

MIKROBIÁLNE PRODUKOVANÉ INHIBÍTORE HYDROLÁZ A ICH TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL

EVA BUCHTOVÁ a MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
eva.buchtova@gmail.com

Došlo 22.2.12, prijaté 10.5.12.

Kľúčové slová: inhibítory hydroláz, sekundárne metabolity, mikrobiálna produkcia

Obsah

1. Úvod
2. Inhibítory glykozidáz
 - 2.1. Inhibítory α - a β -glukozidázy
 - 2.2. Inhibítory α -amylázy
 - 2.3. Inhibítory neuraminidázy
3. Inhibítory peptidáz
 - 3.1. Inhibítory aminopeptidáz
 - 3.2. Inhibítory karboxypeptidáz
 - 3.3. Inhibítory serínových a cysteínových peptidáz
 - 3.4. Inhibítory aspartátových peptidáz
 - 3.5. Inhibítory metalopeptidáz
4. Inhibítory adenozyndeaminázy
5. Záver

1. Úvod

Prírodné zdroje poskytujú nevyčerpatelne možnosti v objavovaní nových látok, ktoré majú potenciál byť použité v klinickej praxi ako liečivá^{1,2}. Mikroorganizmy, ako producenti sekundárnych metabolitov, ktoré sú známe svojím užitočným uplatnením v medicíne, hygiene, veterinárstve a farmaceutickom priemysle, tvoria skupinu významných biologických systémov s možnosťou efektívnej syntézy farmakoterapeutík s antibiotickými, protizápalovými, protinádorovými a antifungálnymi aktivitami. Jednou z dôležitých aplikácií sekundárnych metabolitov v medicíne a výskume je aj ich schopnosť inhibovať enzýmové aktivity. Patofyziologické aktivity hydroláz zahŕňajú rozsiahle spektrum porúch a chorôb, nakoľko do tejto skupiny enzýmov patria početné podskupiny ako napríklad peptidázy a glykozidázy. Inhibítory týchto enzýmov majú významné miesto v klinickej praxi v liečbe a prevencii mnohých chorôb, pretože vykazujú imunomodulačné, protizápalové, protinádorové, protivírusové a anti-diabetické

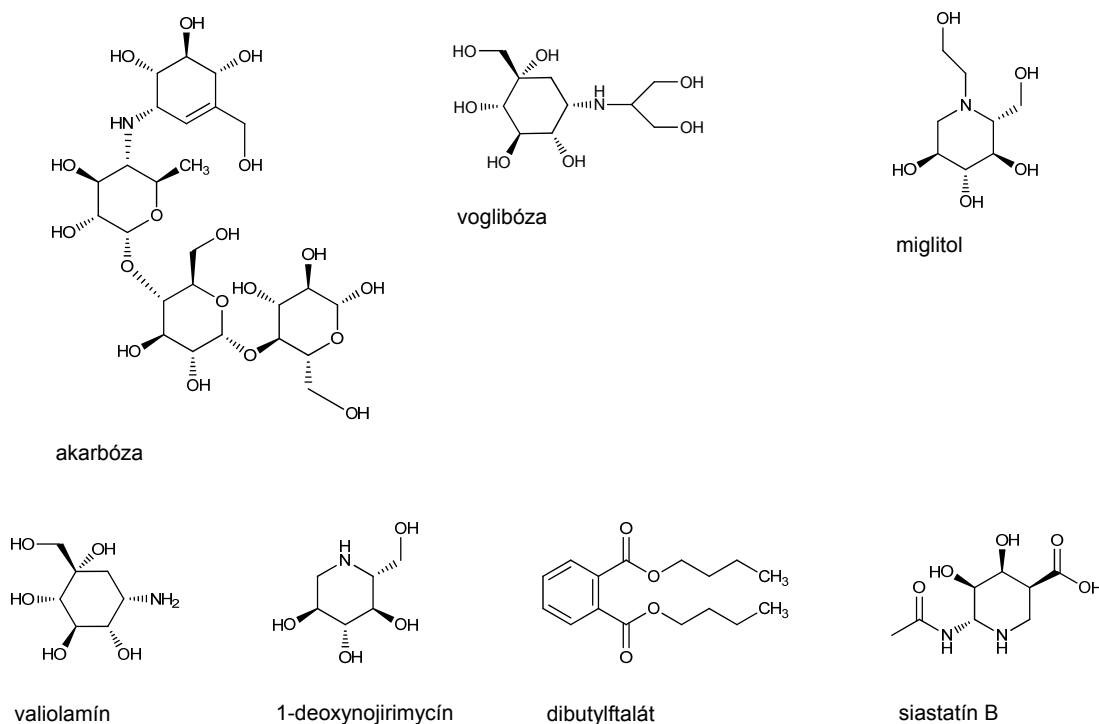
aktivity³⁻⁵. V spojitosti s týmito poznatkami sme sa v článku zamerali na mikrobiálne sekundárne metabolity ako inhibítory vybraných hydroláz a ich terapeutické aplikácie.

2. Inhibítory glykozidáz

Glykozidázy (EC 3.2.1) sú enzýmy nevyhnutné nielen pre správne trávenie sacharidov, ale tiež pre spracovanie glykoproteínov a glykolipidov. Poruchy funkcií týchto hydroláz spôsobujú metabolické poruchy⁴ a spájajú sa tiež s príčinami vzniku vírusových a nádorových chorôb^{5,6}.

2.1. Inhibítory α -glukozidázy a β -glukozidázy

Akarbóza (obr. 1) je prírodná zlúčenina produkovaná vláknitými baktériami *Actinoplanes* sp. SE50 a *Streptomyces diastaticus*. Táto aminocyklitolová zlúčenina je jedným z najdôležitejších liečiv, ktoré inhibujú bakteriálne, fungálne aj rastlinné glukozidázy v mikromolárnych koncentráciách^{7,8}. Maximálnu produkciu akarbózy (4210 mg l^{-1}) dosiahol Wang a spol.⁹ optimalizáciou fermentačných podmienok prostredníctvom mutantného kmeňa *Actinoplanes utahensis* ZJB-08196. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* je producentom významného aminocyklického inhibítora α -glukozidázy (EC 3.2.1.20) a β -glukozidázy (EC 3.2.1.21), valiolamínu (obr. 1). Valiolamín má vyšší inhibičný efekt aj na sacharázu (EC 3.2.1.26), maltázu (EC 3.2.1.20) a izomaltázu (EC 3.2.1.10) ako valienamín, validamín a hydroxyvalidamín, ktoré sú stavebnými jednotkami skupiny oligosacharidových antibiotík validamycínov¹⁰. Veľmi známy *N*-susbtituovaný derivát validamycínu A je voglibóza (obr. 1), ktorá má silné inhibičné účinky aj na sacharázu a maltázu¹¹. V Japonsku bola zavedená do klinickej praxe už v roku 1994 a súčasné výskumy potvrdzujú, že jej inhibičný účinok na α -glukozidázu je 20 až 30krát silnejší ako účinok akarbózy, čím sa zvyšuje tolerancia glukózy pri trávení a vstrebávaní¹². Všetky tieto štruktúrne podobné α -D-glukózové analógy a ich deriváty sú silné inhibítory α -glukozidázy, β -glukozidázy a majú značný potenciál aj ako liečivá nádorových chorôb a AIDS¹³. 1-Deoxynojirimycín (obr. 1) bol objavený ako prvý glukózový analóg produkovaný kmeňom *Streptomyces lavendulae*¹⁴ s inhibičným účinkom na α -glukozidázu¹⁵. Do skupiny 1-deoxynojirimycínových derivátov patrí liečivo miglitol (obr. 1), reverzibilný inhibítor, ktorý sa takmer úplne odhubáva v tenkom čreve na rozdiel od akarbózy¹⁶. Jedným z farmakologických účinkov deoxynojirimycínu je pokles infekcií spôsobených vírusom chrípky typu A a ľudským vírusom parachrípky typu 3 (cit.^{17,18}). Mechanizmus anti-vi-



Obr. 1. Štruktúry mikrobiálne produkovaných inhibítorov glykozidáz

rusovej aktivity súvisí s inhibíciou mikrozomálnej alfa-glukozidázy I (EC 3.2.1.106), ktorá je zapojená do syntézy vírusových proteínov a glykoproteínov, čím sa zablokuje ich ďalšia replikácia¹⁹. Dibutylftalát (obr. 1) je reverzibilný nekompetitívny inhibítor α -glukozidázy s disociačnou konštantou K_i 3,9 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Izolovaný bol z kultúry *Streptomyces melanosporofaciens* a jeho inhibičná aktivita bola opísaná aj na iné významné enzýmy ako napr. α -manozidázu (EC 3.2.1.24), β -manozidázu (EC 3.2.1.25), β -glukozidázu (EC 3.2.1.21) a DNA topoizomerázy I (EC 5.99.1.2) a II (EC 5.99.1.3), ktoré sú často spájané s niektorými civilizačnými chorobami^{20,21}. Do skupiny prírodných inhibítorov α -glukozidázy patria hlavne sacharidové zlúčeniny a ich analógy, ako sú napríklad amylostatíny (*Streptomyces diastaticus*), oligostatíny (*Streptomyces myxogenes*), adipozíny (*Streptomyces calvus*), salbostatíny, piralomycín a epoxychinomycíny, avšak v klinickej praxi sa zatiaľ využívajú len tri liečivá ako prírodné „anti-glukozidázy“ – akarbóza, miglitol a *N*-butyl-1-deoxynojirimycín^{22,23}. Akarbóza a miglitol sa indikujú pacientom trpiacim cukrovkou druhého typu na redukcii postprandiálnej glykémie, zatiaľ čo *N*-butyl-1-deoxynojirimycín sa používa na zmiernenie príznakov Gaucherovej choroby a s tým spojené riadené ukladanie lipidových častíc do orgánov a kostí²⁴.

2.2. Inhibítory alfa-amylázy

Yokose²⁵ izoloval homológnu zmes trestatínov z kultúry *Streptomyces dimorphogenes*, ktorá obsahovala tri majoritné komponenty: trestatín A, B, C a niekoľko minoritných zlúčenín. Majoritné zložky mali štruktúru pseudosacharidov s viazaným dusíkom esenciálnou pre inhibíciu α -amylázy (EC 3.2.1.1) a trehalázy (EC 3.2.1.28). Trestatíny sú účinné inhibítory α -amylázy, ktoré by mohli zmierňovať vedľajšie účinky (nevoľnosť, zvracanie, hnačky) akarbózy, používanej pri liečbe diabetu druhého typu na znižovanie postprandiálnej hyperglykémie²⁶. Do skupiny trestatínov patria aj akarviostatíny, izolované ako zmes sekundárnych metabolitov z kultúry *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 (cit.²⁷). V najnovšej literatúre sú popísané hlavne deriváty rastlinných inhibítorov α -amylázy – napr. transchalkóny, ktoré sú súčasťou zložitejších flavonoidových štruktúr²⁸.

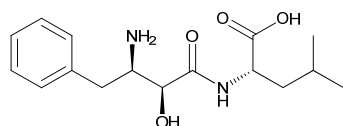
2.3. Inhibítory neuraminidázy

Prírodné piperidíny sú veľkou skupinou špecifických a účinných inhibítorov glykozidáz. Ich aplikácie sú rozšírené nielen v molekulárnej biológii na výskum biologických procesov, ale sú aj potenciálnymi liečivami pre pa-

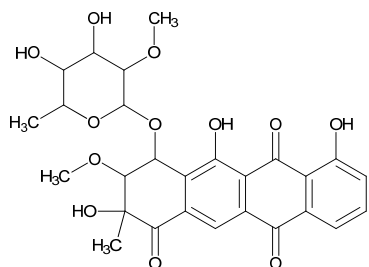
cientov s nádorovými a vírusovými chorobami. Umezawa a spol. (cit²⁹) ako prví izolovali siastatín A a B (obr. 1) z kultúry *Streptomyces* sp. MB695-A4, s inhibičnou aktivitou proti neuraminidázam (EC 3.2.1.18) izolovaným z niekoľkých typov organizmov, β -glukuronidáze (EC 3.2.1.31) a *N*-acetyl- β -D-glukóزامinidáze (EC 3.2.1.52). Neskôr sa syntetizoval trifluóracetamidový analóg siastatínu B, ktorý mal tiež významnú inhibičnú aktivitu na glukuronidázu (EC 3.2.1.31) a proliferáciu bunkovej línie melanómu B16 (cit³⁰). Shibasaki a spol. (cit³¹) izoloval inhibitor neuraminidázy spinosulfát A produkovaný neidentifikovanou hubou JCM 12827. Hodnota strednej inhibičnej koncentrácie IC₅₀ pre inhibíciu sialidázy (EC 3.2.1.18) izolovanej z *Clostridium perfringens* bola 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a z vírusu chrípky A/WSN/33 0,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ s disociačnou konštantou K_i 0,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Cytotoxická aktivita spinosulfátu A bola testovaná na nádorovú bunkovú líniu HeLa S3 IC₅₀ 77 $\mu\text{mol l}^{-1}$. V klinickej praxi sa v súčasnosti používajú dva typy liečiv na ochorenia spôsobené vírusmi chrípky. Sú to blokátory M2 iónových kanálov (aminoadamantíny) a syntetické inhibitory neuraminidázy (oseltamivir a zanamivir). Avšak niektoré kmene týchto vírusov sa stávajú rezistentnými voči spomínaným inhibítorm, a preto je potrebné pokračovať v objavovaní nových účinných antivirov³².

3. Inhibitory peptidáz

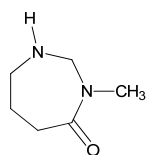
Ako patofyziologický prejav proteináz možno charakterizovať proteolytickú aktivitu „*out situ*“ mimo želaného miesta účinku, nedostatok (hypoaktivita), prípadne úplnú stratu katalytickej aktivity, ale naproti tomu i hyperaktivitu proteináz nad fyziologický rámec³³.



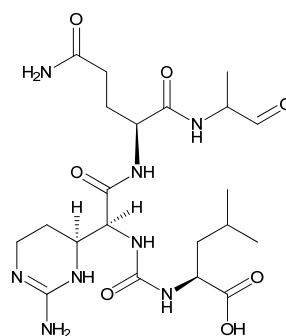
bestatín



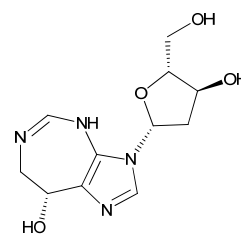
aranciamycín



inhibitor IADA-7



elastatín



deoxykoformycín

3.1. Inhibitory aminopeptidáz

Aminopeptidázy (EC 3.4.11) majú kľúčovú úlohu pri maturácii proteínov, ich aktivácii a stabilite molekuly, ako aj v degradácii a regulácii hormonálnych a nehoronálnych proteínov, ktoré môžu predstavovať potenciálne terapeutické ciele³⁴. Bestatín (obr. 2) je silný inhibitor aminopeptidáz ako aj leukotrién-A4 hydrolázy (EC 3.3.2.6) s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktorý má viacero medicínsky dôležitých fyziologických funkcií a pôvodne bol izolovaný z kultúry *Streptomyces olivoreticuli*³⁵. Bestatín zabraňuje katabolizmu niektorých endopeptidov, ktoré vykazujú analgetické vlastnosti (β -endorfin, neurokiníny, enkefalíny) inhibíciou exo- a endopeptidáz, preto sa v súčasnosti uvažuje o jeho využití pri závažných a chronických bolestivých stavoch³⁶. Na japonský trh bol uvedený v roku 1987 na liečbu leukémie a stimuláciu hematopoézy aj napriek tomu, že vykazoval toxicitu a nešpecifické aktivity hlavne na membránové metaloproteinázy ako napr. leucylaminopeptidázu (EC 3.4.11.1), aminopeptidázy B (EC 3.4.11.6) a W (EC 3.4.11.16), preto je potrebný neustály výskum a objavovanie nových špecifickejších inhibítorov aminopeptidáz³⁷. V roku 2011 bol publikovaný článok o izolácii 3-amino-2-hydroxy-4-fenylbutanoylvalylisoleucínu z kultúry *Streptomyces parvus* HCCB10043 a v biochemických testoch vykazoval silnejší inhibičný efekt na aminopeptidázu N (EC 3.4.11.2) ako kontrolné štandardy bestatín a valistatín³⁸. Medzi známe inhibitory aminopeptidáz patria aj ďalšie metabolity aktinomycét – amastatín³⁹, aktinonín⁴⁰, MR-387B⁴¹, febestín⁴², probestín⁴³, ale aj niektorých vláknitých húb kmeňa *Penicillium* – *cis*-fumagilín⁴⁴.

Obr. 2. Štruktúry mikrobiálne produkovaných inhibítorov peptidáz a adenosindeaminázy

3.2. Inhibítory karboxypeptidáz

Jednou z najznámejších metalokarboxypeptidáz (EC 3.4.17) je angiotenzín-konvertujúci enzým (ACE) (EC 3.4.17.23). Inhibítory ACE blokujú premenu angiotenzínu I na angiotenzín II a transformáciu vazodilatačného peptidu bradykinínu, čím znižujú krvný tlak⁴⁵. V klinickej praxi sa používajú na liečbu hypertenzie, myokarditídy, kardiálnej insuficiencie, proteinúrie, v prevencii aterosklerózy a majú nefroprotektívne účinky⁴⁶. Najznámejšie inhibítory ACE mikrobiálneho pôvodu sú muraceíny⁴⁷, ankovenín⁴⁸ a fenaceín⁴⁹, syntetizované kmeňmi rodu *Streptomyces* a *Nocardia*. Laktotripeptidy, tvorené hydrolýzou mliečnych výrobkov kmeňom *Lactobacillus* sp. pomocou proteolytických enzýmov, majú tiež inhibičné účinky na ACE (cit.⁵⁰). Tsukubachelin purifikovali s výťažkom 1,5 mg l⁻¹ z kultúr kmeňa *Streptomyces* sp. TM-34, izolovaného z pôdy v pohorí Tsukuba v Japonsku. Kodani a spol.⁵¹ pôvodne hľadali nové nízkomolekulové látky vychytávajúce železité ióny (siderofóry). Po určení štruktúry a porovnaní s iným štruktúrne podobným metabolitom, inhibítorom ACE – foroxymitínom, otestovali jeho inhibičnú aktivitu proti ACE (IC₅₀ 1,4 µg ml⁻¹), ktorá bola 14krát vyššia než účinok porovnávaného metabolitu. Ankovenín je sekundárny metabolit, produkovaný kmeňom *Streptomyces* sp. No. A647P-2 s hodnotou strednej inhibičnej koncentrácie 8,5·10⁻⁸ mol l⁻¹ na enzým ACE izolovaný z pľúc potkanov. Kultivácia prebiehala v 50 l fermentore a maximálny výťažok bol 253 mg. Jeho štruktúra obsahuje 19 aminokyselín a patrí do skupiny cinamycínov^{48,52}.

3.3. Inhibítory serínových a cysteínových peptidáz

Najväčšiu skupinu proteolytických enzýmov mikrobiálneho a živočíšneho pôvodu tvoria serínové peptidázy (EC 3.4.21). Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť elastázu (EC 3.4.21.37), trypsin (EC 3.4.21.4), trombín (EC 3.4.21.5) a ostatné hemokoagulačné faktory, urokinázu (EC 3.4.21.73) a faktory komplementu. V literatúre sa inhibítory elastázy považujú za potenciálne protizápalové a protinádorové liečivá^{53,54}. Elastatinal (obr. 2) je inhibítor elastázy, ktorá reaguje s elastínom v elastickom tkanive a hydrolyticky štiepi peptidové väzby smerom k nenabitým nearomatickým reťazcom. Tento bioaktívny metabolit bol izolovaný z kultúr viacerých actinomycét, z ktorých bol detailnejšie preskúmaný kmeň MD469-CG8, izolovaný z pôdy v prefektúre Kumamoto v Japonsku a identifikovaný ako *Streptomyces griseoruber*⁵⁵. Výsledky inhibičných testov proti iným peptidázam potvrdili, že elastatinal je špecifický inhibítor elastázy. V súčasnosti sa skúma jeho možné využitie v konjugácii s karboxymetylcelulózou na orálne užívanie liekov s peptidovou štruktúrou^{56,57}.

Cysteínové peptidázy (EC 3.4.22) predstavujú v súčasnosti veľmi perspektívny objekt farmaceutického výskumu v spojitosti s terapiou mnohých závažných ľudských chorôb (neoplastické transformácie buniek, artritické, infekčné a zápalové). Predmetom záujmu farmakológov sú

hlavne lyzozomálne katepsíny (katepsín B, H, L, S a O) a kalpaíny (vápnik-dependentné cysteínové peptidázy)⁵⁸. Zvýšené hladiny katepsínu B (EC 3.4.22.1) korelujú s malignitou, čo naznačuje, že tento enzým môže byť užitočným diagnostickým markerom pre niekoľko typov ľudských nádorových chorôb. Tiež sa podieľa na patogenéze reumatoidnej artritídy, svalovej dystrofie a nádorových metastáz⁵⁹⁻⁶¹. Leupeptín, reverzibilný inhibítor enzýmov lyzozomálneho katepsínu B a kalpaínov (EC 3.4.22.52, EC 3.4.22.53) izoloval ako prvý Aoyagi a spol.⁶². Produkciu leupeptínu optimalizoval Ning a Beynon⁶³ prídavkom lyzínu do kultivačného média, čím sa zvýšil výťažok z 200 mg l⁻¹ na 1400 mg l⁻¹. Je to tripeptid s aldehydovou skupinou, syntetizovaný určitými kmeňmi *Streptomyces* sp. Neskôr potvrdili biosyntézu tohto extracelulárneho metabolitu kmeňom *Streptomyces lavendulae* a morskými baktériami *Pseudoalteromonas sagamiensis* sp. nov.⁶⁴. Perrin a spol.⁶⁵ zistil testami jeho antioxidantné vlastnosti a hodnotu strednej inhibičnej koncentrácie IC₅₀ 0,14 µmol l⁻¹. Shirato a spol.⁶⁶ testoval aj jeho protivírusové aktivity. Infikoval líniu opičích obličkových buniek (Vero/TMPRSS2 cells) vírusom prasacej epidemiaľnej diarei (PEDV – porcine epidemic diarrhea virus). Po liečbe leupeptínom preukázal, že inhibítor zablokoval vírusové peptidázy potrebné na uvoľnenie vírusových častíc z buniek. Nakae a spol.⁶⁷ purifikoval nový analóg antipainu, antipain Y. Kmeň vláknitých baktérií *Streptomyces* sp. MJ218-CF4 izolovaný z pôdy vykazoval inhibičné aktivity proti trypsinu (EC 3.4.21.4). Antipain Y potláča zvýšenie hladiny intracelulárneho vápnika indukovanú trypsinom a blokuje normálnu signalizáciu receptorov PARs (protease activated receptors). Aktivácia týchto receptorov môže mať za následok vznik neurologických chorôb, preto inhibítory „PARs“ signalizácie sú považované za potenciálne liečivá.

3.4. Inhibítory aspartátových peptidáz

Medzi farmakologicky najvýznamnejšie enzýmy tejto skupiny možno zaradiť vírusovú HIV-proteázu I (EC 3.4.23.16), HIV-proteázu II (EC 3.4.23.47), renin (EC 3.4.23.15) a katepsín D (EC 3.4.23.5)⁶⁸. Pepstatíny sú inhibítory pepsínu (EC 3.4.23.1) a katepsínu D. Pôvodne boli izolované z kultúr *Streptomyces testaceus* a *Streptomyces argenteolus* výskumným tímom Umezawa a spol. (cit.⁶⁹). Na základe podobnosti ich sekvencií a terciálnej štruktúry vznikol predpoklad, že by pepstatíny mohli inhibovať aj proteázy vírusov, ktoré sú nevyhnutné pre ich virulenciu. Túto hypotézu potvrdili Matarrese a spol.⁷⁰, ktorí testovali pepstatín A ako inhibítor replikácie vírusu chrípky typu A a dedukovali, že efekt inhibítora môže byť spôsobený buď priamym účinkom na cieľovú bunku, v ktorej navodí apoptický proces alebo účinkom na M2 protónovú pumpu vírusovej častice.

3.5. Inhibítory metalopeptidáz

Metalopeptidázy (EC 3.4.24), obsahujúce vo svojej

molekule zinok nevyhnutný pre ich aktivitu, tvoria zaujímavú skupinu enzýmov zodpovedných za progresiu chorôb spojených s degradáciou extracelulárneho matrixu. Z farmakologicky najvýznamnejších enzýmov tejto skupiny možno spomenúť matrilysin (EC 3.4.24.23) a kolagenázy rôzneho typu (EC 3.4.24.3, EC 3.4.24.34), často spájané v odbornej literatúre s nádorovými a zápalovými chorobami^{3,71}. Produkcia steffimycínov kmeňom *Streptomyces steffisburgensis* bola popísaná autormi Bergy a Reusser (cit⁷²). Steffimycíny a štruktúrne veľmi podobné aranciamycíny (obr. 2) produkované kmeňom *Streptomyces echinatus* patria do skupiny antracyklínových antibiotík. Efektívne inhibujú kolagenázu (EC 3.4.24.3) (IC_{50} aranciamycínu $3,7 \cdot 10^{-7}$ mol l⁻¹) a na základe ich interkalačných vlastností môžu byť účinnými neoplastickými liečivami^{73,74}.

4. Inhibítory adenozyndeaminázy

Vrodené defekty adenozyndeaminázy (ADA) (EC 3.5.4.4) spôsobujú ťažké imunodeficiencie, čo naznačuje, že prítomnosť tohto enzýmu je esenciálna pre funkcie lymfocytov. Zvýšené aktivity ADA boli pozorované u niekoľkých chorôb, ako sú napr. brušný týfus⁷⁵, infekčná mononukleóza a tuberkulóza^{76,77}. Pacientom s chronickou lymfatickou leukémiou sa tieto hodnoty zvýšili v T-bunkách až trojnásobne, čo ovplyvnilo aj ďalšie smerovanie výskumov aktivít tohto enzýmu a objavovanie nových inhibítorov⁷⁸. Veľa analógov adenozyínu, ktoré sú substrátmi pre ADA, sa používajú v chemoterapii, imunológii a virológii^{79,80}. Koformycín a deoxykoformycín (obr. 2) sú dihydrohomopurínové analógy a patria medzi silno viažuce („tight-binding“) inhibítory (K_i koformycínu $2,1 \cdot 10^{-10}$ mol l⁻¹, K_i deoxykoformycínu $7,6 \cdot 10^{-11}$ mol l⁻¹). Koformycín bol objavený ako vedľajší produkt fermentačnej prípravy formycínu kmeňmi *Nocardia interforma* a *Streptomyces kaniharaensis*⁸¹. Pri analýze antimikrobiálnych a protinádorových aktivít sa zistilo, že tento minoritný komponent pôsobí proti inaktivácii (deaminácii) formycínu⁸². Deoxykoformycín (pentostatín) bol izolovaný z produkčného média kmeňa *Streptomyces antibioticus* v priebehu skríningu ADA inhibítorov (cit⁸³). Tento 2'-deoxy izomér koformycínu má chemoterapeutický efekt na zrelé T-bunky leukémie a je využívaný na terapiu vlasatobunkovej a chronickej lymfatickej leukémie^{84,85}. IADA-7 (obr. 2) je inhibítor ADA produkovaný kmeňom *Bacillus* sp. J-89 a má inhibičné účinky aj na proliferáciu buniek leukemickej línie „Jurkat“ (T-bunková línia, mutovaná forma TP-53) IC_{50} 15 µg ml⁻¹ a líniu J-82 (ľudské bunky karcinómu močového mechúra) IC_{50} 25 µg ml⁻¹. Výsledky výskumu naznačujú, že vďaka dokázanej antiproliferačnej aktivite sa inhibítor IADA-7 môže uplatniť v medicíne ako protinádorové liečivo⁸⁶. Za posledných 50 rokov sa izolovalo viacero typov inhibítorov ADA z mikroorganizmov a odvodilo niekoľko alkoholových derivátov z adenozyínových nukleotidov s podobným účinkom, avšak tieto zlúčeniny sú extrémne toxické pre zdravé ľudské bunky,

a preto sú veľmi obmedzené aj ich klinické aplikácie. V klinickej praxi sa používa iba jeden ADA inhibítor – deoxykoformycín (pentostatín) na liečbu anémie, preto je dôležitý ďalší výskum nových, bezpečnejších a účinnejších ADA inhibítorov⁸⁷.

5. Záver

Liečivá z prírodných zdrojov nadobúdajú v priemyselne rozvinutých spoločnostiach čoraz väčšiu popularitu, pričom prírodné prostredie trvale ostáva najväčším zdrojom liečivých prostriedkov na celom svete. Mikrobiálne a rastlinné sekundárne metabolity majú terapeutické aplikácie využívané v medicíne ako antibiotiká, imunomodulátory, hypolipidemiká a protinádorové liečivá. Väčšina prírodných produktov využívaných v medicíne sa izoluje z rastlinného materiálu, čo je zvyčajne pomerne náročný, neekonomický a neekologický proces, preto sme sa zamerali na mikrobiálne produkované inhibítory. Mnohé látky boli objavené ešte v minulom storočí, avšak ich potenciál a rôzne modifikácie zlepšujúce ich perspektívu na terapeutické využitie neustále pokračuje. Záujem výskumu o enzýmové inhibítory rastie v spojení so snahou vyrobiť novšie, účinnejšie a bezpečnejšie terapeutiká s efektívnejšou možnosťou ich produkcie.

LITERATÚRA

1. Cibíková P., Šturdíková M., Maruna M.: Chem. Listy 104, 12 (2010).
2. Maruna M., Šturdíková M., Ondrejčíková P.: Chem. Listy 104, 103 (2010).
3. Evrosimovska B., Velickovski B., Dimova C., Veleška-Stefkova D.: J. Cell Anim. Biol. 5, 113 (2011).
4. Yao Y., Cheng X., Wang L., Wang S., Ren G.: Int. J. Mol. Sci. 12, 6445 (2011).
5. Meany D. L., Chan D. W.: Clin. Proteomics 8:7. <http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/8/1/7>, stiahnuté 3.6.2011.
6. Gruters R. A., Neefjes J. J., Tersmette M., Goede R. E., Tulp A., Huisman H. G., Miedema F., Ploegh H. L.: Nature 330, 74 (1987).
7. Hanefeld M., Cagatay M., Petrowitsch T., Neuser D., Petzinna D., Rupp M.: Eur. Heart J. 25, 10 (2004).
8. Arungarathan G., McKay G. A., Fisher M.: Br. J. Cardiol. 18, 78 (2011).
9. Wang Y. J., Liu L. L., Feng Z. H., Liu Z. Q., Zheng Y. G.: World J. Microbiol. Biotechnol. 10, 1 (2011).
10. Kameda Y., Asano N., Yoshikawa M., Takeuchi M., Yamaguchi T., Matsui K., Horii S., Fukase H.: J. Antibiot. 37, 1301 (1984).
11. Yang J., Xu H., Zhang Y., Bai L., Deng Z., Mahmud T.: Org. Biomol. Chem. 9, 438 (2011).
12. Yasuda K., Shimowada K., Uno M., Odaka H., Adachi T., Shihara N., Suzuki N., Tamon A., Nagashima K., Hosokawa M., Tsuda K., Seino Y.: Diabetes Res.

- Clin. Pract. 59, 13 (2003).
13. Kuma J. A., Tiwari A. K., Ali A. Z., Madhusudhana K., Reddy B. S., Ramakrishna S., China Raju B.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 80 (2010).
 14. Inoue S., Tsuruoka T., Niida T.: *J. Antibiot.* 19, 288 (1966).
 15. Reese E. T., Parrish F. W., Ettlinger M.: *Carbohydr. Res.* 18, 381 (1971).
 16. Tormo M. A., Ropero M. F., Nieto M., Martinez I. M., Campillo J. E.: *Can. J. Biochem. Physiol.* 74, 1196 (1996).
 17. Saito T., Yamaguchi I.: *J. Vet. Med. Sci.* 62, 575 (2000).
 18. Tanaka Y., Kato J., Kohara M., Galinski M. S.: *Antiviral Res.* 72, 1 (2006).
 19. Yatsunami K., Murata K., Kamei T.: *Food Nutr. Sci.* 2, 87 (2011).
 20. Lee D. S.: *J. Biosci. Bioeng.* 89, 271 (2000).
 21. Zuma A. A., Cavalcanti D. P., Maia M. C., de Souza W., Motta M. C.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 449 (2011).
 22. Borges de Melo E., Gomes A. S., Carvalho I.: *Tetrahedron* 62, 10277 (2006).
 23. Pal A. P. J., Gupta P., Reddy Y. S., Vankar Y. D.: *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 6957.
 24. Benito J. M., García Fernández J. M., Ortiz Mellet C.: *Expert Opin. Ther. Pat.* 21, 885 (2011).
 25. Yokose K., Ogawa K., Sano T., Watanabe K., Maruyama H. B., Suhara Y.: *J. Antibiot.* 36, 1157 (1983).
 26. Qin X., Ren L., Yang X., Bai F., Wang L., Geng P., Bai G., Shen Y.: *J. Struct. Biol.* 174, 196 (2011).
 27. Geng P., Bai G.: *Carbohydr. Res.* 343, 470 (2008).
 28. Najafian M., Ebrahim-Habibi A., Hezareh N., Yaghmaei P., Parivar K., Larijani B.: *Mol. Biol. Rep.* 38, 1617 (2011).
 29. Umezawa H., Aoyagi T., Komiyama T., Morishima H., Hamada M., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 27, 963 (1974).
 30. Nishimura Y., Kudo T., Kondo S., Takeuchi T., Tsuruoka T., Fukuyasu H., Shibahara S.: *J. Antibiot.* 47, 840 (1994).
 31. Shibazaki M., Tanaka K., Nagai K., Watanabe M., Fujita S., Suzuki K., Okada G., Yamamoto T.: *J. Antibiot.* 57, 821 (2004).
 32. Kiso M., Kubo S., Ozawa M., Le Q. M., Nidom C. A., Yamashita M., Kawaoka Y.: *PLoS Pathog.* 6. <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000786>, stiahnuté 26.2.2010.
 33. Leung D., Abbenante G., Fairlie D. P.: *J. Med. Chem.* 43, 305 (2000).
 34. Chen L., Teng Y., Xu W.: *Curr. Med. Chem.* 18, 964 (2011).
 35. Umezawa H., Aoyagi T., Suda H., Hamada M., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 29, 97 (1976).
 36. Jia M. R., Wei T., Xu W. F.: *Front. Neurosci.* 4. <http://www.frontiersin.org/neuropharmacology/10.3389/fnins.2010.00050/full>, stiahnuté 28.6.2010.
 37. Bauvois B., Dauzonne D.: *Med. Res. Rev.* 26, 88 (2006).
 38. Rao M., Li Q., Feng L., Xia X., Ruan L., Sheng X., Ge M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 699 (2011).
 39. Aoyagi T., Tobe H., Kojima F., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa H.: *J. Antibiot.* 31, 636 (1978).
 40. Umezawa H., Aoyagi T., Tana T., Suda H., Okuyama A., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 38, 1629 (1985).
 41. Chung M. C., Chun H. K., Han K. H., Lee H. J., Lee C. H., Kko Y. H.: *J. Antibiot.* 49, 99 (1996).
 42. Nagai M., Kojima F., Naganawa H., Hamada M., Aoyagi T., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 50, 82 (1997).
 43. Aoyagi T., Yoshida S., Nakamura Y., Shigihara Y., Hamada M., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 43, 143 (1990).
 44. Kwon Y. I., Son H. J., Moon K. S., Kim J. K., Kim J. G., Chun H. S., Ahn S. K., Hong C. I.: *J. Antibiot.* 55, 462 (2002).
 45. Salom J. B., Torregrosa G., Marcos J. F., Alborch E., Manzanares P.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 5323 (2006).
 46. Unger T.: *Medsc. J. Med.* 10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2344119/>, stiahnuté 26.3.2008.
 47. Bush K., Henry P. R., Slucharyk D. S.: *J. Antibiot.* 37, 330 (1984).
 48. Kido Y., Hamakado T., Yoshida T., Anno M., Motoki Y.: *J. Antibiot.* 36, 1295 (1983).
 49. Bush K., Henry P. R., Souser-Woehleke M. S., Trejo W. H., Slusarchyk D. S.: *J. Antibiot.* 37, 1308 (1984).
 50. Qian B., Xing M., Cui L., Deng Y., Xu Y., Huang M., Zhang S.: *J. Dairy Res.* 78, 72 (2011).
 51. Kodani S., Ohnishi-Kameyama M., Yoshida M., Ochi K.: *Eur. J. Org. Chem.* 2011, 3191 (2011).
 52. Riley M. A., Gillor O.: *Bacteriocins. Current Research and Application.* Horizon Bioscience, Wymondham 2007.
 53. Owen C. A., Campbell E. J.: *J. Leukocyte Biol.* 65, 137 (1999).
 54. Nunes G. L., Simões A., Dyszy F. H., Shida C. S., Juliano M. A., Juliano L., Gesteira T. F., Nader H. B., Murphy G., Chaffotte A. F., Goldberg M. E., Tersariol I. L., Almeida P. C.: *PLoS One* 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3121799/>, stiahnuté 23.6.2011.
 55. Umezawa H., Aoyagi T., Okura A., Morishima H., Takeuchi T.: *J. Antibiot.* 26, 621 (1973).
 56. Marschütz M. K., Bernkop-Schnürch A.: *Biomaterials* 21, 1499 (2000).
 57. Park K., Kwon I. Ch., Park K.: *React. Funct. Polym.* 71, 280 (2011).
 58. Kasabova M., Saidi A., Naudin C., Sage J., Lecaille F., Lalmanach G.: *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* 9, 148 (2011).
 59. Mohamed M. M., Sloane B. F.: *Nat. Rev. Cancer* 6, 764 (2006).
 60. Mueller-Steiner S., Zhou Y., Arai H., Roberson E. D., Sun B., Chen J., Wang X., Yu G., Esposito L., Mucke

- L., Gan L.: *Neuron* 51, 703 (2006).
61. Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S.: *Biochimie* 90, 194 (2008).
 62. Aoyagi T., Takeuchi T., Matsuzaki A., Kawamura K., Kondo S., Hamada M., Maeda K., Umezawa H.: *J. Antibiot.* 31, 283 (1969).
 63. Ning M. C., Beynon R. J.: *Int. J. Biotechnol. Biochem.* 18, 813 (1986).
 64. Kobayashi T., Imada C., Hiraishi A., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y., Hamada N., Watanabe E.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1807 (2003).
 65. Perrin C., Vergely C., Zeller M., Rochette L.: *Cell. Mol. Biol.* 48, 267 (2002).
 66. Shirato K., Matsuyama S., Ujike M., Taguchi F.: *J. Virol.* 85, 7872 (2011).
 67. Nakae K., Kojima F., Sawa R., Kubota Y., Igarashi M., Kinoshita N., Adachi H., Nishimura Y., Akamatsu Y.: *J. Antibiot.* 63, 41 (2010).
 68. Hřčková M., Šturdík E., Maliar T., Zemanovič J.: *Chem. Listy* 98, 842 (2004).
 69. Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada M.: *J. Antibiot.* 23, 259 (1970).
 70. Matarrese P., Nencioni L., Checconi P., Ciarlo L., Gambardella L., Ascione B., Sgarbanti R., Garaci E., Malorni W., Palamara A. T.: *J. Cell. Physiol.* 22. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.22696/abstract>, stiahnuté 22.2.2011.
 71. Nastase A., Pâslaru L., Niculescu A. M., Ionescu M., Dumitrașcu T., Herlea V., Dima S., Gheorghe C., Lazar V., Popescu I.: *Chirurgia (Bucur)* 106, 177 (2011).
 72. Bergy M. E., Reusser F.: *Experientia* 23, 254 (1967).
 73. Bols M., Binderup L., Hansen J., Rasmussen P.: *J. Med. Chem.* 35, 2768 (1992).
 74. Luzhetskyy A., Hoffmann J., Pelzer S., Wohlert S. E., Vente A., Bechthold A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 15 (2008).
 75. Ungerer J. P. J., Burger H. M., Bissbort S. H., Vermaak W. J. H.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 510 (1996).
 76. Gorguner M., Cerci M., Gorguner I.: *Respirology* 5, 321 (2000).
 77. Koc I., Arslan E., Isik F., Dikensoy Ö.: *IJCRI* 2, 5 (2011).
 78. Alunni S., Orru M., Ottavi L.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23, 182 (2008).
 79. Demian A. L., Somkuti G. A., Hunter-Cavera J. C., Rossmore H. W.: *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*. Elsevier, Netherlands 1989.
 80. Chen Y. L., Yin Z., Lakshminarayana S. B., Qing M., Schul W., Duraiswamy J., Kondreddi R. R., Goh A., Xu H. Y., Yip A., Liu B., Weaver M., Dartois V., Keller T. H., Shi P. Y.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3255 (2010).
 81. Niida T., Niwa T., Tsuruoka T., Ezaki N., Shomura T., Umewaza H.: *153rd Scientific Meeting of the Japanese Antibiotic Research Association*, Tokyo 1967.
 82. Ōmura S.: *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*. Springer-Verlag, New York 1992.
 83. Woo P. W. K., Dion H. W., Lange S. M., Dahl L. F., Dinham L. J.: *J. Heterocycl. Chem.* 11, 641 (1974).
 84. Dillman R. O.: *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4, 27 (2004).
 85. Zavalov A. V., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavalov A. V., Lauvau G.: *J. Leukocyte Biol.* 88, 279 (2010).
 86. Lee G., Lee S. S., Kay K. Y., Kim D. W., Choi S., Jun H. K.: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 59 (2009).
 87. Oken M. M., Lee S., Kay N. E., Knospe W., Cassileth P. A.: *Leuk. Lymphoma* 45, 79 (2004).

E. Buchtová and M. Šturdíková (*Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Microbial Hydrolases Inhibitors and Their Therapeutic Potential**

Therapeutic applications of microbial secondary metabolites provided the opportunity for the discovery of antibiotics, immunosuppressants, cholesterol lowering and anticancer drugs. Most natural products used in medicine are isolated from plants. The isolation is usually quite a difficult, expensive and non-ecological process. Therefore we focused on microbial sources of enzyme inhibitors. Although many substances were already discovered in the last century, their potential and various modifications are still promising. An interest in enzyme inhibitors is steadily growing due to their potential in the management of metabolic disorders and serious diseases and also due to finding more effective and safer drugs.