

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Tomáš Plucha

Školitel: RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.

Název diplomové práce: HPLC metoda pro stanovení testosteronu a její využití v charakterizaci karbonylreduktas

Karcinom prostaty patří mezi nádory závislé na hormonech, proliferace nádorově transformovaných buněk je závislá na aktivaci androgenního receptoru testosteronem. Terapii založenou na snížení koncentrace testosteronu do značné míry komplikuje produkce androgenů přímo v buňkách prostaty. Bylo prokázáno, že se na produkci androgenů se mimo jiných podílí také enzymy redukující karbonylové sloučeniny, především aldo-ketoreduktáza 1C3 (AKR1C3). Cílem práce bylo zavést HPLC metodu pro stanovení testosteronu a s jejím využitím zmapovat schopnost enzymů redukujících karbonylové sloučeniny katalyzovat *in vitro* reakci, při které vzniká aktivní androgen testosteron z neaktivního prekursoru androstendionu.

Vzorky enzymů byly inkubovány v prostředí androstendionu $c = 20-120 \mu\text{mol/l}$, po ukončení inkubace byly extrahovány pomocí etylacetátu. Ke stanovení vzniklého testosteronu byla použita HPLC analýza (kolona BDS Hypersil C₁₈, 5 μm , 250 \times 4,6 mm, mobilní fáze metanol:voda, 70:30, detekce: DAD při 240 nm). Testovali jsme lidské jaterní subcelulární frakce, vybrané rekombinantně připravené purifikované cytosolické enzymy a také membránově vázané enzymy ve formě Sf9 mikrosomální frakce obohacené o daný enzym.

Redukční aktivitu vůči androstendionu se nám podařilo prokázat u cytosolu, mikrosomů a také u řady enzymů (AKR1C1-AK1C4, AKR1B1, AKR1B10, CBR1, RoDH4, 17 β -HSD7). U subcelulárních frakcí a enzymů z nadrodiny AKR jsme stanovili také kinetické parametry pro redukci androstendionu. Nejvyšší V_{max} vyjádřenou jako specifickou aktivitu měla AKR1C3, nejnižší AKR1C4. Nejvyšší afinitu k substrátu měla AKR1C3, nejnižší AKR1B1.