu kinetických parametrov týchto reakcií.

Cytosol vykazoval vyššiu aktivitu v porovnaní s mikrozómami, preto boli testované cytosolické karbonyl-redukujúce enzýmy. V redukcii warfarinu boli identifikované najaktívnejšie enzýmy AKR1C3 a CBR1. AKR1C3 patrí do nadrodiny AKR a CBR1 patrí naopak do nadrodiny SDR.

Subcelulárne frakcie cytosolu i mikrozómov vykazujú preferenciu k tvorbe warfarin-alkoholu 1 v porovnaní s tvorbou warfarin-alkoholu 2. Rovnako aj u enzýmu AKR1C3 bola zaznamenaná vyššia produkcia warfarin-alkoholu 1. CBR1 naopak vykazoval vyššiu aktivitu v produkcii warfarin-alkoholu 2.

Podarilo sa identifikovať hlavné enzýmy podieľajúce sa na redukcii warfarinu, boli stanovené ich kinetické parametre a tiež boli stanovené kinetické parametre cytosolu a mikrozómov ľudských pečenejých buniek. Týmto bola dokončená prvotná štúdia zaoberajúca sa redukcii warfarinu karbonyl-redukujúcimi enzýmami.

V súčasnosti sa pracuje na chirálnej analýze redukcii warfarinu so snahou detailnejšie pochopiť redukcii warfarinu v ľudskom organizme. Aj keď redukcii nie je hlavnou metabolickou cestou warfarinu, predsalen ovplyvňuje antikoagulačnú liečbu, a preto je nevyhnutné jej porozumieť.

9 ZOZNAM SKRATIEK

AKR	aldo-ketoreduktáza
CBR	karbonylreduktáza
CL _{int}	vnútorná clearance
CMC	kumachlór
CNS	centrálny nervový systém
CYP450	cytochrom P450
E. coli	Escherichia coli
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PAH	polycyklické aromatické uhľovodíky
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová reťazová reakcia
SDR	short chain dehydrogene/reductase, krátkoreťazcová dehydrogenáza/reduktáza
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography, ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
VKORC1	vitamín K epoxidreduktázový komplex
WAR	warfarin
WAR-OL	warfarin-alkohol
5 α -DHT	5 α -dihydrotestosterón

10 LITERATÚRA

- AHMED, N. K., R. L. FELSTED a N. R. BACHUR. Daunorubicin reduction mediated by aldehyde and ketone reductases. *Xenobiotica*. 1981, vol. 11, issue 2, s. 131–136. ISSN 0049-8254.
- ANSELL, Jack, Jack HIRSH a Elain HYLEK. Pharmacology and Management of the Vitamin K Antagonists. *Chest*. 2008, vol. 133, issue 6, s. 160–198. ISSN 0012-3692.
- BAINS, O. S., T. A. GRIGLIATTI, R. E. REID a K. W. RIGGS. Naturally Occurring Variants of Human Aldo-Keto Reductases with Reduced In Vitro Metabolism of Daunorubicin and Doxorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2010, vol. 335, issue 3, s. 533–545. ISSN 0022-3565.
- BARSKI, Oleg A., Srinivas M. TIPPARAJU a Aruni BHATNAGAR. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 2008, vol. 40, issue 4, s. 553–624. ISSN 0360-2532.
- BARSKI, Oleg A. Developmental expression and function of aldehyde reductase in proximal tubules of the kidney. *AJP: Renal Physiology*. 2005, vol. 289, issue 1, s. 200–207. ISSN 0363-6127.
- Biocatalytic synthesis [online]. © 2014 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: http://borgc185.kfunigraz.ac.at/images/research/scheme_adh.gif
- BRESSON, Eva et al. The Human Aldose Reductase AKR1B1 Qualifies as the Primary Prostaglandin F Synthase in the Endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011, vol. 96, issue 1, s. 210–219. ISSN 0021-972.
- BOHREN, KM et al. The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *Journal of biological chemistry*. 1989, vol. 264, issue 16, s. 9547–9551. ISSN 0021-9258.
- BURTON, Michael E. et al. *Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. 3. vyd. Philadelphia: Lippinkott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 07-818-4431-8.
- DOSTÁLEK, Miroslav. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 219 s. ISBN 8024714647.

- FUKUMOTO, S. Overexpression of the Aldo-Keto Reductase Family Protein AKR1B10 Is Highly Correlated with Smoker's Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2005, vol. 11, issue 5, s. 1776–1785. ISSN 1776-1785.
- FORREST, Gerald L. a Basilio GONZALEZ. Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*. 2000, vol. 129, issue 1–2, s. 21–40. ISSN 00092797.
- Grishin Lab [online]. © 2008 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://prodata.swmed.edu/SCR/pictures/d1gpja2.png>
- HERMANS, J.J.R. a H.H.W. THIJSEN. The in vitro ketone reduction of warfarin and analogues. *Biochemical Pharmacology*. 1989, vol. 38, issue 19, s. 3365–3370. ISSN 0006-2952.
- HERMANS, J.J.R. a H.H.W. THIJSEN. Stereoselective acetyl side chain reduction of warfarin and analogs. Partial characterization of two cytosolic carbonyl reductases. *Drug metabolism and disposition*. 1992, vol. 20, issue 2, s. 268–74. ISSN 0090-9556.
- HERMANS, J.J.R., H.H.W. THIJSEN, S. CHOLERTON, A. M. BRECKENRIDGE a B. K. PARK. Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *British Journal of Pharmacology*. 1993, vol. 110, issue 1, s. 482–490. ISSN 0006-2952.
- HEWICK, D.S. a T.A. MORELAND. An NADPH dependent warfarin reductase in human and rat liver and kidney soluble fraction. *British journal of pharmacology*. 1975, vol. 53, issue 3. s. 441. ISSN 0006-2952.
- HOFFMANN, Frank a Edmund MASER. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 2007, vol. 39, issue 1, s. 87–144. ISSN 0360-2532.
- CHAN, Kenneth K. et al. Absolute configurations of the four warfarin alcohols: Use of a combined pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1972, vol. 15, issue 12, s. 1265–1270. ISSN 0009-9236.
- CHANG, Qing, Theresa M HARTER, Loryn T RIKIMARU a J.Mark PETRASH. Aldo-keto reductases as modulators of stress response. *Chemico-Biological Interactions*. 2003, vol. 143 – 144, s. 325–332. ISSN 0009-2797.

- CHEN, Mo, Trevor M. PENNING, S CHOLERTON, AM BRECKENRIDGE a BK PARK. 5 β -Reduced steroids and human Δ 4-3-ketosteroid 5 β -reductase (AKR1D1). *Steroids*. 2014, vol. 83, issue 6, s. 17–26. ISSN 0039-128x.
- CHOONARA, IA, BP HAYNES, S CHOLERTON, J.Mark BRECKENRIDGE a BK PARK. Enantiomers of warfarin and vitamin K1 metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1986, vol. 22, issue 6, s. 17–26. ISSN 0039-128x.
- IDAV: Institute for data and analysis [online]. (c) 1999 – 2015 [cit. 2015-04-16].
Dostupné z:
<http://idav.ucdavis.edu/~okreylos/ResDev/ProtoShop/BetaBarrelCartoons.png>
- JANSING, R L. Phase II metabolism of warfarin in primary culture of adult rat hepatocytes. *Molecular pharmacology*. 1992, vol. 41, issue 1, s. 209–15. ISSN 0026-895X.
- JEZ, J. M. et al. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical journal*. 1997, vol. 326, issue 3, s. 625–636. ISSN 0264-6021.
- JOHNSON, Julie A. a Larisa H. CAVALLARI. Warfarin pharmacogenetics. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2014, vol. 25, issue 1, s. 33–41. ISSN 1050-1738.
- JONES, Drew R a Grover P MILLER. Assays and applications in warfarin metabolism: what we know, how we know it and what we need to know. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2011, vol. 7, issue 7, s. 857–874. ISSN 17425255.
- KAMINSKY, Laurence S. a Zhi-Yi ZHANG. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997, vol. 73, issue 1, s. 67–74. ISSN 0163-7258.
- KAVANAGH, K. L., H. JÖRNVALL, B. PERSSON a U. OPPERMANN. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, vol. 65, issue 24, s. 3895–3906. ISSN 1420-9071.
- LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny: učebnice pro lékařské fakulty*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 269 s. ISBN 978-802-4614-144.
- LUNDOVÁ, Tereza. Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1. Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- MALÁTKOVÁ, Petra, Edmund MASER a Vladimír WSOL. Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*. 2010, vol. 11, issue 8, s. 639–658. ISSN 1389-2002.

- MALÁTKOVÁ, Petra, Bettina EBERT, Vladimír WSÓL a Edmund MASER. Expression of human carbonyl reductase 3 (CBR3; SDR21C2) is inducible by pro-inflammatory stimuli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, vol. 420, issue 2, s. 368 – 373. ISSN 0006-291x.
- MALÁTKOVÁ, Petra a Vladimír WSÓL. Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*. 2014, vol. 46, issue 1, s. 96–123. ISSN 0360-2532.
- MATSUNAGA, Toshiyuki, Shinichi SHINTANI a Akira HARA. Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2006, vol. 21, issue 1, s. 1–8. ISSN 1347-4367.
- MILLER, Grover P. et al. Assessing Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase Contributions to Warfarin Metabolism in Humans. *Chemical Research in Toxicology*. 2009, vol. 22, issue 7, s. 1239–1245. ISSN 0893-228x.
- MIURA, Takeshi, Toru NISHINAKA a Tomoyuki TERADA. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008, vol. 315, 1–2, s. 113–121. ISSN 0300-8177.
- OMIM [online]. © 1966 – 2015 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://www.omim.org/entry/103880>
- OPPERMANN, Udo. Carbonyl Reductases: The Complex Relationships of Mammalian Carbonyl- and Quinone-Reducing Enzymes and Their Role in Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007, vol. 47, issue 1, s. 293–322. ISSN 0362-1642.
- PENNING, Trevor M. et al. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochemical Journal*. 2000, vol. 351, issue 1, s. 67–75. ISSN 0264-6021.
- PENNING, Trevor. Human aldo–keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007, vol. 464, issue 2, 241–250. ISSN 0003-9861.
- PENNING, Trevor M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 2014a, vol. 234, s. 236–246. ISSN 0009-2797.

- PENNING, Trevor M., Mo CHEN a Yi JIN. Promiscuity and diversity in 3-ketosteroid reductases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014b. ISSN 0960-0760.
- PhosphoSitePlus [online]. ©2003-2013 [cit. 2015-03-21]. Dostupné z:<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=9371&showAllSites=true>
- RAMANA, K. V. Aldose Reductase Mediates Mitogenic Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, vol. 277, issue 35, s. 32063–32070. ISSN 0021-9258.
- RETTIE, Allan E. et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450C9 in the etiology of (*S*)-warfarin-drug interactions. *Chemical Research in Toxicology*. 1992, vol. 5, issue 1, s. 54–59. ISSN 0893-228x.
- RIS, Margret M. a Jean-Pierre WARTBURG. Heterogeneity of NADPH-Dependent Aldehyde Reductase from Human and Rat Brain. *European Journal of Biochemistry*. 1973, vol. 37, issue 1, s. 69–77. ISSN 0014-2956.
- RITTER, Joseph K. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chemico-Biological Interactions*. 2000, vol. 129, issue 1-2, s. 171–193. ISSN 0009-2797.
- RÍŽNER, Tea Lanišnik. Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2012, vol. 3, issue 34. ISSN 1663-9812.
- RÍŽNER, Tea Lanišnik a Trevor M. PENNING. Role of aldo–keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids*. 2014, vol. 79, s. 49–63. ISSN 0039128x.
- RUIZ, F. Xavier et al. Aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily: Retinoid specificity and control of cellular retinoic acid levels. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, vol. 178, 1 – 3, s. 171–177. ISSN 0009-2797.
- RUSSELL, David W. a Kenneth D. R. SETCHELL. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*. 1992, vol. 31, issue 20, s. 4737–4749. ISSN 0006-2960.
- SAMBROOK, Joseph a Michael R. GREEN. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4. vyd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. ISBN 978-1-936113-42-2.
- SAWADA, Hideo a Akira HARA. The presence of two NADPH-linked aromatic aldehyde-ketone reductases different from aldehyde reductase in rabbit liver. *Biochemical Pharmacology*. 1979, vol. 28, issue 7, s. 1089–1094. ISSN 0006-2952.

- SCONCE, E. A. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005, vol. 106, issue 7, s. 2329–2333. ISSN 0006-4971.
- ŠKARYDOVÁ, Lucie, Vladimír WSÓL a Hans JÖRNVALL. Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, vol. 44, issue 2, s. 359–364. ISSN 0360-2532.
- ŠKARYDOVÁ, Lucie, Milan NOBILIS a Vladimír WSÓL. Role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone in vitro. *Xenobiotica*. 2013, vol. 43, issue 4, s. 346–354. ISSN 0049-8254.
- THORN, Caroline. PharmGKB [online]. ©2001-2015 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/views/pathway/PA145011113.pdf>
- TOON, S. The warfarin-sulfinpyrazone interaction: stereochemical considerations. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 1986, vol. 39, issue 1, s. 15–24. ISSN 0009-9236.
- Toronto Research Chemicals [online]. © 2014 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://www.trc-canada.com/Structures/H996145.png>
- UETRECHT, Jack P a William TRAGER. *Drug metabolism: chemical and enzymatic aspects*. New York: Informa Healthcare, 2007, 181 s. ISBN 14-200-6103-8.
- VEGA, M. Evolutionary markers in the (β/α)₈-barrel fold. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003, vol. 7, issue 6, s. 694–701. ISSN 1367-5931.
- Warfarin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2006 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7e/Warfarin.svg>
- WatCut [online]. 14.04.2014 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/metabolismOverview.html>
- WERMUTH, B. Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *Journal of biological chemistry*. 1981, vol. 256, issue 3, s. 1206–1213. ISSN 0021-9258.
- WERMUTH, B. Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *Journal of biological chemistry*. 1988, vol. 263, issue 31, s. 16185–16188. ISSN 0021-9258.

- WIRTH, H a B WERMUTH. Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry*. 1992, vol. 40, issue 12, s. 1857–63. ISSN 0022-1554.
- ZIELINSKA, A., et al. Glucuronidation of Monohydroxylated Warfarin Metabolites by Human Liver Microsomes and Human Recombinant UDP-Glucuronosyltransferases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, vol. 324, issue 1, s. 139–148. ISSN 0022-3565.
- ZELINSKI, Thomas, Jörg PETERS a Maria-Regina KULA. Purification and characterization of a novel carbonyl reductase isolated from *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of Biotechnology*. 1994, vol. 33, issue 3, s. 283–292. ISSN 0168-1656.
- ZHANG, Z. Human cytochromes P4501A1 and P4501A2: R-warfarin metabolism as a probe. *Drug metabolism and disposition*. 1995, vol. 23, issue 12, s. 1339–1346. ISSN 0090-9556.