

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

**VLIV PARAZITÓZY NA BIOTRANSFORMAČNÍ
ENZYMY HOSTITELE**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2008

Hana Bártíková

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

Chtěla bych velice poděkovat své školitelce Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení v experimentální části práce a za užitečné rady a návrhy při vypracovávání diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za pomoc v experimentální části, paní Aleně Pakostové za zpracování výsledků na HPLC a celé katedře biochemických věd za příjemnou pracovní atmosféru.

OBSAH

ABSTRAKT (cz).....	6
ABSTRACT (en).....	7
1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 Ovce domácí – <i>Ovis aries</i>	9
2.1.1 Původ.....	9
2.1.2 Popis.....	10
2.1.3 Plemena ovcí.....	11
2.1.4 Reprodukce.....	11
2.1.5 Krmení a pastva.....	12
2.1.6 Chování.....	12
2.1.7 Význam.....	12
2.1.8 Ovce domácí a parazit <i>Haemonchus contortus</i>	13
2.2 <i>Haemonchus contortus</i>	14
2.2.1 Životní cyklus.....	14
2.2.2 Ovlivnění ovcí.....	16
2.2.3 Diagnostika.....	16
2.2.4 Kontrola a léčba hemonchózy.....	16
2.2.4.1 FAMACHA systém jako nástroj kontroly parazita.....	17
2.2.4.2 Léčba anthelmintiky.....	17
2.2.4.3 Léčba pomocí mědi.....	20
2.2.4.4 Další zkoumané způsoby léčby.....	20
2.3 Biotransformační enzymy.....	22
2.3.1 Charakteristika biotransformačních enzymů.....	22
2.3.2 Přehled základních biotransformačních reakcí.....	22
2.3.3 Faktory ovlivňující biotransformační enzymy.....	24
2.3.3.1 Mezdruhové rozdíly.....	25
2.3.3.2 Potrava.....	25
2.3.3.3 Pohlaví.....	26
2.3.3.4 Věk.....	26
2.3.3.5 Genetické faktory.....	26
2.3.3.6 Indukce.....	27
2.3.3.7 Inhibice.....	27
2.3.4 Vliv parazitózy na biotransformační enzymy hostitele.....	28
2.4 Přehled biotransformačních enzymů.....	29
2.4.1 Oxidační enzymy.....	29
2.4.1.1 Cytochromy P450.....	29
2.4.1.2 Flavinmonooxygenasa (FMO).....	32
2.4.2 Konjugační enzymy.....	34
2.4.2.1 Glutathion-S-transferasa (GST).....	34
2.4.2.2 UDP-glukuronosyltransferasa.....	35
2.4.3 Redukční enzymy.....	36
2.4.4 Substráty použité pro stanovení aktivit redukčních enzymů.....	38
3. CÍL PRÁCE.....	43
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
4.1 Biologický materiál, přístroje.....	44
4.1.1 Biologický materiál.....	44
4.1.2 Přístroje.....	44

4.2	Pracovní postup	45
4.2.1	Příprava subcelulárních frakcí	45
4.2.2	Stanovení koncentrace bílkoviny.....	46
4.2.3	Stanovení aktivity CYP 1A, 2B, 3A.....	48
4.2.4	Stanovení aktivity CYP 2C9.....	50
4.2.5	Stanovení aktivity CYP 2E1 (chlorzoxazon 6-hydroxylasa).....	51
4.2.6	Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy (FMO)	54
4.2.7	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy	55
4.2.8	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy	56
4.2.9	Spektrofotometrické stanovení aktivity redukčních enzymů	58
4.2.10	Stanovení aktivity AKR 1C a CR (dihydrodioldehydrogenas a karbonylreduktas)	60
4.2.11	Stanovení aktivity 11 β -HSD typu 1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy) ..	61
4.2.12	Statistické zpracování výsledků.....	62
5.	VÝSLEDKY	63
5.1	Stanovení koncentrace bílkoviny.....	63
5.2	Stanovení aktivity CYP 1A, 2B, 3A.....	66
5.3	Stanovení aktivity CYP 2C9.....	70
5.4	Stanovení aktivity CYP 2E1	72
5.5	Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy	74
5.6	Stanovení glutathion-S-transferasy.....	75
5.7	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy	76
5.8	Spektrofotometrické stanovení aktivity redukčních enzymů	78
5.8.1	Reduktasy naloxonu (AKR 1C1, 1C2, 1C4)	78
5.8.2	Reduktasy metyraponu (AKR 1C, CR, 11 β -HSD).....	79
5.8.3	Reduktasy ketoprofenu (AKR 1C1, 1C2, 1C4).....	81
5.8.4	Reduktasy DL-glyceraldehydu (AKR 1A1)	82
5.8.5	Reduktasy daunorubicinu (pH 6,0; AKR 1C2, CR)	84
5.8.6	Reduktasy daunorubicinu (pH 8,5; aldehydreduktasa).....	85
5.8.7	Reduktasy acenaftenolu (AKR 1C1, 1C2, 1C3, 1C4)	86
5.8.8	Reduktasy 4-pyridinkarboxaldehydu (AKR 1A1, 1C1, 1C2, 1C4, 3 α -HSD)	87
5.9	Stanovení aktivity AKR 1C a CR vůči oracinu	89
5.10	Stanovení aktivity 11 β -HSD typu 1 vůči oracinu.....	92
6.	DISKUSE	95
7.	ZÁVĚR.....	100
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	101

ABSTRAKT (CZ)

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Hana Bártíková

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

Název diplomové práce:

Vliv parazitózy na biotransformační enzymy hostitele

Parazitární choroby způsobují značné ekonomické ztráty u hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Relativně velmi vysokou patogenitu vykazuje celosvětově rozšířený druh *Haemonchus contortus*, jenž parazituje v trávicím traktu přežvýkavců. K terapii hemonchózy jsou používána benzimidazolová anthelmintika. Změněná aktivita enzymů biotransformujících tato léčiva může mít významný dopad na léčbu. Dalším problémem je rezistence červů na dostupná anthelmintika, k níž může mimo jiné přispívat indukce enzymů hostitele. V této práci byl zkoumán vliv hemonchózy na aktivitu biotransformačních enzymů ovce domácí. Sledovány byly oxidační, konjugační a redukční enzymy u zdravých i nemocných ovcí. Stanovení aktivit probíhalo v cytosolické a mikrosomální frakci jater a tenkého střeva. U většiny sledovaných oxidačních enzymů byla pozorována inhibice enzymové aktivity, u konjugačních enzymů naopak došlo vlivem parazitózy k indukci. Pro skupinu redukčních enzymů nelze vyslovit jednoznačný závěr. Porovnání výsledků mezi jednotlivými skupinami ovcí umožnilo zhodnotit vliv parazitózy na aktivitu biotransformačních enzymů. Tento jev souvisí nepřímo i s vývojem lékové rezistence parazitů.

ABSTRACT (EN)

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

Candidate: Hana Bártíková

Consultant: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title:

The effect of parasitosis on the host's biotransformation enzymes

Parasitic diseases cause significant economic losses in livestock, domestic and wild animals. World-wide spread species *Haemonchus contortus* parasiting in gastrointestinal tract of ruminants exhibits relatively high degree of pathogenity. To treat haemonchosis the benzimidazole anthelmintics are used. Altered activity of the enzymes participating in biotransformation of these drugs can affect the treatment. The induction of host's enzymes can contribute to the resistance of the worms to the available anthelmintics. This project studies influence of haemonchosis to the activity of sheep's biotransformation enzymes. Oxidative, conjugation and reductive enzymes have been studied both in healthy and sick sheep. Cytosolic and microsomal fractions of liver and small intestine have been used for determination of enzymatic activities. In the most of monitored oxidative enzymes the inhibition of activity has been observed. On the contrary, parasitosis has caused enzymatic induction of conjugation enzymes. The results in group of reductive enzymes don't offer unambiguous conclusion. The comparison of results between separate groups of sheep enables to sum up the influence of the parasitosis on enzymatic activity. This phenomenon is indirectly related to drug resistance development in parasites.

1. ÚVOD

Parazitózy vyvolané helminty (helmintózy) jsou hlavní příčinou ekonomických ztrát u přežvýkavců na celém světě. Nejvíce škod způsobují gastrointestinální parazité, k nimž patří *Haemonchus contortus* (vlasovka slézová). Důsledkem těchto infekcí je snížená produkce; poškození organismu může vyústit dokonce ve smrt hostitele.

Nejčastěji využívaným prostředkem v boji s parazitujícími červy je farmakoterapie a farmakoprophylaxe vhodnými anthelmintiky. Značným problémem je snížená účinnost léčiv na cílové parazity v důsledku jejich neracionálního používání. Úspěch terapie závisí na výběru vhodného anthelmintika, volbě dávkování a na citlivosti parazita. Léčbu dále ovlivňuje i případná změna v aktivitě biotransformačních enzymů hostitele, která může nastat vlivem samotného léčiva či působením parazita.

Tato diplomová práce studuje vliv hemonchózy na aktivitu enzymů ovce domácí. Ovlivnění metabolismu léčiva může vést ke snížení léčebného účinku nebo ke zvýšení toxického účinku v organismu. Změna aktivity enzymů ve smyslu indukce může rovněž přispívat k vývoji lékové rezistence parazitů. Zvýšená aktivita vede ke snížení plazmatických hladin účinné látky, a právě kontakt parazitů s nízkými dávkami anthelmintik snižuje jejich citlivost vůči léčivu. Pro úspěšnou léčbu hemonchózy je tedy důležité znát, zda a jak dochází v průběhu infekce k ovlivnění enzymů.

K biotransformačním studiím byly použity mikrosomální a cytosolické frakce z jater a střevní mukózy ovce domácí. Vliv parazitózy byl zjišťován porovnáním enzymové aktivity zdravých ovcí a ovcí experimentálně infikovaných vlasovkou slézovou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Ovce domácí – Ovis aries*

Ovce domácí je domestikovaným přežvýkavcem, patřícím do třídy savců (Mamalia), řádu sudokopytníků (Artiodactyla), podřádu přežvýkavých (Ruminantia), čeledi turovitých (Bovidae), podčeledi Caprinae, rodu *Ovis*. Ovce jsou chované hlavně pro vlnu, maso a mléko. Jsou všestranné a méně náročné než skot, vyskytují se v širokém rozmezí podmínek od horských lesů po pouště. Nejvíce ovcí je chováno v Číně a Austrálii (www.cs.wikipedia.org).



Obr. 1: *Ovis aries* – ovce domácí

2.1.1 Původ

Existuje velký počet teorií, vztahujících se k původu ovce domácí. Většina zdrojů se shoduje, že pochází z muflona. Stále se můžeme setkat se dvěma divokými populacemi muflonů - s asijským (oblast Turecka a Íránu) a evropským muflonem (Sardinie a Korsika, dále ČR, Slovensko, Rakousko, Německo, Rumunsko). Tyto dva druhy jsou spřízněné, liší se barvou – asijský je červenější a má jiné uspořádání rohů. Některé zdroje

dokonce předpokládají, že se evropský muflon vyvinul z první ovce domácí, a tudíž že všechny ovce jsou potomky asijského muflona (www.ansi.okstate.edu).

Důkazy o domestikaci pochází z roku 11 000 – 9 000 př. n. l. Ovce je po psu druhým domestikovaným zvířetem. Soška ovce s vlnou z archeologického naleziště z Íránu dokládá, že selekce ovcí na vlnu se začala objevovat před 6 000 lety. Selekcce druhů na vlnu, stádní instinkty a jiné ekonomicky důležité znaky během staletí vedly k více než 200 různým plemenům ovcí, která se vyskytují celosvětově. Moderními šlechtitelskými projekty se rozrůstá počet smíšených či umělých plemen, která vznikla křížením dvou či více zavedených plemen.

2.1.2 Popis

Fyzické detaily ovce domácí se velice liší mezi jednotlivými plemeny. Délka hlavy a těla je 1,2 – 1,8 m, výška v kohoutku je 0,65 – 1,27 m. Samice mají velikost 3/4 – 2/3 velikosti samců. Divoké ovce mají ocas 70 – 150 mm, ale ovce domácí ho mohou mít delší. Je užíván jako zásobárna tuku, i když na farmách jsou ovčím ocasům většinou odstraňovány. Rod *Ovis* je charakterizován přítomností žláz, situovaných v mělké prohlubni v slzní kosti, v tříslech a mezi dvěma hlavními prsty na nohou. Tyto žlázy sekretují polotekutou látku, která dává ovčím domácím jejich charakteristický pach. Tělo ovce je pokryto měkkou, hustou, zkadeřenou srstí – vlnou. Selekcce poskytuje ovce s vlnou či bez ní. Zbarvení se pohybuje v rozmezí mléčně bílé po tmavě hnědou a černou. Mezi odlišnými druhy existuje značná rozmanitost (Reavill 2000).

Ovce domácí má jako přežvýkavec 4 žaludky, rozdělené kopyto a řezáky pouze v dolní čelisti. Zuby v horní čelisti jsou nedostatečné a jsou nahrazeny tvrdou pevnou podložkou, proti níž se pohybují zuby dolní čelisti, když se zvíře pase. Umožňují ukusování trávy. Zvláštností je, že ovce nemají žádné slzné kanálky, ale místo nich hodně malých váčků. Z nich je sekretována olejovitá tekutina, a ta umožňuje pohyby oka a očního víčka (www.tumbledownfarm.com).

Žaludky ovce se nazývají bachor, kniha, čepec, sléz. Bachor zaujímá velkou část abdominální dutiny přežvýkavců. V něm se dočasně skladuje rychle zkonsumovaná potrava, později je vyvržena zpět do dutiny ústní, kde dochází k přežvykování a opětovnému spolknutí. Přežvykování se vyskytuje převážně při odpočinku. Zdravá dospělá ovce přežvykuje několik hodin denně. Bachor je rovněž velký fermentační prostor. Obsahuje množství mikroorganismů, zahrnujících bakterie a protozoa. Ty

umožňují trávení vláknité stravy. Fermentací v batoru vzniká obrovské množství plynu, který musí být odstraňován řháním.

Samice starší než jeden rok se nazývá ovce. Obvykle produkuje potomstvo. Jehnata jsou mláďata do jednoho roku. Proces rození mláďat se u ovcí označuje jako bahnění. Dospělí samci jsou berani, po vykastrování se jim říká skopci (www.sheep101.info).

2.1.3 Plemena ovcí

Existuje mnoho plemen ovcí, ta jsou obvykle dále členěna jako plemena na vlnu či maso. Hlavní plemena pro vlnu jsou: Merino, Rambouillet, Romney, Lincoln, Drystale, Herdwick. Plemena ovcí na maso zahrnují Beltex, Suffolk, Portland, Hampshire, Columbia, Texel, Montadale.

Chovatelé ovcí na vlnu a maso se soustředí na rychlý růst, hromadné a snadné bahnění a otužilost. Plemeno vyžadující malou péči je Coopworth, které má dobrou vlnu a masnou produkci. Dalším plemenem s dvojitou produkcí je Corriedale. Někdy jsou plemena rovnoměrně využívána pro oba účely a k maximalizaci výnosů je používáno druhové křížení. Např. Merino ovce poskytující vlnu mohou být kříženy se Suffolk berany k produkci jehnat, která jsou robustní a vhodná pro masný trh. Dorpers a Kahtahdins jsou smíšená plemena na vlnu a srst zkřížená s různým poměrem vlna/srst. Právě ovce na srst jako st. Croix, Barbados, Blackbelly, Mouflon, Santa Inez a Royal White shazují svá ochranná dolní vlákna či celou srst na jaře/létě. Ovce na srst se stávají stále populárnější díky tomu, že nemusí být stříhány (<http://en.wikipedia.org>).

2.1.4 Reprodukce

Ovis aries se rozmnožuje v závislosti na sezóně determinované délkou dne. Samice se stávají fertlní na začátku podzimu a zůstávají do období kolem zimního slunovratu. Říjový cyklus kolísá mezi 14 – 20 dny (průměrně 17 dní). Samci jsou plodní během celého roku a chovatelé užívají 1 berana k oplodnění až 25 – 35 ovcí. Březost trvá v průměru 148 dní, většina jehnat se narodí uprostřed jara. Jehnata dosahují pohlavní dospělosti během roku (Reavill 2000).

2.1.5 Krmení a pastva

Ovce domácí jsou extrémně odolné a mohou přežít na stravě sestávající pouze z celulózy, škrobu a dalších sacharidů jako zdroje energie a ze zdrojů dusíku, který nemusí být protein. Obecně se ovce krmí trávou na pastvách, mohou být krmeny řadou sen a ovsem. Pasoucí se ovce přijímají potravu v krátkém čase v obrovském množství. Pak odchází k odpočinku a opět přežvykují spolknutou hmotu. Ovce tráví čas přecházením mezi periodami pasení a přežvýkání. Pasou se asi 7 hodin denně. Mají velký a komplexní žaludek, jímž tráví vysoce vláknitou stravu, kterou ostatní zvířata neumí strávit. Jejich nenáročné nutriční požadavky přispívají k ekonomické důležitosti.

2.1.6 Chování

Ovis aries má vysoce vyvinuté stádní instinkty. Větší skupiny ovcí se pohybují ve skupinách raději než samostatně. Tyto stádní instinkty přispívají k jejich ekonomické hodnotě, protože jediný pastevec může kontrolovat velké stádo. Ovce jsou stresovány, když jsou separovány od ostatních, často hrabou kopyty (Reavill 2000).

Stádní instinkty jsou výhodné pro býložravce, silnější zvířata bojují o pozici ve středu stáda, což jim zajišťuje lepší ochranu před predátory.

Stádní chování vede k vytváření určitých rolí. Některé ovce chodí dál od stáda než ostatní kvůli pastvě, avšak poskytují možnost predátorovi zaútočit na ně jako první. Další ovce nikdy nechodí jako první, ale vždy následuje výše zmíněnou ovci. Když se pohne, ostatní se rovněž pohnou. Tradičně to býval vykastrovaný samec se zvoncem (<http://en.wikipedia.org>).

Sexuální chování je důležité pro reprodukci. Páření se vyskytuje pouze časně ráno a večer (Reavill 2000).

Ovce je rovněž jedním z mnoha zvířat, která mohou projevit preference pro homosexualitu, a jako u jedněch z mála byl tento výskyt systematicky sledován. Vyskytuje se u okolo 8% beranů.

2.1.7 Význam

Ovce jsou spojeny s mnoha kulturami, hlavně ve Středozeří a ve Velké Británii, kde tvoří nejběžnější typy stád. Zvýšení počtu ovcí na vlnu a maso se stalo hlavním

průmyslem v koloniální Austrálii a na Novém Zélandě. Výsledkem je, že ovce a jejich stříhání se stalo důležitou částí folklóru a kulturních tradic na Novém Zélandě, kde ovce převyšují lidskou populaci 12 : 1.

Ovce jsou důležité pro ekonomiku, poskytují mléko, vlnu, kůži (pro výrobu oblečení, obuvi, dek atd.) a maso. Ovčí trus je sterilizován a mixován s jinými drcenými materiály k výrobě papíru. Ovce hrají významnou roli v ekonomice menších států jako je Wales. V některých místech, např. v Sardinii, se chov ovcí stal hlavní zemědělskou aktivitou. V některých kulturách slouží ovce jako obětní zvíře (<http://en.wikipedia.org>).

Navíc k užitečnosti v zemědělství se ovce stávají důležitým nástrojem pro vědecký výzkum. Kvůli jejich větší velikosti a nízké pořizovací ceně tvoří ideální model (Reavill 2003).

2.1.8 Ovce domácí a parazit *Haemonchus contortus*

Infekce nematody jsou hlavním omezením zdraví přežvýkavců na celém světě. Mladá jehňata jsou velice citlivá k infekci vyvolané druhem *Haemonchus contortus*. Starší jehňata a ovce získávají imunitu po nepřetržité či sezónní expozici parazitem. Základní mechanismus vzniku imunity není kompletně znám. Protilátky, specifické imunoglobuliny IgA, IgE určitě hrají roli, význam IgG je méně jasný. Ovce s vyšší odpovědí lymfocytů indukovaných antigeny mají menší citlivost k infekci. Několik studií ukazuje, že imunita vůči *H. contortus* je spojená s mastocytózou a hypersenzitivními reakcemi. Odnedávna se zaměřuje zvýšená pozornost na roli cytokinů (interleukinů a γ -interferonů) v aktivaci specifických obranných mechanismů.

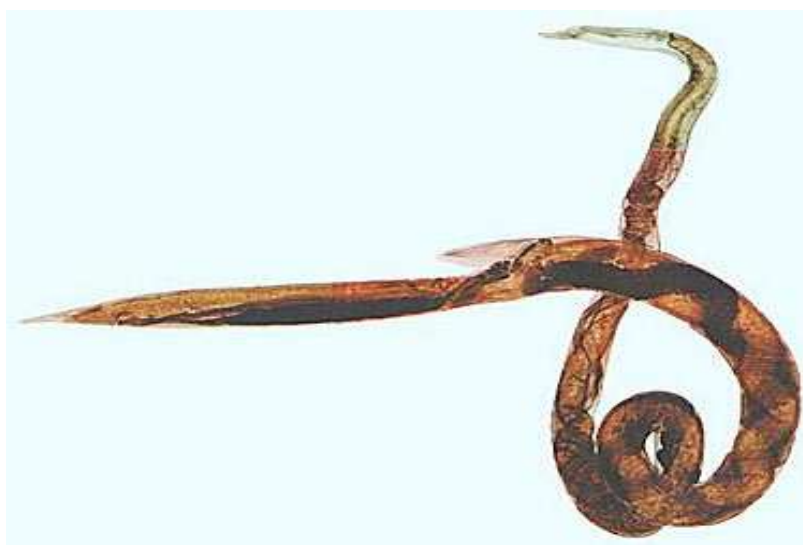
Neschopnost mladých ovcí zahájit významnou TH₂ odpověď, která je charakterizována vysokými IgE hladinami, mastocytózou a eosinofilií, může být považována za příčinu nereaktivnosti těchto zvířat (Shallig 2000).

S citlivostí a rezistencí k parazitu souvisí také změny v expresi genů. Počet exprimovaných genů se zvyšuje s rostoucí dobou expozice parazitem. Např. gen Ovar – DQA1 byl víc exprimován u rezistentních zvířat, což je z části důvod k vyšší frekvenci DQA1 nulových alel u citlivých zvířat. Bylo však dokázáno, že na citlivost zvířat mají homozygotní nulové alely vliv spíše ve spojení s polymorfismem v MHC regionu, než alely samotné (Keane et al. 2007).

2.2 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus, česky Vlasovka slézová, náleží mezi Nematoda, do třídy Secernatea, řádu Strongylitida, čeledi Trichostrongylidae. Je parazitem přežvýkavců (ovce, kozy a jiní divocí přežvýkavci), v nichž obývá sléz (Sendow 2003). Způsobuje poškození zvířat, a tím i velké ekonomické ztráty (www.wormboss.com.au). *Haemonchus* je přizpůsoben různým podmínkám – od tropických oblastí po studené, horské regiony. Navzdory širokému rozsahu životních podmínek je více rozšířen v teplých a vlhkých regionech než v studených a suchých. Byl nalezen v Asii (Indonésie, Indie), Evropě (Rusko, Itálie), Jižní Americe (Brazílie), i v Severní Americe (USA).

Haemonchus contortus je dlouhý válcovitý červ, s kutikulou z tří vnějších vrstev z kolagenu a dalších sloučenin. Vrstvy chrání parazita a mohou proniknout do trávicího traktu zvířat. Z důvodu sání krve má načervenalé zbarvení. Samičky jsou dlouhé 18-30mm, samečci jsou kratší, od 10 do 20mm (Sendow 2003).



Obr. 2: *Haemonchus contortus* – vlasovka slézová

2.2.1 Životní cyklus

Dospělí samci i samičky žijí ve slézu (4. žaludku přežvýkavců), kde se živí krví. Červi se páří a produkují vajíčka, dospělá samice klade za den 5-10 000 vajíček, která pronikají s výkaly na pastvu. Vajíčka se líhnou v půdě či vodě. Když je půda teplá a vlhká, z vajíček se kloubou L₁ larvy (1. nedospělé stadium) (www.aces.edu). Po svlečení

kutikuly se stávají L₂ larvami. Toto stadium prochází nekompletním svlékáním, které vede ke 3. larválnímu stadiu (L₃), což jsou infekční larvy (www.wormboss.com.au). Zůstávají v L₂ kutikule, která zajišťuje ochranné pouzdro a živiny, dokud se larvy nedostanou do ovce. Jejich pozřením se přežvýkavci infikují. V bacheru hostitele dochází ke svlékání, proces je stimulován vysokým pCO₂ a zvýšenou teplotou v hostiteli (Sendow 2003). L₃ larvy pak migrují do slézu, kde se živí mukózou a kde se svlékají na L₄ larvy. Ty závěrečným svlékáním dosahují dospělosti. Samice opět kladou vajíčka a celý cyklus se opakuje (www.zeldia.cap.ed.ac.uk).

Všechna larvální stadia (kromě L₃) se živí bakteriemi ve výkalech, dokud nezemřou či dokud neuniknou z výkalů na pastvu. Dospělci sají krev, živí se mukózou ve slézu. K rozrušení hostitelské tkáně používají dorzální zub.

Při ideálních podmínkách trvá vývoj z vajíčka do L₃ larev okolo 7 dní, ale v závislosti na vlhku a teple může trvat až 5 týdnů. Dešť uvolňuje vajíčka z výkalů na pastvu. Infekční larvy mají větší šanci, že budou polknuty ovce. Díky prohřátým pastvám a přítomnosti vlhka larvy migrují nahoru po trávě, kde jsou nejčastěji pozřeny. Za studených nocí směřují dolů k bazi listů.

Doba od infikace ovce po objevení se vajíček ve výkalech je 21-28 dní. To je důležité mít na paměti ze dvou důvodů:

- 1) Při krátké a efektivní léčbě mohou být ovce v čistém výběhu 21-28 dní bez strachu z infikace výběhu.
- 2) Pokud jsou ovce testovány na červy počítáním vajíček ve výkalech během 21-28 dní, může se ovce zdát bez červů, ačkoli v ní mohou být larvy. Proto se ovce otestuje za 4-6 týdnů, kdy začne kladení vajíček. Tím se získá lepší obraz o reinfekci (www.wormboss.com.au).

Haemonchus contortus je známý dobrou adaptací k nevlídným podmínkám, která ztěžuje eliminaci parazita. *Haemonchus* může přežívat i v pouštních oblastech. Toho může být dosaženo buď dlouhým přežitím dospělců se zachovanou schopností tvořit vajíčka, nebo inhibicí vývoje červa v hostiteli a zajištěním přežití v larválním stadiu. Usuzuje se, že hlavní roli v přechodu z jedné dešťové sezony do další hraje přežití dospělců během sucha, spíše než inhibice vývoje a přežití ve stadiu larev (Jacquiet et al. 1995).

2.2.2 Ovlivnění ovčí

Haemonchus způsobuje velké ekonomické ztráty u domácích zvířat, zvláště ovčí, koz a dobytka. Živí se krví, saje ji z mukózy žaludku a vyvolává anemii. Výživa 4.stadia a dospělců může být až 0,05 ml na jednoho červa, tzn. že 1000 červů může odsát až 50 ml krve ovce za den (www.wormboss.com.au). Důsledky parazitózy jsou anemie, bílé mukózní membrány, dásně a spojivky. Dochází k akumulaci tekutiny v submandibulární tkáni, břichu, hrudní dutině a vnitřních orgánech. Ovce ztrácí vytrvalost, typická je letargie, nekoordinovanost, hrubá srst, průjem a dehydratace. Značně se snižují váhové přírůstky, kvalita vlny a reprodukční schopnosti (www.aces.edu).

Je-li přítomno větší množství červů, ovce může zahynout. V těchto zvířatech jsou v žaludku viditelné velké, červené masy červů. U ovčí s lehčí infekcí jsou červi přítomní v žaludku, ale mukóza vypadá normálně. Žaludeční obsah je obvykle hnědý kvůli žaludečnímu krvácení a mukóza se vyznačuje nepatrnými krevními skvrnami. Více jsou patrné změny týkající se produkce ovčí. Pokud ovce vykazuje závažnější znaky, výsledek počítání vajíček ve výkalech je velice vysoký, často přes 10 000 vajíček na gram.

2.2.3 Diagnostika

Jediná správná cesta, jak diagnostikovat infestaci červy předtím, než se projeví ztráta produktivity, je provádět larvální kultury, identifikaci a počítání vajíček.

Počítání vajíček odhalí přítomnost parazita dříve, než dojde ke ztrátě produktivity a umožní producentům plánovat léčbu spíše než čelit krizi. Pro správnou identifikaci jsou ovčí výkaly v laboratoři vloženy do inkubátoru, kde dochází k vývoji vajíček. Identifikovány jsou larvy.

Tradičně se farmáři spoléhali na vizuální znaky (světlé dásně, oči a edém). Problém této diagnostiky byl, že když ovce vykazovaly tyto znaky, infestace byla už příliš velká (www.wormboss.com.au).

2.2.4 Kontrola a léčba hemonchózy

Vědci hledají způsoby ke zvládnutí parazita a minimalizaci nákladů. Postupy jsou založeny na zničení či přerušení životního cyklu červa:

- užitím chemických anthelmintik (úzké, střední, široké spektrum, krátce a dlouze působící)
- zdokonalením stáda a praktik na pastvě (např. druhově smíšené pastvy, střídání pastvin, dobrá hygiena)
- užitím rostlin s anthelmintickým účinkem (jetel, vikev, čekanka, *Sericea lespedeza* obsahují taniny, které redukuje počet žaludečních červů a produkci vajíček; krmení senem z těchto rostlin může snížit počet vajíček ve výkalech o 80% a zvýšit hematokrit) (www.aces.edu).

Poměrně velkým problémem je rezistence druhu *H. contortus* vůči anthelmintikům. Byl zkoumán efekt změn v genetické konstituci na fyziologické charakteristiky parazita v důsledku rezistence vůči benzimidazolovým anthelmintikům. Benzimidazol rezistentní *Haemonchus contortus* byl pro ovce značně víc nakažlivý než benzimidazol senzitivní kmen. Patologické změny na ovcích jsou víc závažné při infekci rezistentním kmenem parazita. Počet vajíček ve výkalech byl signifikantně vyšší u rezistentního *H. contortus*, stejně jako vývoj a přežití vajíček. L₃ larvy benzimidazol rezistentního *H. contortus* měly značně rychlejší svlékání v bachorové tekutině než senzitivní kmeny (Kelly et al. 1978).

2.2.4.1 FAMACHA systém jako nástroj kontroly parazita

FAMACHA systém byl vyvinut jihoafrickými vědci a veterináři. Monitoruje klinickou anémii (snížení počtu červených krvinek a hematokritu). Zkoumá se barva dolního očního víčka a srovná se s barevně zakódovaným schematem. Varianty barvy víčka od bledé po červenou určují stupeň anemie. Na základě tohoto schématu by měla být léčena pouze zvířata s anémií. To zabrání nadužívání anthelmintik a zároveň sníží šanci na vyvinutí rezistence parazita k anthelmintikům. Test má 90% efektivitu. Producenti by měli zkontrolovat 10% celkového počtu zvířat ve stádě každý 2. týden za použití FAMACHA systému. Fekální zkoušku může doprovázet FAMACHA zkouška (www.aces.edu).

2.2.4.2 Léčba anthelmintiky

K léčbě parazitózy vyvolané druhem *Haemonchus contortus* se užívají léčiva zvaná anthelmintika, konkrétně antinematoda. Mezi hlavní skupiny patří benzimidazoly,

včetně probenzimidazolů, tetrahydropyrimidiny, imidazothiazoly, makrocyclické laktony, organofosfáty a některé další struktury.

Benzimidazoly (BZ) vykazují vysokou aktivitu proti gastrointestinálním (GI) nematodům. Jsou efektivnější v menších dávkách podávaných delší dobu než při jednorázovém podání vyšší dávky. Metabolismus probíhá v játrech za účasti cytochromu P 450 a flavinmonooxygenas. Mechanismus účinku spočívá v ovlivnění polymerizace tubulinu. Rezistence na BZ je způsobena mutací v tubulinové molekule a také zvýšeným aktivním efluxem BZ z molekuly. Mezi BZ patří:

- thiabendazol (max. dávka u ovcí 44-66 mg/kg živé váhy): účinný proti dospělým GI nematodům
- mebendazol (max. dávka u ovcí 15 mg/kg živé váhy): efektivní vůči dospělcům a vyvíjejícím se stadiím nematod a cestod
- fenbendazol (max. dávka u ovcí 5 mg/kg živé váhy): první širokospektré anthelmintikum proti dospělcům, vyvíjejícím se i klidovým stadiím GI nematod, účinný i proti cestodům a trematodům
- oxfendazol =fenbendazol-sulfoxid (max. dávka u ovcí 5 mg/kg živé váhy): účinnost viz fenbendazol
- oxibendazol (max. dávka u ovcí 10 mg/kg živé váhy): proti dospělcům GI nematod a proti cestodům
- albendazol (max. dávka u ovcí 5 mg/kg živé váhy): účinnost podobná fenbendazolu, i anticestodní a antitrematodní aktivita, albendazol rezistentní *Haemonchus* se vyskytuje často
- flubendazol (dávka 5-22 mg/kg živé váhy): působí na GI nematoda, plicní červy a migrující larvy *Ascaris suum*, vykazuje i anticestodní aktivitu; jedná se o fluorovaný analog mebendazolu

Probenzimidazoly jsou prodrugs BZ, stávají se aktivní až po metabolické aktivaci (př. redukce nitroskupiny a cyklizace proléčiva). Oproti BZ mají lepší rozpustnost. K probenzimidazolům patří:

- thiofanát (max. dávka u ovcí 50 mg/kg živé váhy): jedná se o prekurzor konvertovaný cyklizací na ethylester kyseliny 2-benzimidazolkarbamové, vykazuje aktivitu proti dospělcům, vyvíjejícím se i klidovým stadiím
- febantel (max. dávka u ovcí 5 mg/kg živé váhy): prekurzor metabolizovaný v játrech na fenbendazol a jeho sulfoxid, účinnost viz thiofanát, vyskytuje se u něj zkřížená rezistence s thiabendazolem i jinými BZ

Tetrahydropyrimidiny představují další skupinu. K jejím zástupcům patří:

- pyrantel (max. dávka u ovcí 25 mg/kg živé váhy): účinný proti dospělcům, včetně thiabendazol rezistentních kmenů *H. contortus*, lze užívat profylakticky
- morantel (max. dávka u ovcí 10 mg/kg živé váhy): methylesterový analog pyrantelu proti dospělcům, částečně proti vyvíjejícím se stadiím

Imidazothiazoly zahrnují ve vztahu k *H. contortus* jedno významné léčivo:

- levamisol (max. dávka u ovcí 8 mg/kg živé váhy): účinný proti některým BZ rezistentním nematodům, působí na neuromuskulární spojení, zprvu jako ganglia stimulující látka, poté působí neuromuskulární inhibicí depolarizačního typu, což vede ke spastické kontrakci a následné paralýze svalů několika nematod

Makrocyclické laktony vykazují rovněž aktivitu i proti vnějším parazitům (tzv. endektocidy). Působí na nematoda, cestoda, trematoda i protozoa. Zahrnují skupinu avermektinů a milbemycinů/nemadektinů. K avermektinům používaným u ovcí patří:

- ivermektin (max. dávka u ovcí 0,2 mg/kg živé váhy): účinný proti dospělcům, klidovým i vyvíjejícím se stadiům GI nematod, působí i na BZ rezistentní kmeny *H. contortus*

Skupina milbemycinů/nemadektinů má pro užití u ovcí jediného zástupce:

- moxidektin (max. dávka u ovcí 0,2 mg/kg živé váhy): strukturně podobný milbemycinům, derivát přírodně se vyskytujícího nemadektinu, účinný proti dospělcům a lavám

Úzkospektrá anthelmintika zahrnují substituované fenolové deriváty a salicylanilidy, působící na rezistentní kmeny *H. contortus*. Patří k nim:

- disophenol (max. dávka s.c. u ovcí 10 mg/kg živé váhy): mechanismus působení vychází z rozpojení oxidativní fosforylace a inhibice fumarátreduktasy
- nitroxinil (max. dávka s.c. u ovcí 10 mg/kg živé váhy): účinný na ivermektin a BZ rezistentní kmeny *H. contortus*
- rafoxanid (max. dávka u ovcí 7,5 mg/kg živé váhy): účinnost viz nitroxinil, působí rozpojení oxidativní fosforylace
- closantel (max. dávka u ovcí 10 mg/kg živé váhy): proti dospělcům rezistentním na BZ, levamisol, morantel, ivermektin; poskytuje ochranu proti infekci ještě dva měsíce po léčbě

Organofosfáty mají úzké rozmezí bezpečnosti, obzvláště u ovcí. Inhibují acetylcholinesterasu – červi vykazují spastickou paralýzu a jsou odstraněni peristaltikou střeva. Užívají se samostatně či v kombinaci se širokospektrými anthelmintiky. Haloxon, coumafos, naftalofos působí u přežvýkavců proti dospělým stadiím, méně proti larvám GI nematod (Mehlhorn 2001).

2.2.4.3 Léčba pomocí mědi

Mnoho producentů má zkušenosti s rezistencí parazitů a neúčinností anthelmintik. Nedávno bylo vyzkoumáno, že nízké dávky částic oxidu mědi (COWP – copper oxide wire particles) mohou efektivně regulovat vlasovku slézovou u jehňat a kůzlat. COWP jsou běžně dostupné jako potravinový doplněk pro skot, byly vyvinuty kvůli deficitu mědi u ovcí a koz.

Levamisol podávaný s COWP odstaveným mláďatům byl velice efektivní v redukci infekce nematody po dobu 4 – 6 týdnů. Koncentrace mědi v játrech, což je nejlepší ukazatel její toxicity, byla na konci studie na bezpečné hladině pro zvířata. Užití COWP u dospělých ovcí je méně účinné (max. 50%) než u jehňat do jednoho roku.

Cu v COWP je ve formě, která se špatně absorbuje. Kvůli tomu je její podání bezpečnější, s menším rizikem toxicity v porovnání s CuSO_4 . COWP prochází z batoru do slézu, kde se zadržuje. Ve slézu se potom uvolňuje elementární měď. Koncentrace volné mědi vytváří prostředí, které způsobuje vyloučení i smrt červů. Cu v CuSO_4 se od COWP liší tím, že se snadno absorbuje a může vést rychle k toxicitě. Množství mědi potřebné v potravě a množství vedoucí k toxicitě u ovcí není příliš rozdílné, proto ovce velmi snadno podléhají toxicitě.

V některých oblastech USA by oxid mědi neměl být používán kvůli vysokým hladinám mědi v prostředí. Také některá plemena ovcí mohou být více náchylná k toxicitě. COWP by nemělo být podáváno zvířatům s neznámým statusem mědi, těm, jejichž potrava je obohacena jinou formou mědi a zvířatům trpícím žloutenkou, popř. jinou poruchou jater. Podání mědi nezávisí na dávce, což znamená, že jak zvíře roste, stále je efektivní malá dávka a zvýšení dávky může vést k toxicitě (Burke et al. 2006).

2.2.4.4 Další zkoumané způsoby léčby

Hemonchóza působí značné ekonomické ztráty, a proto se stále hledají další možnosti k eliminaci parazita. Jednou z nich je i snaha vyvinout vakcínu. Experimentálně

byla vytvořena vakcína z vnitřností parazita *H. contortus*. Jedna skupina ovcí byla imunizována, druhá tvořila kontrolní skupinu. Séra ovcí byla testována pomocí ELISA a western blottingu po imunizaci i po nákaze parazitem v průběhu celého pokusu. Na základě pitvy bylo prokázáno, že u imunizovaných ovcí došlo k 78% redukci počtu červů (Nayebzadeh et al. 2005).

2.3 Biotransformační enzymy

2.3.1 Charakteristika biotransformačních enzymů

Biotransformační enzymy jsou v organismu přítomny ve větším množství téměř ve všech buňkách. Vysokou aktivitu vykazují v játrech, plicích, ledvinách, kůži, placentě, srdci, GIT a jiných orgánech. Na subcelulární úrovni jsou biotransformační enzymy lokalizovány v endoplazmatickém retikulu, cytosolu a mitochondriích.

Typickými vlastnostmi enzymů metabolismu xenobiotik, kterými se liší od enzymů biotransformujících endogenní látky, jsou: nízká substrátová specifita, přítomnost v organismu ve větším množství, preference lipofilních substrátů a snadná indukovatelnost.

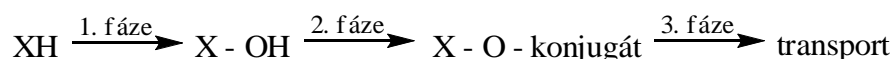
Při biotransformaci se uplatňují nejvíce tyto vlastnosti xenobiotik: lipofilita, geometrická struktura a elektrochemické vlastnosti.

Výsledkem enzymové katalýzy je deaktivace xenobiotika, změna jeho účinku, aktivace xenobiotika nebo jeho toxikace (Kvasničková 1995). Aktivace xenobiotika se využívá např. u proléčiv, kdy neúčinná transportní forma léčiva je v organismu biotransformována na formu účinnou. Také léčiva, která jsou terapeuticky aktivní již jako parentní látky, mohou být biotransformována na substanci aktivní, čímž dochází k prodloužení terapeutického účinku.

2.3.2 Přehled základních biotransformačních reakcí

Xenobiotika lišící se polaritou mají v organismu také odlišnou cestu biotransformace. Pokud je xenobiotikum dostatečně polární, je z organismu eliminováno beze změny, případně reaguje s endogenními sloučeninami za vzniku konjugátu, který je následně z organismu vyloučen. Jestliže xenobiotikum vykazuje lipofilitu vyšší, musí být nejprve pomocí enzymů tzv. první fáze přeměněno na produkt, který může být eliminován přímo nebo po reakci s endogenními sloučeninami (tzv. druhá fáze) na konjugát, který je následně vyloučen.

Schematicky znázorněný průběh biotransformace je na Obr. 3.



Obr. 3: Schéma biotransformace xenobiotik

Reakce 1.fáze:

V první fázi je xenobiotikum přeměněno příslušnými enzymy na polárnější produkt zavedením nebo odkrytím substituentů, které jsou schopny reagovat s konjugačními enzymy druhé fáze.

Reakce a enzymy 1.fáze:

- Hydrolytické reakce: hydrolýza esterů, amidů, cyklických sloučenin
Hydrolytické enzymy: arylesterasy, karboxyesterasy, acetylerasy, cholinesterasa
- Redukční reakce: redukce nitrosloúčenin, sulfoxidů, N-oxidů, azosloúčenin, karbonylových sloučenin
Redukční enzymy: alkoholreduktasa, aldehydreduktasa, chinonreduktasa, karbonylreduktasa, glutathionreduktasa,
- Oxidační reakce: N-oxidace, sulfoxidace, hydroxylace, dealkylace, oxidační deaminace
Oxidační enzymy: převážně cytochromy P450 a flavinové monoxygenasy

Reakce 2.fáze:

Ve druhé fázi reaguje substrát nebo metabolit první fáze s endogenními sloučeninami prostřednictvím konjugačních enzymů. Tyto reakce jsou reakce syntetické. Endogenními konjugačními sloučeninami jsou produkty metabolismu buňky, např. kyselina glukuronová, glutathion, aktivovaný sulfát, aktivovaný methionin, aminokyseliny aj. Energie potřebná pro průběh konjugačních reakcí je dodána buď aktivací konjugačního činidla nebo aktivací substrátu. Výsledkem konjugační reakce je konjugát (viz schéma na Obr. 3), který je v pH prostředí ionizován, není resorbován a je snadno z organismu vyloučen (Kvasničková 1995).

Reakce a konjugační enzymy 2.fáze:

- Glukuronidace: je zprostředkována enzymem *UDP-glukuronosyl transferasou* a substráty jsou sloučeniny s hydroxyskupinami, karboxyskupinami a aminoskupinami

- Sulfátová konjugace: je zprostředkována enzymem *sulfotransferasou* a substráty jsou alkoholy, fenoly, hydroxylaminy, alicyklické steroidy, arylaminy
- N-,O-,S-methylace: je zprostředkována enzymy *N-,O-,S-methyltransferasou* a substráty jsou endogenní biogenní aminy
- Konjugace s glutathionem: je zprostředkována enzymy *glutathion-S-transferasou* a *γglutamyl-transpeptidasou* a substráty jsou halogenované alkylsloučeniny, nenasycené alkeny, nenasycené alifatické, aromatické, alicyklické sloučeniny s ketoskupinou v postranním řetězci, epoxidy aromatických uhlovodíků, aromatické nitro-, aminokyseliny.
- Acetylace: je zprostředkována enzymem *acetyltransferasou*
- Konjugace s aminokyselinami nebo cukry: s glycinem, taurinem, glukózou (Kvasničková 1995)

Reakce 3.fáze:

Do třetí fáze metabolismu xenobiotik se v současné době řadí transport xenobiotik vzniklých v 1. a 2. fázi přes cytoplazmatickou membránu pomocí různých přenašečů.

Tyto transportéry jsou členěny do rodin na základě molekulární a funkční podobnosti. Příkladem mohou být OAT (organic anion transporter), MRP (multidrug resistance – associated protein), MDR (multidrug resistance protein), OATP (organic anion transporting polypeptide), OCT (organic cation transporter).

Z ATP-dependentních pump, které exportují xenobiotika, jsou významné P-glykoprotein, BCRP (breast cancer-resistance associated protein), MRP2, MRP4. Tyto transportéry přenáší přes membrány aniontová (MRP2, 4), kationtová (P-glykoprotein, BCRP) a nenabitá xenobiotika. OATP2, jiný organický aniontový přenašeč, má význam pro steroidní konjugáty, opioidní peptidy a srdeční glykosid digoxin (Baner et al. 2005).

2.3.3 Faktory ovlivňující biotransformační enzymy

Mezi hlavní faktory ovlivňující biotransformační enzymy jsou řazeny mezidruhové rozdíly, potrava, věk, pohlaví, genetické faktory, indukce a inhibice, zdravotní stav organismu (Kvasničková 1995). Roli hraje i hormonální kontrola a těhotenství (Gibson a Skett 2001).

2.3.3.1 Mezidruhové rozdíly

Mezidruhové rozdíly se týkají 1. i 2. fáze metabolismu a mohou být kvantitativní nebo kvalitativní. V 1. fázi například člověk metabolizuje hexobarbital pomaleji než pes, králičí hepatocyty přeměňují thiabendazol na 5-hydroxythiabendazol ve srovnání s potkanem 40x rychleji. Příkladem ovlivnění 2. fáze je sulfadimethoxin, který u člověka podléhá glukuronidaci, zatímco u potkana, morčete a králíka tvorba glukuronidů neprobíhá (Gibson a Skett 2001).

Mezidruhově rozdílné je i působení xenobiotik jako induktorů a inhibitorů enzymů. Např. benzodiazepiny diazepam a oxazepam jsou induktory CYP2B u potkanů, u myši je indukován jak CYP2B tak i CYP4A (Parkinson et al. 2006).

Mezidruhové rozdíly jsou příčinou problematické extrapolace dat získaných ve studiích aktivit u experimentálního druhu na cílový druh. Některé enzymové přeměny stejného substrátu jsou určitým druhem organismu preferovány více než u jiného druhu. Na rozdíl od vysokých aktivit některých enzymů u experimentálního druhu mohou být u druhu cílového na hranici detekce nebo zcela chybět (Machala et al. 2003). Velké rozdíly byly pozorovány také mezi blízkými příbuznými druhy (Szotáková et al. 2004), dokonce mezi etnickými skupinami (Yamaori, 2005).

2.3.3.2 Potrava

O vlivu základních živin v dietě nejsou často výsledky jednoznačné. Dieta bez tuků nebo bez nenasycených mastných kyselin působí pokles aktivity cytochromu P450 (Kvasničková 1995).

Cukry ovlivňují aktivitu mikrosomálních monooxygenas *in vitro* nepatrně. Zvýšený příjem glukózy může snížit metabolismus barbiturátů. Ovlivnění enzymů cukry se děje na základě ovlivnění intermediárního metabolismu a hormonální rovnováhy, ne přímým efektem na játra.

Snížený přísun proteinů působí snížení aktivity oxidačních enzymů. Mechanismus spočívá v celkovém snížení mikrosomálních proteinů a ve specifickém efektu na zbývající enzymy. Výsledkem je pomalejší odbourávání xenobiotik v organismu (Gibson a Skett 2001).

Krátkodobé hladovění neovlivňuje aktivitu většiny enzymů, dlouhodobější mění aktivitu mikrosomálních monooxygenas a enzymů glukuronové konjugace (Kvasničková 1995).

2.3.3.3 Pohlaví

Závislost aktivity biotransformačních enzymů na pohlaví je spojena s velkou mezidruhovou variabilitou. Např. u potkana byly popsány isoformy CYP specifické pro samce (2A2, 2C11, 2C13, 3A2 a 4A2) a jiné pro samice (2C12) (Parkinson 1996). Pohlaví je také hlavním faktorem pro expresi *CYP3A4* u lidí (Wolbold et al. 2003).

Expresí genů pohlavně specifických isoform jsou závislé na přítomnosti androgenů v krvi a hormonech, které jejich hladinu regulují (Kvasničková 1995).

2.3.3.4 Věk

Staří a mladí jedinci jsou více náchylní k působení léčiv. Zvýšená citlivost mladých jedinců, obzvláště novorozenců, souvisí s velmi nízkou či neměřitelnou metabolisující kapacitou (Gibson a Skett 2001).

S věkem se snižuje aktivita enzymů první fáze a klesá celkové množství cytochromu P450 (je to dáno postupným úbytkem hladkého endoplasmatického retikula, kde jsou biotransformační enzymy lokalizovány). Vztah věku a druhé fáze metabolismu je nejednoznačný (Kvasničková 1995). Jak uvádí Sobocanec se spolupracovníky (2003), v myším mozku se aktivita glutathionperoxidasy mění s věkem, u zvířat starých 18 měsíců je pozorován také vliv pohlaví (vyšší aktivita u samic). Aktivita katalasy se snižovala s věkem u samců a zvyšovala u samic.

2.3.3.5 Genetické faktory

V souvislosti s geneticky podmíněnými změnami metabolismu xenobiotik je možné v populaci nalézt dva fenotypy: skupinu jedinců s pomalým metabolismem a s rychlým metabolismem. Molekulární podstatou je mutace genu, který odpovídá za strukturu daného enzymu. Byla objasněna u několika typů genetického polymorfismu: např. u cytochromu CYP2D6, CYP2C8 a u N-acetyltransferasy.

2.3.3.6 Indukce

Enzymová indukce má významnou úlohu ve vývoji a diferenciaci buněk, v regulaci klíčových metabolických dějů, zasahuje do mechanismu účinku řady hormonů a je i adaptivní odpovědí organismu na některá xenobiotika, kterou se brání před jejich kumulací a toxicitou. Enzymová indukce se definuje jako zvýšení aktivity specifického enzymu, které je výsledkem zvýšení jeho syntézy, snížením jeho degradace či pozitivní modulací hotového enzymu (Kvasničková 1995).

Pro většinu enzymů je induktorem její substrát. Tím substrát urychluje svou vlastní biotransformaci a zároveň i jiných xenobiotik, která jsou substrátem týchž enzymů (Kvasničková a Šroler 1992).

Léčiv, která indukují svůj vlastní metabolismus či biotransformaci jiných látek, je celá řada. Příkladem mohou být fenylobutazon, rifampicin, karbamazepin, fenytoin, griseofulvin, spironolakton, chlorimipramin, testosteron, vitamin C a mnoho sedativ a hypnotik - barbituráty, chloralhydrát, dichloralfenazon, glutethimid, meprobamát.

Velmi často je modulována aktivita ve skupině cytochromů P450. Většina cytochromů P450 je indukována na úrovni transkripční aktivace (Gibson a Skett 2001).

Rozsah indukce závisí na vlastnostech xenobiotika, jeho koncentraci a užitém modelovém systému (Baliharová et al. 2003).

Změněná enzymová aktivita může mít vliv na metabolismus endogenních látek a jiných xenobiotik.

2.3.3.7 Inhibice

K inhibici může docházet několika způsoby, od kompetice substrátů, přes destrukci enzymu a zástavu syntézy až po inaktivaci enzymu vytvořením komplexu (Gibson a Skett 2001).

Kompetitivní inhibice mezi dvěma xenobiotiky, která jsou biotransformována stejným enzymem, trvá jen krátkou dobu, po eliminaci inhibitoru se obnoví funkce enzymu. Také může docházet k tvorbě komplexů enzym-intermediární metabolit. K obnovení katalytické aktivity dochází po disociaci komplexu. Autokatalytická inaktivace je ireverzibilním druhem inhibice. K obnovení katalytické aktivity dochází až po nasyntetizování enzymu *de novo*.

Různá xenobiotika vystupují jako inhibitory specifické (např. chloramfenikol, makrolidová antibiotika, α -naftoflavon) nebo nespecifické (např. CO, aminobenzotriazol, n-oktylamin) (Parkinson 1996).

Enzymy jsou rovněž regulovány endogenními látkami. Interferony a interleukiny produkované při virových infekcích vedou ke snížení mRNA cytochromu P450 na transkripční úrovni.

Inhibice enzymu jednou látkou může narušit biotransformaci druhé látky a může tak vést ke zvýšení farmakologické nebo toxické odpovědi organismu na druhou látku (Gibson a Skett 2001).

V některých případech rozhodují ještě další okolnosti (koncentrace xenobiotika), zda dané xenobiotikum (např. albendazol) bude působit jako induktor nebo inhibitor (Baliharová et al. 2005).

Biologický význam indukce a inhibice spočívá v možném vzniku lékové tolerance, v odlišné terapeutické odpovědi na léčiva, v interakcích mezi léčivy a v toxicitě (Gibson a Skett 2001).

2.3.4 Vliv parazitózy na biotransformační enzymy hostitele

Parazitické infekce mohou měnit schopnost hostitele metabolizovat léčiva na základě ovlivnění biotransformačních enzymů. Tyto změny mohou mít různé farmakologické, toxikologické či fyziologické důsledky. Obecně se uvažovalo, že patologické změny snižují aktivitu CYP i jiných biotransformačních enzymů. Pozdější studie ukázaly, že vliv parazitismu není jednoznačný. Může docházet jak k enzymové inhibici, tak i indukci, či aktivita enzymů zůstává nezměněna.

Příkladem je infekce *Fasciola hepatica* v ovcích, která vede ke snížení exprese a aktivity CYP3A v jaterních mikrosomech, zatímco aktivita GST v jaterním cytosolu zůstává nezměněna.

Další studovanou parazitózou byla dikrocelióza, vyvolaná druhem *Dicrocoelium dendriticum*. Z osmi sledovaných enzymů došlo pouze u dvou k významné změně aktivity vlivem parazita. U muflonů s infekcí bylo sledováno zvýšení aktivity (53%) thiobenzamid-S-oxidasy, odpovídající převážně aktivitě FMO, a snížení aktivity (60%) glutathion-S-transferasy (GST).

Pokles aktivity GST může signifikantně snížit biotransformaci léčiv, která jsou převážně konjugována s glutathionem, zpomalit jejich eliminaci a prodloužit přítomnost v těle. To vede k většímu riziku reziduí ve zvířecích produktech (Skálová et al. 2007).

2.4 Přehled biotransformačních enzymů

2.4.1 Oxidační enzymy

2.4.1.1 Cytochromy P450

Systém cytochromu P450 (CYP) společně s NADPH-cytochrom P450-reduktasou zprostředkovává oxidační reakce 1.fáze metabolismu různých xenobiotik, ale i endogenních sloučenin. Nejběžnější reakcí katalyzovanou CYP jsou monooxygenasové reakce, což znamená vložení jednoho atomu kyslíku do substrátu, zatímco druhý kyslíkový atom je redukován na vodu. Další katalytickou funkcí jsou oxytransferasové a reduktasové reakce (<http://en.wikipedia.org>).

Jsou to hemoproteiny, v nichž je železo ve formě Fe^{3+} . Po redukcí na Fe^{2+} může cytochrom P450 vázat ligandy jako je O_2 nebo CO. Komplex mezi Fe^{2+} a CO vykazuje absorpční maximum při $\lambda = 450$ nm. Všechny ostatní hemoproteiny, které váží CO, vykazují absorpční maximum při $\lambda = 420$ nm (Parkinson 1996).

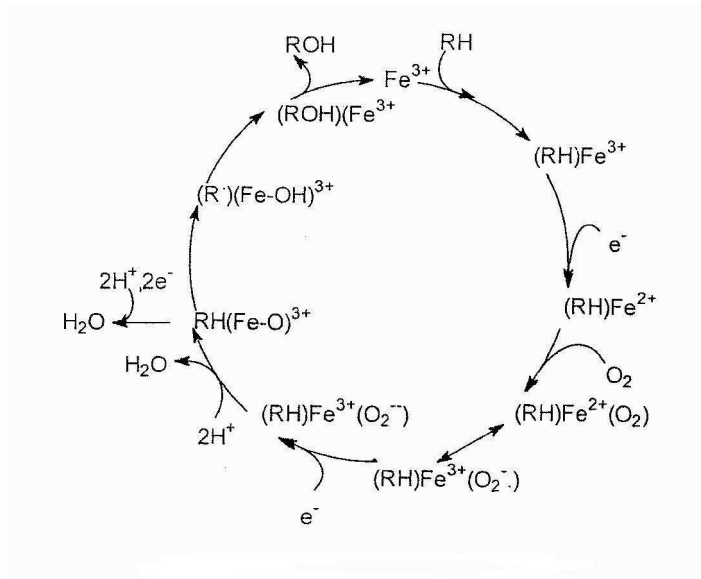
Cytochrom P450 se vyskytuje téměř ve všech živých organismech. Výjimku tvoří helminti. Savčí cytochromy jsou vázány na membránu endoplasmatického retikula a mitochondrií. Nachází se ve většině tkání a orgánů (Testa 1995).

Nomenklatura vychází z podobnosti sekvencí aminokyselin v bílkovinné molekule. Enzymy jsou řazeny do rodin (shodnost sekvence aminokyselin > 40 %), podrodin (shodnost sekvence aminokyselin > 60 %) a dále členěny na jednotlivé isoformy (Kvasničková 1995).

Pro označení cytochromu P450 se používá zkratka CYP, za zkratkou následuje arabská číslice označující rodinu, velké písmeno označující podrodinu a arabská číslice označující konkrétní isoformu.

K substrátům cytochromu P450 patří endogenní sloučeniny - steroidní hormony, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, vitaminy, eikosanoidy, retinoidy a další, ale i řada xenobiotik - léčiva, pesticidy, karcinogeny, potravní aditiva, látky znečišťující životní prostředí (Vaz et al. 1996).

Na Obr. 4 je znázorněn katalytický cyklus cytochromu P450.



Obr. 4: Katalytický cyklus cytochromu P450 (Kvasničková 1995)

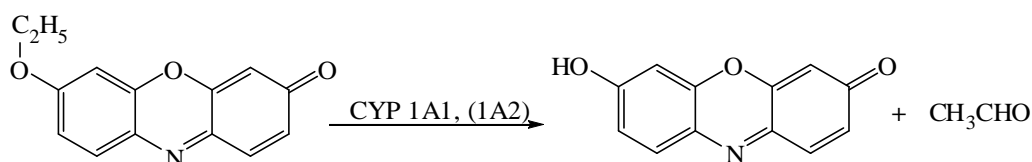
Sledované cytochromy P450 a jejich substráty

V této práci byla sledována aktivita isoform CYP1A1, 1A2, 2C9, 2E1 a podrodin CYP2B a 3A.

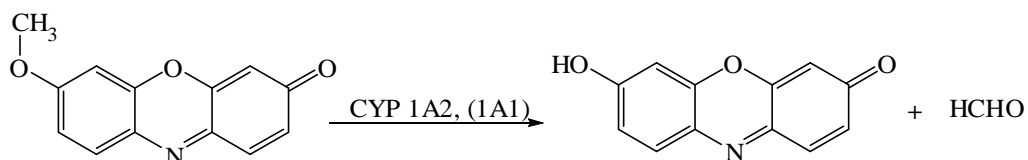
CYP 1A - Savčí druhy mají dvě indukovatelné isoformy: **1A1**, **1A2**. Jejich výskyt je rozdílný mezidruhově i mezi jednotlivými orgány v rámci téhož druhu, případně se liší aktivitou. Např. v lidských játrech je vysoká hladina CYP1A2, ale nevyskytuje se CYP1A1, která je spíše přítomna v plicích, střevní stěně, kůži, lymfocytech a placentě. Naopak CYP1A2 se nevyskytuje extrahepatálně (Parkinson 1996).

CYP1A1 se vyznačuje schopností aktivovat sloučeniny z prostředí, např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), na reaktivní metabolity, které interagují s DNA. PAH zároveň působí jako induktory této isoformy (Gibson a Skett 2001).

Na následujících obrázcích (Obr. 5, Obr. 6) je zachycena biotransformace substrátů použitých v této práci pro stanovení aktivity CYP1A1 a CYP1A2.



Obr. 5: O-dealkylace 7-ethoxyresorufinu na resorufin (ethoxyresorufindeethylasa- EROD)



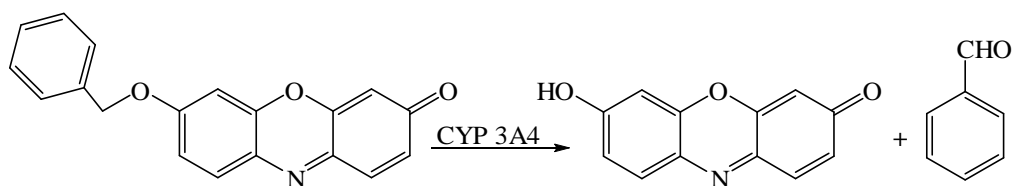
Obr. 6: O-dealkylace 7-methoxyresorufinu na resorufin (methoxyresorufindemethylasa - MROD)

CYP 2B – Tato podrodina je jednou z největších v rámci nadrodiny P450. Tento enzym je zodpovědný za mikrosomální PROD aktivitu (pentoxyresorufindepentylasová aktivita), je indukovatelný phenobarbitalem a jeho exprese je sex-dependentní (u myši je CYP2B dependentní PROD aktivita prokazatelně vyšší u samic a kastrovaných samců než u samců). Za metabolizaci pentoxyresorufinu u tohoto živočišného druhu zodpovídá především CYP2B10 isoforma (Honkakoski et al. 1992).

CYP 3A - Tento enzym je z cytochromů nejvýznamnější v biotransformaci steroidů a xenobiotik, jeho podíl na biotransformaci léčiv cytochromy je více než 50%. Inhibiční účinek na tento enzym vykazuje ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, cimetidin, klarithromycin, erythromycin, grepfruitová šťáva, naopak účinek indukční dexamethason, karbamazepin, rifampicin, rifabutin, ritonavir a další (www.fda.gov/cder/drug/drugReactions).

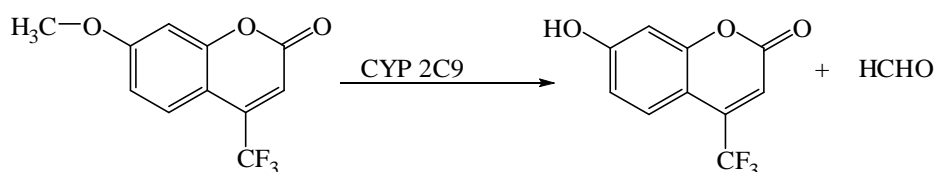
Metabolizuje jak endogenní látky, př. testosteron, tak xenobiotika, př. aflatoxiny (Gibson a Skett 2001).

Na následujícím schématu je zachycena biotransformace benzyloxyresorufinu použitého pro stanovení aktivity CYP3A.



Obr. 7: O-dealkylace benzyloxyresorufinu na resorufin (benzyloxydearylasa – BROD)

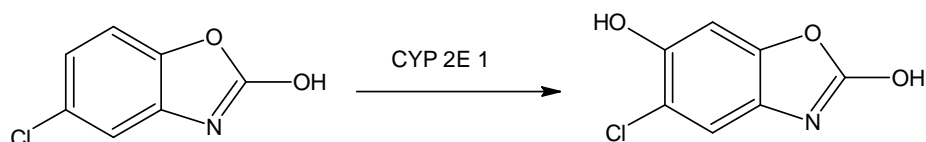
CYP 2C9 – Tento isoenzym je polymorfní, jeho množství, funkce a regulace se liší u jednotlivých živočišných druhů. Enzym se účastní oxidativního metabolismu řady léčiv, například fenytoinu, (S)-warfarinu a nesteroidních antiflogistik. Je inhibován např. sulfafenazonem a flukonazolem. Tato isoforma chybí u 1 % bělochů a afroameričanů. Aktivitu této isoformy jsme zjišťovali na základě biotransformace 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarinu (MFC) na 7-hydroxy-4trifluoromethylkumarin (HFC), viz Obr. 8 (www.fda.gov/cder/drug/drugReactions).



Obr. 8: O-dealkylace 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarinu

CYP 2E1 – Tento enzym se podílí na metabolismu menších organických molekul. Je indukovatelný acetonem, ethanolem a isoniazidem. Množství proteinu CYP 2E1 v játrech je u alkoholiků 4x vyšší než u abstinentů (Gibson a Skett 2001). K inhibitorům patří cimetidin a disulfiram (<http://en.wikipedia.org>).

Kromě chlorzoxazonu CYP2E1 metabolizuje acetaminofen, theofylin a těkavá anestetika, jako enfluran, sevofluran, methoxyfluran a isofluran (Yuan et al. 2002). Dalšími substráty je např. paracetamol, nitrosaminy, benzen, ethylen glykol (Gibson a Skett 2001). Jeho aktivita se měří na základě 6-hydroxylace chlorzoxazonu. Produktem reakce je 6-hydroxychlorzoxazon (Obr. 9).



Obr. 9: Hydroxylace chlorzoxazonu na 6-hydroxychlorzoxazon katalyzovaná CYP 2E1

2.4.1.2 Flavinmonooxygenasa (FMO)

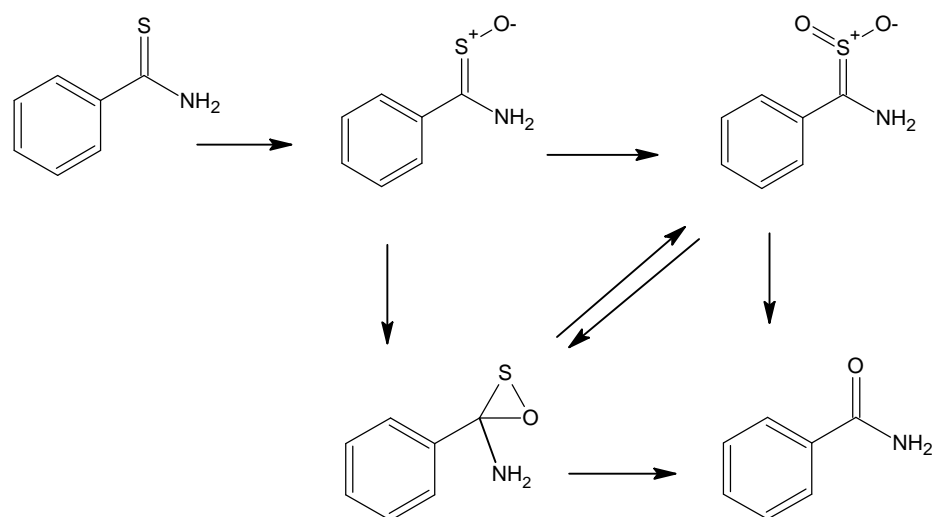
Flavinmonooxygenasa (FMO) je dalším významným enzymem 1.fáze biotransformace. Je obsažena v játrech, ledvinách a plicích. Je představována pěti enzymy označovanými FMO1 až FMO5.

Koenzymem flavinových monooxygenas je flavinadeninukleotid (FAD). Tento FAD je redukován NADPH (donorem elektronu) na FADH₂, ten reaguje s kyslíkem a vzniká nejdůležitější meziprodukt FAD-OOH (4 α -hydroperoxid), který reaguje se substrátem za vzniku oxygenovaného produktu. 4 α -Hydroperoxid flavinu se mění na 4 α -hydroxid flavinu (FAD-OH), který se dále regeneruje na FAD odštěpením H₂O.

Substrátem mohou být sloučeniny rozmanitých fyzikálně-chemických vlastností i biologických účinků, avšak všechny musí obsahovat nukleofilní centrum, které je často tvořeno heteroatomem. K reakcím katalyzovaným FMO patří oxidace aminů, sulfidů, sulfoxidů, thiolů sulfenových kyselin, disulfidů, thioamidů a thiokarbamidů. (Kvasničková 1995).

FMO katalyzuje řadu reakcí, které jsou také katalyzovány cytochromem P450. Hlavní rozdíl je, že FMO neoxiduje uhlíkové atomy a nejsou indukovatelné léčivý a kontaminanty životního prostředí (<http://en.wikipedia.org>). FMO je tepelně labilní, je inhibovatelná teplem. Naopak cytochrom P450 je inhibovatelný neionickým detergentem, který na FMO nepůsobí. Dále je pro katalýzu důležité pH, jehož optimum pro FMO je 8 - 10, pro většinu cytochromů P450 je 7 – 8 (Parkinson 1996).

Na následujícím obrázku (Obr. 10) je zachycena biotransformace substrátu použitého pro stanovení aktivity FMO.



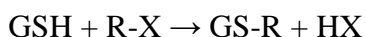
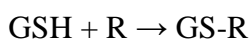
Obr. 10: Biotransformace thiobenzamidu (Parkinson, 1996)

2.4.2 Konjugační enzymy

2.4.2.1 Glutathion-S-transferasa (GST)

Glutathion-S-transferasa je enzym druhé fáze biotransformace katalyzující konjugaci s glutathionem. Ten je silným nukleofilním konjugačním činidlem, které reaguje s látkami obsahujícími elektrofilní atom (C, O, N, S).

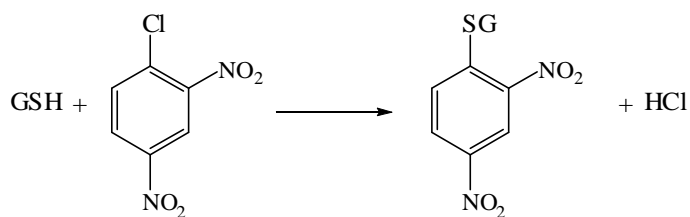
Glutathion transferasy katalyzují tvorbu thioetherových konjugátů mezi glutathionem (GSH) a reaktivním xenobiotikem, nebo odstranění elektrofilní skupiny ze sloučeniny. Substráty GST jsou hydrofobní, obsahují elektrofilní atom a reagují s glutathionem v určitém měřitelném poměru i neenzymaticky. Vhodnými substráty jsou halogenované alkylsloučeniny, nenasycené alkeny, nenasycené alifatické, aromatické, alicyklické sloučeniny s ketoskupinou v postranním řetězci, epoxidy aromatických uhlovodíků, aromatické nitrokyseliny, aminokyseliny (Kvasničková, 1995).



Hlavní biologickou funkcí je zajištění obrany proti elektrofilním sloučeninám. Konjugace vede k produktům s nižší aktivitou, a tudíž k detoxikaci. Avšak v některých případech GST tvoří intermediát, který je více reaktivní než parentní sloučenina, a jde tedy o toxikaci.

GST jsou v organismu v mnoha tkáních (játra, ledviny, plíce a varlata). Z naprosté většiny se jedná o cytosolické enzymy, homodimery či heterodimery. Jsou složené z maximálně 25 kDa podjednotek patřících do strukturních tříd: α , μ , π , σ , Θ . K označení podjednotek se užívají arabské číslice. Velká písmena A (α), M (μ), P (π), S(σ), T (Θ) symbolizují třídu (Forkert et al. 1999).

Konjugáty s glutathionem nejsou konečným produktem biotransformace, na rozdíl od ostatních konjugátů. Účinkem γ -glutamyltranspeptidasy je konjugát s GSH dále transformován. Nejprve dojde k odštěpení glutamátu, v dalším stupni glycinu a zbylý cystein-S-konjugát je acetyltransferasou acetylován a vzniká příslušná merkapturová kyselina, viz Obr. 11 (Kvasničková 1995).



Obr. 11: Konjugace GSH s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (Kvasničková 1995)

2.4.2.2 UDP-glukuronosyltransferasa

UDP-glukuronosyltransferasa (UGT) je enzym 2.fáze biotransformace katalyzující glukuronidaci. Největší aktivitu má v játrech, dále v ledvinách, gastrointestinálním traktu a kůži. Více než 90% celkové aktivity UGT je lokalizováno na membránách hladkého a drsného endoplasmatického retikula. Kofaktorem UGT je uridindifosfátglukuronová kyselina, která vzniká dehydrogenací UDP-glukosy.

Tvorba glukuronidů je považována za nejčastější konjugační reakci. Glukuronidace představuje přenos glukuronosylu z uridinfosfoglukuronátu na vhodný nukleofilní akceptor (např. hydroxyl, karboxyl, aminoskupinu), přitom dochází k inverzi na anomerickém uhlíku cukerného zbytku. Vznikají O-, N-, S- a C- glukuronidy.

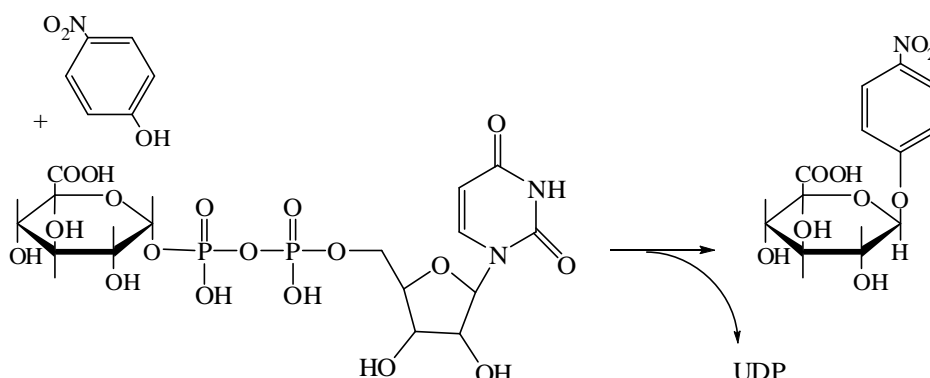
Substrátem jsou nejen xenobiotika, např. fenoly, trichlorethanol, morfin, nesteroidní antiflogistika, chloramfenikol, ale i řada eobiotik, např. bilirubin, steroidní hormony, žlučové kyseliny a hormony štítné žlázy.

Vzniklé konjugáty jsou většinou polární, disociované. Často právě až konjugační reakce vedou k detoxikaci, neboť v první fázi biotransformace mohou vznikat toxikologicky aktivnější substance než látky parentní, jako je tomu např. u polycyklických aromatických uhlovodíků. Z organismu jsou konjugáty následně vylučovány močí a žlučí (Kvasničková 1995).

UDP-glukuronosyltransferasy jsou rozděleny do dvou rodin, UGT1 a UGT2. UGT1 rodina vzniká z jednoho genu na základě odlišného sestřihu mRNA. UGT2 rodina se liší tím, že mRNA této rodiny jsou transkribovány z jednotlivých samostatných genů (King et al. 2000).

Mutace, která vede k nízké expresi či malé aktivitě UGT1A1, má za následek porušenou glukuronidaci a vznik Crigler-Najjarova či Gilbertova syndromu. Mutace v UGT1A7 zvyšuje riziko kolorektálního karcinomu, zatímco UGT1A9 hraje roli v metabolismu určitých karcinogenních aminů (Kurkela et al. 2003).

Na následujícím obrázku (Obr. 12) je zachycena glukuronidace substrátu použitého pro zjištění aktivity UGT.



Obr. 12: Schéma konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou (Kvasničková 1995)

2.4.3 Redukční enzymy

Redukční enzymy katalyzují redukční reakce, patřící do první fáze metabolismu. K nejdůležitějším reakcím patří: redukce dvojně vazby, chinonů, karbonylové skupiny, peroxidů, dusíkatých funkčních skupin, funkčních skupin obsahujících síru a selen, anorganických a organokovových sloučenin, dehalogenace, deoxygenace arenoxidů.

Významnou skupinou jsou enzymy účastnící se redukce karbonylu. Aldehydy a ketony jsou pro buňky škodlivé, protože se mohou kovalentně vázat se sekundárními aminoskupinami a thiolovými skupinami v proteinech. Navíc některé aldehydy jsou mutagenní díky své schopnosti interagovat s DNA. Ochranu proti reaktivním karbonylovým sloučeninám zajišťují právě některé redukční enzymy (např. aldo-keto reduktasy, aldehyd dehydrogenasa, alkohol dehydrogenasa), podílejí se tudíž na detoxikačních procesech (O' Connor et al.1999)

Karbonylové sloučeniny jsou metabolizovány na odpovídající alkoholy NAD(P)H dependentními enzymy, které se řadí do tří nadrodin:

- Dehydrogenasy/ reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
- Dehydrogenasy/ reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)
- Aldo-keto reduktasy (AKR)

SDR nadrodina: Typickým strukturním znakem je Rossmannův záhyb s centrálním β skládaným listem a konzervativní katalytická tetráda Asn-Ser-Tyr-Lys. Členy této

nadrodiny jsou např. CR1-3 (karbonylreduktasy), 11 β -HSD 1 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typ 1), L-xylulosa reduktasa (Matsunaga et al. 2006).

MDR nadrodina: Zahrnuje rodinu alkoholdehydrogenas (ADH), která tvoří komplexní systém rozčleněný do několika tříd. ADH1 je enzym zodpovědný za metabolismus ethanolu v játrech. ADH2 je jaterní enzym, který se podílí na metabolismu ethanolu a retinoidů. ADH3 je glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa. ADH4 je hojná v mukóze horní části gastrointestinálního traktu a v oku. ADH7 byla popsána pouze u kuřecích embryí, ADH8 u obojživelníků (Crosas et al. 2001).

AKR nadrodina: AKR nadrodina je skupina NAD(P)H-dependentních oxido-reduktas, které metabolizují uhlovodíky, steroidy, prostaglandiny, další endogenní aldehydy a ketony a xenobiotika (Matsunaga et al. 2006).

Označení aldo-keto reduktas obsahuje za zkratkou AKR arabskou číslici symbolizující rodinu, následuje písmeno označující podrodinu a další arabská číslice reprezentuje proteinovou sekvenci. V současnosti je známo 15 rodin (www.med.upenn.edu/akr).

Struktura aldo-keto reduktas se vyznačuje charakteristickým uspořádáním α -helixů a β -skládaných listů do tzv. (α/β)₈-soudků (Jez et al. 1997).

Největší rodinou je AKR1, která je dále členěna na podrodiny:

- AKR1A – savčí aldehydreduktasy
- AKR1B – savčí aldosoreduktasy
- AKR1C – hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD) a PGF synthasy
- AKR1D – Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktasy
- AKR1E – myší ketoreduktasy (Matsunaga et al. 2006)

Nejlépe popsanými enzymy v rámci AKR je aldehydreduktasa AKR1A1 a aldosoreduktasa AKR1B1. AKR1A1 přednostně katalyzuje NADPH-dependentní redukci alifatických a aromatických aldehydů, biogeních aminů, zatímco AKR1B1 spíše NADPH-dependentní redukci aldopentos a aldohexos. Hydroxysteroiddehydrogenasy z podrodiny AKR1C (dříve dihydrodioldehydrogenasy – DD) katalyzují přeměny derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, steroidních hormonů a žlučových kyselin. U člověka existují přinejmenším 4 isoenzymy: AKR1C1 (DD1, 20 α -

hydroxysteroiddehydrogenasa - 20 α -HSD), AKR1C2 (DD2, žlučové kyseliny vázající protein), AKR1C3 (DD3, 3 α -HSD typ II, 17 β -HSD typ 5, DD typ X, prostaglandin-F-synthasa) a AKR1C4 (DD4, 3 α -HSD typ I) (O'Connor et al.1999).

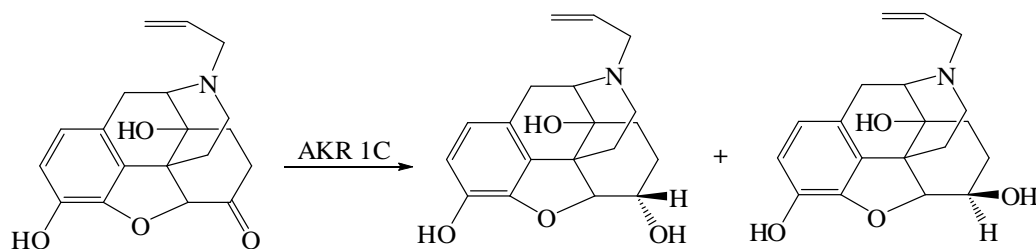
Mnoho ze savčích AKR jsou potenciálním terapeutickým cílem. Aldosoreduktasy (ADR) konvertují cirkulující glukosu na sorbitol, hyperosmotický cukr a mohou hrát roli při diabetické retinopatii, neuropatii a nefropatii. Jako takové by se ADR inhibitory mohly osvědčit v léčbě těchto komplikací diabetu (Jez et al. 1997).

V této práci jsme zjišťovali aktivity AKR1A1, 1C1, 1C2, 1C3, 1C4, 3 α -HSD z nadrodiny AKR. Z nadrodiny SDR jsme se věnovali 11 β -HSD 1 a CR. Kromě uvedené nomenklatury mohou být enzymy označovány dle substrátů, uvedených dále.

2.4.4 Substráty použité pro stanovení aktivit redukčních enzymů

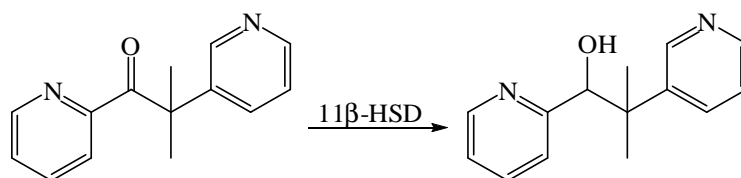
Naloxon je ve vodě rozpustná pevná látka o Mr = 364 g/mol. Terapeuticky je využíván jako antidotum narkotik morfinového typu a jako diagnostikum morfinové závislosti.

Naloxon je v lidských játrech redukován cytosolickými dihydrodioldehydrogenasami (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4) na 6 α -naloxol a 6 β -naloxol (Ohara et al. 1995). Tuto přeměnu znázorňuje Obr. 13.



Obr. 13: Redukce naloxonu na 6 α -naloxol a 6 β -naloxol (Felsted, Bachur 1980)

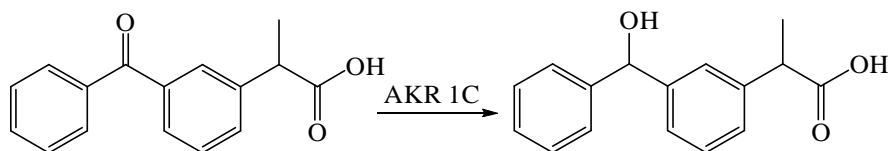
Metvrapon (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon) je redukován na alkoholický metabolit metvrapol (viz Obr. 14) jak cytosolickými, tak mikrosomálními enzymy náležícími do nadrodiny aldo-ketoreduktas (cytosolické dihydrodioldehydrogenasy a karbonylreduktasa) a krátkořetězcových dehydrogenas/reduktas (mikrosomální 11 β -HSD) (Maser a Oppermann 1997a).



Obr. 14: Redukce metyraponu na metyrapol

Ketoprofen se terapeuticky se využívá jako nesteroidní antiflogistikum při zánětlivých a degenerativních revmatických onemocněních.

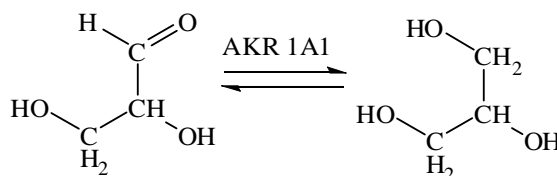
V lidských játrech je redukován na dihydroketoprofen cytosolickými dihydrodioldehydrogenasami (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4), jak je znázorněno na Obr. 15 (Ohara et al. 1995).



Obr. 15: Redukce ketoprofenu na dihydroketoprofen

DL-glyceraldehyd je pevná látka s molekulovou hmotností 90 g/mol, obtížně se rozpouští ve vodě, dobře rozpustná je v dimethylsulfoxidu (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

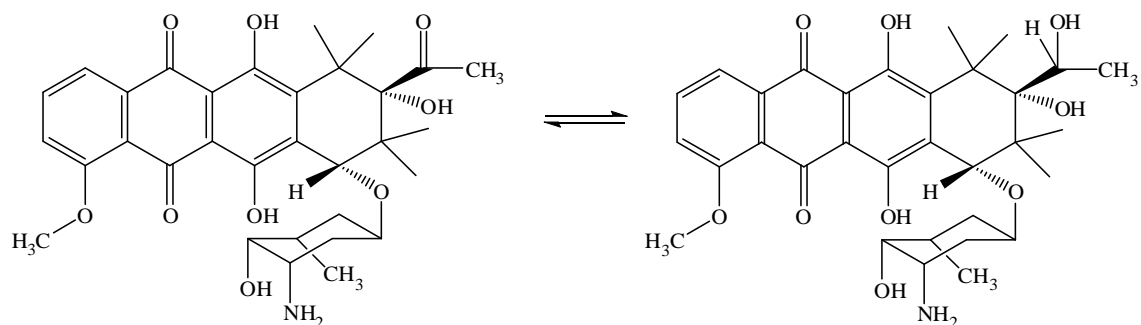
DL-glyceraldehyd je endogenní substrát redukováný v cytosolu většiny savčích orgánů na glycerol (viz Obr. 16). Tuto biotransformaci katalyzuje aldehydreduktasa AKR1A1.



Obr. 16: Redukce DL-glyceraldehydu na glycerol

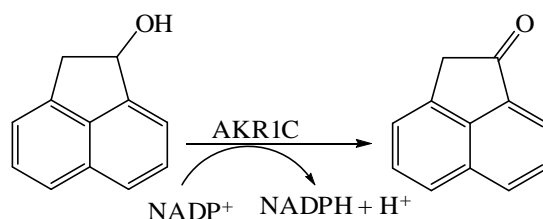
Daunorubicin je pevná látka oranžovočervené barvy, její molekulová hmotnost je 564 g/mol. Terapeuticky se používá jako cytostatikum při léčbě akutní leukémie a u blastického zvratu myeloidní leukémie.

Daunorubicin je redukován na daunorubicinol (viz Obr. 17) dvěma reduktasami, z nichž jedna vykazuje redukční aktivitu při pH 8,5 a druhá při pH 6,0 (Felsted, Bachur 1980a). Podle Ohary se spolupracovníky (1995) je daunorubicin redukován AKR1C2 a karbonylreduktasou, které vykazují nejvyšší aktivitu při pH 6,0 a aldehydreduktasou, jejíž maximální redukční aktivita byla při pH 8,0.



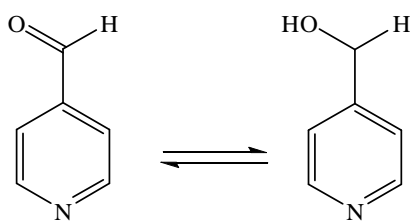
Obr. 17: Redukce daunorubicinu na daunorubicinol (Felsted, Bachur 1980)

Acenaftenol je substrátem pro aldo-keto reduktasy (dihydrodioldehydrogenasy) AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR1C4, jeho biotransformace je na Obr. 18.



Obr. 18: Biotransformace acenaftenolu na acenaftenon v cytosolu (Burczynski, Lin, Pennig 1999)

4-Pyridinkarboxaldehyd je redukován v cytosolické frakci lidských jater aldehydreduktasou (AKR1A1). V dalších přeměnách mohou hrát roli i AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4 (Palackal et al, 2001). V mikrosomální frakci je redukován 3 α -HSD (Maser 1995). Přeměna je znázorněna na Obr. 19.

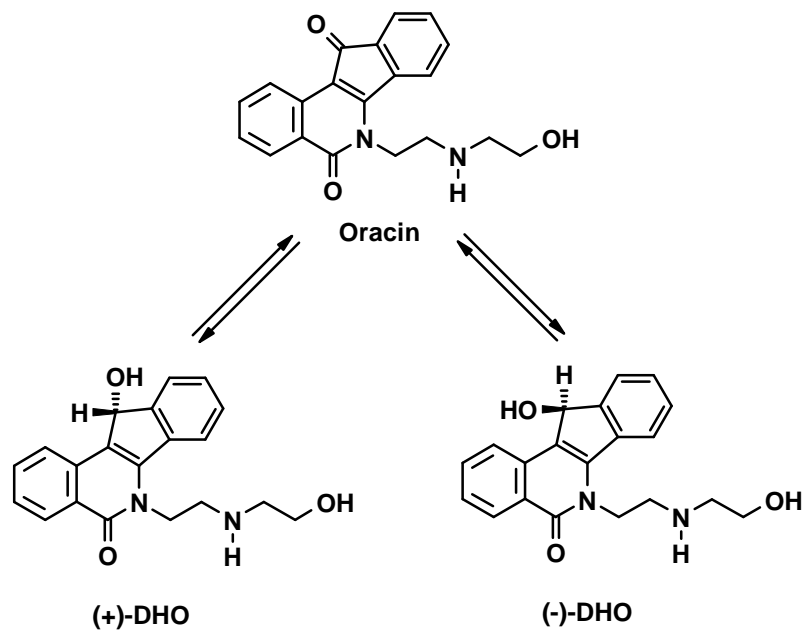


Obr. 19: Biotransformace 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci lidských jater

Oracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin, je slibné cytostatikum pro perorální podání. Inhibuje syntézu nukleových kyselin a bílkovin v kulturách nádorových buněk. Hlavními metabolity oracinu jsou 11-dihydrooracin (DHO) a 3-hydroxyoracin (3HO).

Redukcí prochirální molekuly oracinu vznikají dva enantiomery (+)-DHO a (-)-DHO (Obr. 20). Redukci podléhá ketonická skupina na uhlíku 11. Na mikrosomální úrovni je oracin redukován především 11- β -hydroxysteroiddehydrogenasou (HSD) typu 1. U člověka vzniká působením čistého enzymu 24% (+)-DHO, v mikrosomální frakci 40% (+)-DHO, což je vysvětlováno účastí dalšího enzymu se stereospecifitou k produkci (+)-DHO (Wsól et al. 2004).

Redukce oracinu v mikrosomech se kromě 11 β -HSD 1 účastní cytochrom P4501A. V cytosolu za metabolismus oracinu odpovídá karbonylreduktasa, což bylo zjištěno na základě inhibice aktivity karbonylreduktasy specifickým inhibitorem kvercitrinem (Szotáková et al. 2000). Další identifikované cytosolické enzymy účastnící se karbonylové redukce oracinu jsou: AKR1C1, 1C2, 1C4. Zatímco AKR1C2 a 1C4 jsou 100% stereospecifické (tvorba (+)-DHO), AKR1C1 tvoří 3% (-)-DHO (Wsól et al. 2007).



Obr. 20: Redukce oracinu na DHO

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo studovat vliv hemonchózy na aktivitu biotransformačních enzymů hostitele. Tato práce je součástí grantového projektu „Biotransformační enzymy hostitele a parazita – význam pro terapii parazitóz a helmintorezistenci u přežvýkavců“ (GAČR 524/06/1345). Aby bylo cíle dosaženo, bylo nutno:

- 1) Připravit subcelulární frakce z jater a střevní mukózy ovce domácí.
- 2) Stanovit enzymové aktivity vybraných oxidačních enzymů u zdravých a nemocných skupin ovce domácí.
- 3) Stanovit aktivity vybraných konjugačních enzymů u zdravých a nemocných skupin ovce domácí.
- 4) Stanovit aktivity vybraných redukčních enzymů u zdravých a nemocných skupin ovce domácí.
- 5) Porovnat uvedené enzymové aktivity mezi samci a samicemi ovce domácí.
- 6) Porovnat uvedené enzymové aktivity mezi jednotlivými skupinami ovcí a zhodnotit vliv hemonchózy na proces biotransformace.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál, přístroje

4.1.1 Biologický materiál

Aktivita enzymů byla zjišťována u ovce domácí (*Ovis aries*), plemena Merino landschaf. Ve své práci sleduji tři skupiny ovcí:

- sk. **A** (3 samci + 3 samice) – kontrolní skupina, zdravé, neléčené ovce
- sk. **C** (4 samci + 4 samice) – ovce s parazitózou vyvolanou larvami *H. contortus*
- sk. **E** (4 samci) – ovce s déle trvající parazitózou vyvolanou larvami *H. contortus*

Další ovce byly zahrnuty do skupiny **B** (zdravé ovce léčené flubendazolem podaným ve třech dávkách po 15 mg/kg živé váhy) a **D** (ovce s parazitózou, po sedmi týdnech léčenou flubendazolem ve třech dávkách po 15 mg/kg živé váhy). Sledováním těchto skupin se zabývá jiná práce.

Na začátku pokusu byly ovce staré 3-4 měsíce (asi 30 kg živé váhy). Experiment trval sedm týdnů. Výjimku tvoří samci ovce ze sk. E, kteří byli vystaveni vlivu parazita po dobu jedenácti týdnů. Infikace byla realizována p.o. suspenzí s 5000 larvami L3 *H. contortus*.

Po usmrcení zvířat byla do 5 minut vyjmuta játra, levý lalok byl rozdělen na malé kousky a zmrazen v tekutém dusíku během transportu do laboratoře. Dále byla vyjmuta část tenkého střeva (1,5 m od duodena). Po vypláchnutí střevního obsahu fyziologickým roztokem následovalo zmražení materiálu v tekutém dusíku. Játra a střevo se uložila do freezeru (-80°C), stejně jako později zpracované subcelulární frakce (mikrosomální a cytosolická frakce z jater; mikrosomální a cytosolická frakce ze střevní mukózy).

4.1.2 Přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- Centrifuga Eppendorf 5415D
- Concentrator Eppendorf 5301

- Čtečka Biorad, Microplate Reader, model 550
- Digitální pH-metr Jenway LTD 3020
- Luminescenční spektrofluorimetr Perkin Elmer LS 50 B
- Pístový homogenizátor Potter S
- Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf
- Třepačka (Reax top)
- Ultracentrifuga Beckman
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus Bandelin HD 2070
- Ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1
- UV-VIS spektrofotometr Helios β
- HPLC chromatograf Agilent

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Příprava subcelulárních frakcí

Subcelulární frakce byly získány z jater a střevní mukózy pěti skupin ovcí. Až do přípravy subcelulárních frakcí byl biologický materiál uchováván v hlubokomrazícím boxu při -80°C . Principem přípravy subcelulárních frakcí je rozrušení buněčné struktury a následné oddělení mikrosomů od cytosolu frakční ultracentrifugací.

Biologický materiál (játra, střeva) se rozvažoval po 5 g (výjimku tvořily některé skupiny střev, u nichž se hmotnost zpracovávané mukózy pohybovala od 5 do 10 g) do malých mističek ležících na ledítku. Játra se rozstříhala na malé kousky, střeva podélně rozřízla a podložními sklíčky byla seškrabována mukóza. Obsah jednotlivých mističek byl vpraven do 30 ml homogenizátoru spolu s 15 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4 a poté zhomogenizován pohybem pístu nahoru a dolu (3x). Zhomogenizovaný materiál byl přelit do centrifugačních kyvet. Píst a homogenizátor byly vypláchnuty dalšími 15 ml pufru, který se přidal do centrifugačních kyvet. Před prvním točením byla vychlazena centrifuga Heraeus na 4°C (program 3).

1. točení probíhalo v centrifuze Heraeus (rotor #3335) programem 3 (5 000 g, 20 min., 4°C). Peleta vzniklá při prvním točení představuje potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy, jádra.

2. točení bylo realizováno opět v centrifuze Heraeus. Supernatant z prvního točení byl přelit do čistých kyvet a znovu odstředěn – program 4 (20000 g, 60 min., 4°C). Po druhém stočení tvořily peletu usazenou na dně kyvet mitochondrie. Souběžně s počátkem druhého točení se začala chladit ultracentrifuga Beckman.

3. točení probíhalo v ultracentrifuze Beckman. Supernatant z druhého točení byl opatrně přelit do kyvet a doplněn puforem. Vyvážené kyvety byly následně odstředěny (105000 g, 65 min., 4°C).

Po ultracentrifugaci byla opatrně odebrána horní vrstva – **cytosol**. Poté byl cytosol rozpipetován za stálého míchání po 1,1 ml do řádně označených eppendorfek.

4. točení proběhlo opět v ultracentrifuze Beckman. Peleta ze třetího točení, **mikrosomy**, byla resuspendována v 5 ml pufru malým homogenizačním pístem. Kyvety pak byly do tří čtvrtin doplněny puforem, vyváženy, uzavřeny, vloženy do rotoru ultracentrifugy a znovu odstředěny (105000 g, 60 min., 4°C).

K peletě (přečištěné mikrosomy) bylo přidáno tolik mililitrů pufru s 20 % (v/v) glycerolu, kolik bylo gramů jater či střev a peleta zhomogenizována malým pístem. Homogenizovaný materiál, slitý do kádinek, byl z důvodu dokonalejší homogenizace vložen do ultrazvukové lázně. Za stálého míchání pak byly mikrosomy rozpipetovány do eppendorfek po 0,33 ml.

Eppendorfky s mikrosomy a cytolem byly řádně označeny a zmrazeny. Až do dalšího zpracování byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

Subcelulární frakce byly připraveny od každého jedince zvlášť. Pro jednotlivá stanovení byly používány směsné vzorky.

4.2.2 Stanovení koncentrace bílkoviny

Metoda je založena na reakci proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přechází na měďné ionty Cu^{1+} , které redukují BCA (bicinchoninovou kyselinu) v prostředí kolem pH 10. Vzniká modrofialové zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu se měří spektrofotometricky pomocí čtečky Biorad při 562 nm. Výsledná koncentrace bílkoviny ve vzorku se získá odečtením z kalibrační přímky (Smith et al. 1985).

Pro stanovení bílkoviny byly připraveny roztoky:

Roztok A: NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH

Roztok B: 4% CuSO₄·5H₂O

Pracovní roztok C jsme připravili smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

Kalibrační křivka

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Vycházeli jsme z 0,1% roztoku BSA. Jeho naředěním bylo připraveno šest roztoků o různé koncentraci bílkoviny pro sestavení kalibrační křivky (Tab. 1). Kalibrační přímka byla tvořena šesti body, pro každý bod bylo měřeno osm paralelních vzorků.

Tab. 1: Příprava standardních roztoků BSA pro získání kalibrační přímky

	Koncentrace BSA [μg/ml]	Roztok 0,1% BSA [μl]	Destilovaná voda [μl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Pro vlastní stanovení bílkoviny byly mikrosomy a cytosol naředěny 20x redestilovanou vodou. Byla připravena dvě ředění a z každého ředění čtyři paralelní vzorky, celkem tedy osm paralelních měření pro každou frakci.

Do každé jamky na destičce bylo pipetováno 10 μl vzorku bílkoviny (roztok BSA pro kalibrační přímku nebo naředěné mikrosomy či cytosol pro vlastní měření) a 200 μl pracovního roztoku C pomocí multikanálové pipety. Do první jamky byla napipetována pouze redestilovaná voda (měření absorbance proti destilované vodě). První sloupec sloužil pro slepý vzorek (místo bílkoviny 10 μl redestilované vody). Po promíchání se inkubovalo při 37°C po dobu 30 min.

Po inkubaci byla na čtečce Biorad změřena absorbance při 562 nm proti redestilované vodě. Od hodnot absorbance vzorků se odečítal průměr hodnot absorbance

slepých vzorků. Dosazením absorbance do rovnice kalibrační přímky byla spočítána koncentrace bílkovin ve vzorcích.

4.2.3 Stanovení aktivity CYP 1A, 2B, 3A

Metoda stanovení aktivity isoform cytochromu P450 je založena na přidání substrátu, relativně specifického jen pro určitou isoformu CYP, k mikrosomální frakci. Každá isoforma metabolizuje svůj specifický substrát na fluoreskující produkt – resorufin a přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru - Perkin Elmer LS50B (Burke et al. 1994).

Jako substráty pro toto stanovení byly použity:

- ethoxyresorufin - pro stanovení ethoxyresorufindeethylasy (EROD) – katalytická aktivita CYP1A1, částečně 1A2
- methoxyresorufindemethylasa - pro stanovení methoxyresorufindemethylasy (MROD) – katalytická aktivita CYP1A2, částečně 1A1
- pentoxyresorufin – stanovení pentoxyresorufindepentylasy (PROD) – katalytická aktivita CYP2B
- benzyloxyresorufin - stanovení benzyloxydearylasy (BROD) – katalytická aktivita CYP3A, 2B

Složení reakční směsi (celkový objem byl vždy 1ml):

- pufr Tris-HCl (0,1M, pH 7,4) – 910 μ l
- kofaktor MgCl₂ (0,1M) – 50 μ l
- substrát (0,5 mM v DMSO) – 5 μ l
- NADPH (50 mM v Tris-HCl pufru) – 10 μ l
- standardní přídavek resorufinu (0,5 μ M, tj. 5 pmol v kyvetě) – 10 μ l
- mikrosomy – 25 μ l (před každým měřením promíchány na Vortexu)

Před vlastním měřením bylo nutno nastavit parametry na přístroji. Byly nastaveny tyto parametry:

Vlnová délka excitační:	530 nm
Vlnová délka emisní:	585 nm
Excitační šterbina:	10 nm

Emisní štěrba: 20 nm
Teplota: 37°C
Délka inkubace: 180s
Excitační filter cut off on
Emisní filtr open
Míchání low

Základní linie („baseline“) byla před každým měřením nastavena na nulu.

Roztoky NADPH a mikrosomy byly umístěny v ledové tříšti (z důvodu nižší stability). Pufr byl temperován na teplotu 37°C.

Do kyvety byl napipetován pufr, kofaktor, specifický substrát a mikrosomální frakce a byl spuštěn záznam na fluorimetru. Po 50 s (ustálení směsi) byl do kyvety přidán koenzym NADPH, který spustil enzymovou reakci. Po 150 s byl do kyvety připipetován standardní přídavek resorufinu. Před měřením dalšího vzorku byl obsah kyvety odsát a kyveta byla propláchnuta destilovanou vodou. Pro každý substrát a vzorek bylo provedeno měření tří paralelních vzorků.

Po změření vzorků byla odečtena směrnice přímký nárůstu intenzity fluorescence a intenzita začátku a konce přídávku resorufinu. Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = [k / (B - A)] \cdot n \cdot D \cdot 60 \quad [\text{pmol/ml mikrosomů/min}]$$

a aktivita
k směrnice
A intenzita začátku přídávku resorufinu
B intenzita konce přídávku resorufinu
n látkové množství standardního přídávku resorufinu v jednom ml [5 pmol]
D zředění (při použití 25 μ l mikrosomů je zředění 40)
60 přepočet na minuty

Vztažením hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny se získala specifická aktivita enzymu [pmol/min/mg].

4.2.4 Stanovení aktivity CYP 2C9

Metoda stanovení aktivity CYP 2C9 je založena na přidání substrátu (MFC, 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin), relativně specifického pro tuto isoformu CYP, k mikrosomální frakci. CYP 2C9 metabolizuje MFC na fluoreskující produkt (HFC, 7-hydroxy-4-trifluoromethylkumarin) a přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru. Velikost přírůstku fluorescence je závislá na aktivitě enzymu. Vyhodnocení se provádí metodou standardního přídávku (Price et al. 2000, Crespi a Stresser 2000).

Složení reakční směsi:

- Na-fosfátový pufr (0,1M, pH 7,4) – 910 μ l
- kofaktor $MgCl_2$ (0,1M) – 50 μ l
- mikrosomy – 20 μ l
- substrát MFC (2mM DMSO) – 10 μ l
- NADPH (25 mM ve fosfátovém pufru) – 10 μ l
- HFC - 1.standardní přídavek (10 μ M roztok v pufru) - 10 μ l
- HFC - 2.standardní přídavek (10 μ M roztok v pufru) - 10 μ l

Roztok NADPH a standardní přípravek, tj. roztok HFC byly připraveny těsně před měřením.

Před vlastním měřením bylo nutno nastavit parametry na přístroji. Byly nastaveny tyto parametry:

Vlnová délka excitační:	410 nm
Vlnová délka emisní:	510 nm
Excitační štěrba:	4 nm
Emisní štěrba:	4 nm
Teplota:	37°C
Délka inkubace:	170 s

Roztoky NADPH a mikrosomy byly umístěny v ledové tříšti (z důvodu nižší stability). Pufr byl temperován na teplotu 37°C. Fluorescence byla měřena proti slepému vzorku (10 μ l substrátu a 990 μ l pufru).

Do kyvety byl napipetován pufr, kofaktor, mikrosomální frakce, specifický substrát MFC a byl spuštěn záznam na fluorimetru. Po 50 s (ustálení směsi) byl do kyvety přidán NADPH, který spustil enzymovou reakci. Po 150 s bylo do kyvety připipetováno 10 µl standardního přídávku HFC (1. standardní přídavek) a po dalších 20 sekundách opět 10 µl standardního přídávku HFC (2. standardní přídavek). Před měřením dalšího vzorku byl obsah kyvety odsát a kyveta byla propláchnuta destilovanou vodou. Pro každý vzorek mikrosomů byla provedena měření tří paralelních vzorků.

Po změření vzorků byla odečtena směrnice přímky nárůstu intenzity fluorescence (od startu reakce do prvního přídávku) a intenzita začátku a konce obou přídávků. Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = [k / (B - A)] \cdot n \cdot D \cdot 60 \quad [\text{pmol/ml mikrosomů/min}]$$

a aktivita

k směrnice přímky od startu reakce do prvního přídávku substrátu

n látkové množství HFC ve vzorku

D zředění mikrosomů ve vzorku

B – A přírůstek fluorescence od začátku do konce přídávku HFC (průměr ze šesti měření - 3 měření po 2 přídávcích)

Hodnota aktivity byla dále vztažena na 1 mg bílkoviny a tím se získala specifická aktivita enzymu [pmol/mg/min].

4.2.5 Stanovení aktivity CYP 2E1 (chlorzoxazon 6-hydroxylasa)

Metoda je založena na inkubaci mikrosomálních frakcí s chlorzoxazonem (specifickým substrátem CYP2E1) a následnou extrakcí a HPLC stanovením jeho metabolitu 6-hydroxychlorzoxazonu (OH-CZX) (Peter et al. 1990).

Příprava roztoků

- *chlorzoxazon*: 50 mM (8,48 mg/l) v 60 mM KOH (3,429 mg/ml)
- *STOP roztok (IS v CH₃OH)*: 90 µM 2-amino-5-chlorobenzoxazol v CH₃OH (15,2 µg/ml)
- *NADPH*: 100 mM (83,34mg/ml), příprava max. 2 hodiny před použitím

- *6-OH-chlorzoxazon*: 1000 μM (185,6 $\mu\text{g/ml}$) v CH_3OH , příprava méně koncentrovaných roztoků: 0 ($=\text{CH}_3\text{OH}$), 50, 100, 200, 400, 600 μM (ředěním základního roztoku)
- *pufr 0,1 M (PH 7,4)*: K_2HPO_4 (17,42 mg/ml) : KH_2PO_4 (13,61 mg/ml) ~ 3:1
- *pufr 1 M (PH 7,4)*: K_2HPO_4 (174,2 mg/ml) : KH_2PO_4 (136,1 mg/ml) ~ 3:1

Inkubace: Kromě vzorků byly inkubovány i směsi s rostoucí koncentrací 6-hydroxychlorzoxazonu, které sloužily k vytvoření kalibrační křivky. Složení inkubační směsi (celkový objem 300 μl) bylo následující:

Vzorek:

- sodno-fosfátový pufr 0,1 M pH 7,4 - 60 μl
- chlorzoxazon 50 mM v 60 mM KOH - 6 μl
- mikrosomální frakce - 60 μl
- redestilovaná voda -168 μl

Kalibrační křivka:

- sodno-fosfátový pufr 0,1 M pH 7,4 - 60 μl
- chlorzoxazon 50 mM v 60 mM KOH - 6 μl
- mikrosomální frakce - 60 μl
- redestilovaná voda -138 μl
- hydroxychlorzoxazon – 30 μl

Do označených eppendorfek byla napipetována uvedená množství jednotlivých složek inkubační směsi a poté byly eppendorfky preinkubovány 3 minuty při 37°C. Po přidání 6 μl NADPH se směs protřepala a inkubovala 60 minut při 37°C.

Přidáním 150 μl stop roztoku byla reakce zastavena. Jednotlivé eppendorfky byly promíchány a umístěny na led.

Extrakce: Do eppendorfek bylo přidáno 20 μl 1,0 M fosfátového pufru pH 7,4 a 1 ml CH_2Cl_2 . Směs byla protřepána na třepačce (stupeň 5, po dobu 2 minut) a centrifugována (8000 otáček/min po dobu 5 minut). Poté bylo odebráno 800 μl organické (spodní) fáze a přeneseno do vialky. K vodné fázi bylo přidáno 800 μl CH_2Cl_2 a extrakce byla zopakována. Spojené výtřepky byly odpařeny na koncentrátoru (30°C,

vakuum, program 1). Po odpaření byly vialky zavíčkované a uschovány v chladu a temnu a vzorky byly později vyhodnoceny pomocí HPLC.

HPLC: Před vlastní analýzou se jednotlivé odparky rozpouštěly. Po rozpuštění v methanolu a následném stání (10 min) bylo připipetováno 100 μ l vody. Nástřik na kolonu byl 50 μ l rozpuštěného odparku.

HPLC podmínky:

Autosampler:	Hewlett Packard 1100
Kolona:	Purospher RP18e 125x4 mm (5 μ m)
Předkolona:	Hypersil BDS C18 4x4 mm (5 μ m)
Detekce:	při 287 nm
Teplota:	25°C
Nástřik:	50 μ l
Mobilní fáze A:	pufr pro pH=2,5* + voda +acetonitril (10 : 77,5 : 12,5)
Mobilní fáze B:	pufr pro pH=2,5 + voda +acetonitril (10 : 60 : 30)
Průtok mobilní fáze:	1,5 ml/min

*Pufr pro pH 2,5 = 324 mmol/l fosfátový pufr (0,2 mol/l NaH₂PO₄)

Hodnocení chromatogramů:

Z chromatogramu se odečetla plocha píku stanovované látky (OH-CZX) a vnitřního standardu (IS), z nich se vypočetla relativní plocha píku (OH-CZX/IS). Množství OH-CZX v reakční směsi se zjišťovalo z kalibrační přímky, tj.závislosti relativní plochy píku na množství OH-CZX přidaného ke kalibračnímu vzorku.

Výpočet aktivity byl proveden na základě získaných hodnot množství metabolitu ve vzorku (přepočet na látkové množství). Specifická aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = x / (60 \cdot 0,06 \cdot b) \quad [\text{pmol/mg proteinů/min}]$$

a aktivita

x množství produktu [pmol]

60 doba inkubace [min.]

- 0,06 objem mikrosomů v inkubační směsi [ml]
 b množství proteinu v mikrosomech [mg/ml]

4.2.6 Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy (FMO)

Tato metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-oxidu thiobenzamidu (TBSO) za minutu. TBSO, metabolit thiobenzamidu, vzniká působením FMO (Cashman et al. 1981).

Příprava roztoků:

- *draselno-fosfátový pufr 0,1M (pH 8,0):* K_2HPO_4 (17,42 mg/ml) : KH_2PO_4 (13,61 mg/ml) ~ 3:1, temperován na 35°C
- *substrát:* zásobní roztok thiobenzamidu (TB) 89 mM, tj. 12,21 mg/ml ($M_r = 137,2$) v acetonitrilu
- *RS (NADPH – regenerační systém):* uchován v ledu

Glukosa-6-fosfát	12 mg
NADP ⁺	4 mg
Pufr fosfátový pH 7,4	200 µl
MgCl ₂ 0,1 M	200 µl
Glukosa-6-P-dehydrogenasa	10 µ
(na 16 vzorků)	
- *mikrosomy:* vypočítáno zředění mikrosomů tak, aby obsah bílkoviny byl v reakční směsi přibližně 0,75 mg/ml (uchovávány v ledu)
- *acetonitril*
- *n-oktylamin, inhibitor CYP:* zásobní roztok 0,42 M, tj. 0,054285 g/ml ($M_r = 129,25$) v acetonitrilu

Složení reakční směsi (celkový objem 1,05 ml)

- 0,1 M draselno-fosfátový pufr pH 8,0 – 870+12,5 µl (játra), 800+12,5 (střeva)
- mikrosomy – 130 µl (játra), 200 µl (střeva)
- NADPH-regenerační systém – 25 µl
- (n-oktylamin – 12,5 µl)
- substrát – 12,5 µl či acetonitril – 12,5 µl (slepý vzorek)

Do kyvety byla napipetována uvedená množství pufru a mikrosomů a tato směs se nechala chvíli temperovat. Pak byl připetován NADPH-regenerační systém, pufr nebo inhibitor a substrát nebo acetonitril (pro slepý vzorek) a směs byla protřepána a následně byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios β při 35°C.

N-oktylamin, nespecifický inhibitor CYP, byl použit u některých měření. Byla sledována závislost aktivity FMO na přítomnosti tohoto inhibitoru. V přítomnosti n-oktylaminu se aktivita FMO zvýšila (ve smyslu zvýšení tvorby S-oxidu thiobenzamidu).

Hodnoty absorbance byly odečítány vždy po 1 minutě po dobu 7 minut. Byl sledován lineární vzrůst absorbance (vzrůst byl lineární zhruba od 3.minuty). Pro každý vzorek mikrosomů byly měřeny 3 paralelní vzorky a slepý vzorek.

Pro výpočet aktivity se vypočítaly rozdíly absorbancí v jednotlivých minutách, určil se průměr absorbance za 1 minutu a odečetl se slepý vzorek. Z této hodnoty absorbance se vypočítala koncentrace S-oxidu thiobenzamidu pomocí jeho molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon = 8,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $A = c \cdot \epsilon \cdot l$) a následně látkové množství S-oxidu thiobenzamidu v reakční směsi. Aktivita byla přepočítána na 1 ml mikrosomů.

Vztažením hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny se získala specifická aktivita enzymu (nmol/min/mg).

4.2.7 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu na základě enzymové katalýzy glutathion-S-transferasou (GST) za použití 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a glutathionu (Habig a Jacoby 1981).

Příprava roztoků:

- *fosfátový pufr 0,1 M (pH 6,5):* $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (35,8 mg/ml) : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15,6 mg/ml) ~ 1 : 3 (výsledné pH 6,5)
- *substrát:* 1-chloro-2,4-dinitrobenzen 0,1 M (CDNB), tj. 20,27 mg/ml – v ethanolu 95% ($M_r = 202,56$)
- *konjugační činidlo:* redukovaný glutathion 0,1 M (GSH), tj. 30,73 mg/ml ($M_r = 307,33$)
- *vzorek enzymu* – rozmražené vzorky cytosolu (jaterní cytosol naředěn 5x)

Složení reakční směsi (celkový objem je 1 ml)

- 0,1 M sodno-fosfátový pufr pH 6,5 – 970 μ l
- konjugační činidlo – 10 μ l
- cytosolická frakce - 10 μ l
- substrát – 10 μ l

Měření probíhalo na spektrofotometru HELIOS β při 340 nm za využití předem nastaveného programu na disketě GST.FXD (počet cyklů 4, délka cyklu 1 min., počet kyvet 7 – 5 vzorků, 2 slepé vzorky).

Do UV-VIS transparentní kyvety byla napipetována uvedená množství pufru, GSH a cytosolu, směs byla protřepána a byl připipetován substrát (aktivátor reakce). Po protřepání byla ihned měřena absorbance.

Pro každý vzorek cytosolu bylo měřeno 5 paralelních vzorků. Byly změřeny také slepé vzorky bez cytosolu, jejichž absorbance byla odečtena od ostatních hodnot.

U cytosolu z jater byla hodnota absorbance nad 0,800, proto byl vzorek 5x naředěn. Při měření se sledovala linearita měření a hodnota absorbance se odečítala v 0., 1., 2. a 3.minutě.

Pro výpočet aktivity enzymu byl použit rozdíl absorbancí naměřených v 1. a 3.minutě. Od tohoto rozdílu, vztaženého na 1 minutu, byla odečtena absorbance slepého vzorku. Pomocí extinkčního koeficientu S-2,4-dinitrofenylglutathionu ($\epsilon = 9,6 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla z rozdílu absorbance vypočítána koncentrace konjugátu, a následně jeho látkové množství vzniklé za 1 minutu (působením 10 μ l střevního cytosolu, resp. 2 μ l jaterního cytosolu). Aktivita byla přepočítána na 1 ml cytosolu.

Vztažením hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny byla získána specifická aktivita enzymu [μ mol/min/mg].

4.2.8 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid za enzymové katalýzy UGT (Mizuma et al. 1982).

Složení reakční směsi

- Tris-pufr pH 7,4 - 30 μ l
- Substrát (0,556 mM p-nitrofenol; p-NF) – 30 μ l
- Konjugační činidlo (UDP-glukuronová kyselina; UDP-GA) - 30 μ l
- Detergent (pro aktivaci UGT) – podle koncentrace bílkoviny ve vzorku se vypočítal objem detergentu pipetovaný k mikrosomům; poměr detergent : bílkovina (w/w) byl 1:2
- Mikrosomální frakce – 10 μ l mikrosomů s detergentem

Ze známých hodnot koncentrace bílkoviny se vypočítalo množství detergentu (1:2), který se přidal ke 100 μ l mikrosomů. Tato směs se inkubovala při 4°C po dobu 20 minut. Poté se do eppendorfek v ledové lázni pipetoval Tris-HCl pufr, p-nitrofenol, UDP-glukuronová kyselina a reakce byla zahájena přidáním mikrosomů s detergentem. Eppendorfky se uzavřely, promíchaly a inkubovaly při 37°C po dobu 20 minut.

Reakce byla ukončena vyložení zkumavek z lázně do ledu a přidáním 50 μ l stop roztoku - 3% (w/v) kys. trichloroctová (TCA) jako deproteinizační činidlo.

Následovala centrifugace 3 minuty při 5000 otáčkách/min. Odebralo se 50 μ l supernatantu a přeneslo se do jamek v mikrotitračních destičkách, ve kterých už bylo napipetováno 50 μ l ml 1M NaOH. Po zabarvení se na čtečce (BioRad) změřila absorbance nezreagovaného p-nitrofenolu při 415 nm.

Pro jeden vzorek mikrosomů se připravilo 5 paralelek vzorku a 3 paralelky slepého vzorku (místo UDP-glukuronové kyseliny byla voda).

Výpočet aktivity byl proveden na základě stanovení 100% p-NF. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno:

- 30 μ l Tris-HCl pufru pH 7,4
- 30 μ l p-NF
- 40 μ l vody
- 50 μ l TCA

Po promíchání bylo odebráno 50 μ l do destičky k 50 μ l 1M NaOH a změřena absorbance 100% p-NF.

Hodnota absorbance vzorků byla odečtena od hodnoty absorbance slepých roztoků. Tento rozdíl odpovídal zreagovanému p-NF. Procentuální vyjádření zreagovaného p-NF bylo provedeno pomocí absorbance 100% p-NF. Tato procenta nám

umožnila určit látkové množství přeměněného p-NF (v reakční směsi bylo na začátku přítomno 0,0167 μmol p-NF). Aktivita GST je vyjádřena jako množství přeměněného p-NF za minutu 1 ml mikrosomů.

Vztažením hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny byla získána specifická aktivita enzymu [nmol/min/mg].

4.2.9 Spektrofotometrické stanovení aktivity redukčních enzymů

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ (nebo vzestupu absorbance způsobeného přeměnou kofaktoru NADP^+ na NADPH) ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/ NADP^+ ($\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas (Felsted a Bachur 1980b, Maser a Operrmann 1997b, Kawamura et al. 1999, Palackal et al. 2001, Ohara et al. 1995).

Roztok NADPH ($M_r = 833,4 \text{ g/mol}$) v redestilované vodě a roztok NADP^+ ($M_r = 787,4 \text{ g/mol}$) v redestilované vodě byly společně se vzorky cytosolu a mikrosomů uchovávány v průběhu měření v ledové lázni. Z důvodu nižší stability bylo nutno roztoky připravovat 2krát denně čerstvé.

Pufry byly temperovány na 37 °C. Draselno-fosfátový pufr (0,1M, pH 6,0) byl připravený sléváním jednotlivých složek (0,1 M K_2PO_4 a 0,1 M KH_2PO_4) v poměru přibližně 1:1 při laboratorní teplotě za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru do požadované hodnoty pH pufru. Dále byl použit TRIS-HCl pufr - 0,1 M; pH 8,9 a 0,2 M; pH 8,5.

Substráty použité v této práci byly rozpuštěny v redestilované vodě (naloxon, metyrapon, daunorubicin, 4-pyridinkarboxaldehyd) či v dimethylsulfoxidu (ketoprofen, DL-glyceraldehyd, acenaftenol).

Aktivita v cytosolické frakci byla sledována vůči všem uvedeným substrátům, v mikrosomální frakci byla aktivita měřena pouze pro metyrapon a 4-pyridinkarboxaldehyd.

Složení reakční směsi pro jednotlivé substráty (celkový objem vždy 1 ml)

- **naloxon** ($M_r = 364$), **metyrapon** ($M_r = 226$), **ketoprofen** ($M_r = 254$) a **daunorubicin** (pH 6,0; $M_r = 564$):

930 μ l draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
10 μ l substrátu (zásobní roztok 0,1 M, daunorubicin 1 mM)
10 μ l NADPH (zásobní roztok 10 mM)
50 μ l enzymu

- **DL-glyceraldehyd** ($M_r = 90$):

930 μ l draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
10 μ l substrátu (zásobní roztok 1 M)
10 μ l NADPH (zásobní roztok 30 mM)
50 μ l enzymu

- **4-pyridinkarboxaldehyd** ($M_r = 107$)

970 μ l draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
10 μ l substrátu (zásobní roztok 0,1 M)
10 μ l NADPH (zásobní roztok 10 mM)
10 μ l enzymu

- **daunorubicin** (pH 8,5; $M_r = 564$)

930 μ l TRIS-HCl pufru (0,2 M; pH 8,5)
10 μ l substrátu (zásobní roztok 1 mM)
10 μ l NADPH (zásobní roztok 10 mM)
50 μ l enzymu

- **acenaftenol** ($M_r = 170$)

930 μ l TRIS-HCl pufru (0,1 M; pH 8,9)
10 μ l substrátu (zásobní roztok 0,1 M)
10 μ l NADP⁺ (zásobní roztok 100 mM)
50 μ l enzymu

Po přidání každé složky do kyvety byla reakční směs řádně promíchána převrácením kyvety uzavřené parafilmem a protřepáním na třepačce. Pufr, substrát a koenzym tvořily slepý vzorek, který sloužil k vynulování spektrofotometru před každým měřením. Reakce byla zahájena přidáním enzymu. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Helios β při 340 nm. Sledovala se linearita měření a hodnoty absorbance se odečítaly v 0., 1., 2., 3. a 4. minutě. Stanovení bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

Pro výpočet aktivity enzymu byl použit rozdíl absorbancí naměřených v 2. a 4. minutě, vztažený na 1 minutu. Pomocí extinkčního koeficientu NADPH/NADP⁺ ($\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla z rozdílu absorbance vypočítána koncentrace zoxidovaného NADPH, a následně jeho látkové množství vzniklé za 1 minutu (působením pipetovaného množství cytosolu či mikrosomů do reakce). Aktivita, přepočítaná na 1 ml cytosolu (mikrosomů), má jednotky [nmol/min/ml].

Vztažením hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny byla získána specifická aktivita enzymu [nmol/min/mg].

4.2.10 Stanovení aktivity AKR 1C a CR (dihydrodioldehydrogenas a karbonylreduktas)

Tyto enzymy se podílí na biotransformaci metyraponu (AKR 1C, CR), naloxonu (AKR 1C), ketoprofenu (AKR 1C), 4-pyridinkarboxaldehydu (AKR 1C), daunorubicinu (AKR1C, CR) a acenaftenolu (AKR 1C). Tato biotransformace byla stanovena spektrofotometricky (viz výše).

Další metodou je inkubace cytosolických frakcí s oracinem s následnou extrakcí a HPLC analýzou metabolitů oracinu (Wsól et al 2000).

Složení reakční směsi

- substrát – oracin (zásobní roztok 1 mM) – 100 μl
- NADPH (zásobní roztok 3 mM) – 100 μl
- cytosol – 100 μl

Do mikrozkušavek se napipetoval roztok oracinu a NADPH, nechal se preinkubovat při 37 °C po dobu asi 5 minut. Inkubace při 37 °C se zahájila přidáním 100 μl cytosolu. Slepý chemický vzorek obsahoval místo cytosolu 0,1 M Na-fosfátový pufr pH 7,4, slepý biologický vodu místo substrátu. Inkubace se skončila po 30 minutách ochlazením inkubační směsi na 0 °C v ledové lázni, přidáním 30 μl koncentrovaného amoniaku a promícháním.

Extrakce: Po zastavení reakce bylo přidáno 0,9 ml destilovaného octanu ethylnatého. Mikrozkušavky se intenzivně třepaly na třepačce 2 minuty a následně zcentrifugovaly (5000 otáček/minuta, doba centrifugace 3 minuty). Horní vrstvy (0,8 ml) byly přeneseny do vialek. Extrakt se odpařil v koncentrátoru (45 °C) do sucha. Vzorky připravené pro HPLC analýzu byly uchovány v chladu a temnu.

HPLC: Předem připravené odparky látek (viz výše) se rozpustily v 250 μ l mobilní fáze, k nástřiku na chromatografickou kolonu se použilo 100 μ l toho roztoku.

HPLC analýza produktů biotransformace oracinu byla provedena na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series, na chromatografické koloně typu BDH Hypersil C18 o rozměrech 250 x 4 mm. Mobilní fáze vznikla smísením acetonitrilu a hexansulfonanového pufru (10 mM; pH 3,27) v poměru 1:3. Analýza probíhala při teplotě 25 °C, pod tlakem 200 bar, mobilní fáze protékala rychlostí 1,5 ml/min. Detekce se realizovala fluorescenčním detektorem (vlnová délka excitační 340 nm, emisní 418 nm) a záznam píků byl vyhodnocen chromatografickým softwarem Agilent ChemStation for LC/MS Systems.

Výpočet aktivity byl proveden na základě získaných hodnot množství dihydrooracinu ve vzorku (v μ g). Toto množství bylo přepočítáno na látkové množství. Látkové množství bylo dále vztaženo na 1 minutu a na 1 ml cytosolu, což představuje aktivitu.

Přepočítáním hodnoty aktivity na 1 mg bílkoviny byla získána specifická aktivita enzymu [nmol/min/mg].

4.2.11 Stanovení aktivity 11 β -HSD typu 1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy)

Tento enzym se podílí na biotransformaci metyraponu (stanoveno spektrofotometricky).

Další metodou je inkubace mikrosomálních frakcí s oracinem s následnou extrakcí a HPLC analýzou metabolitů oracinu. Provedení je stejné jako u stanovení aktivity AKR 1C a CR (viz výše) s tím rozdílem, že místo cytosolu byly do reakční směsi pipetovány mikrosomy.

Při inkubaci cytosolu i mikrosomů s oracinem bylo sledováno nejen množství vznikajícího dihydrooracinu, ale rovněž i procentuální zastoupení obou enantiomerů, tj. (+)-DHO a (-)-DHO.

4.2.12 Statistické zpracování výsledků

Výsledky všech enzymových stanovení byly mezi sebou porovnávány pomocí Studentova nepárového T-testu (hladina spolehlivosti 0,95). Hodnocena byla statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými skupinami (A, C, E) a v rámci skupiny i mezi pohlavími (samci, samice).

5. VÝSLEDKY

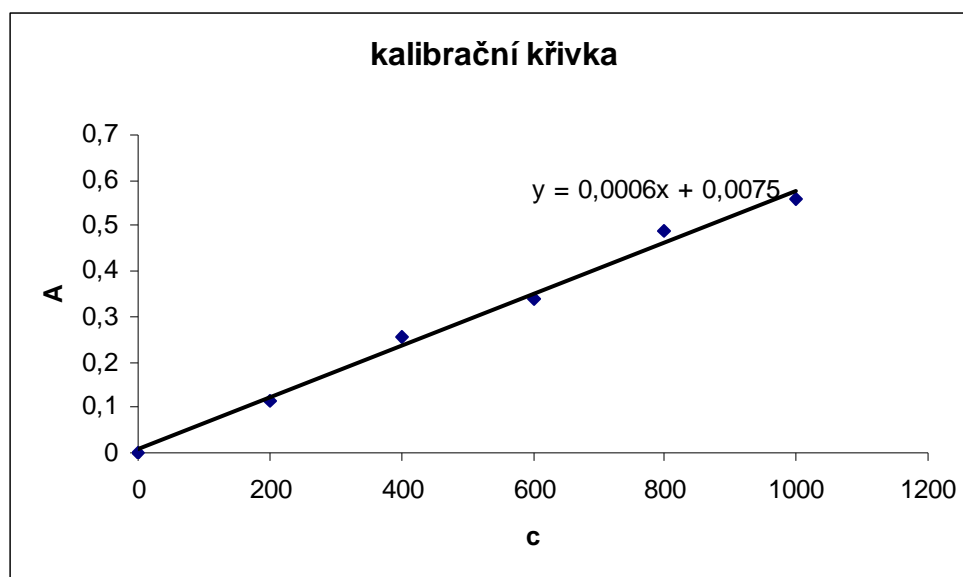
5.1 Stanovení koncentrace bílkoviny

Koncentrace bílkoviny v mikrosomálních a cytosolických frakcích jater a střev jednotlivých skupin ovce domácí byla stanovena pomocí metody BCA stanovení (viz kapitola 4.2.2).

Výpočet koncentrace bílkoviny ve vzorcích vychází z kalibrační přímky, sestrojené pomocí standardního roztoku hovězího sérového albuminu. Pro vytvoření kalibrační přímky byla použita metoda lineární regrese (Obr. 21).

Kalibrační křivka:

konc. [$\mu\text{g/ml}$]	0	200	400	600	800	1000
absorbance	0	0,115667	0,256167	0,337917	0,486917	0,559167



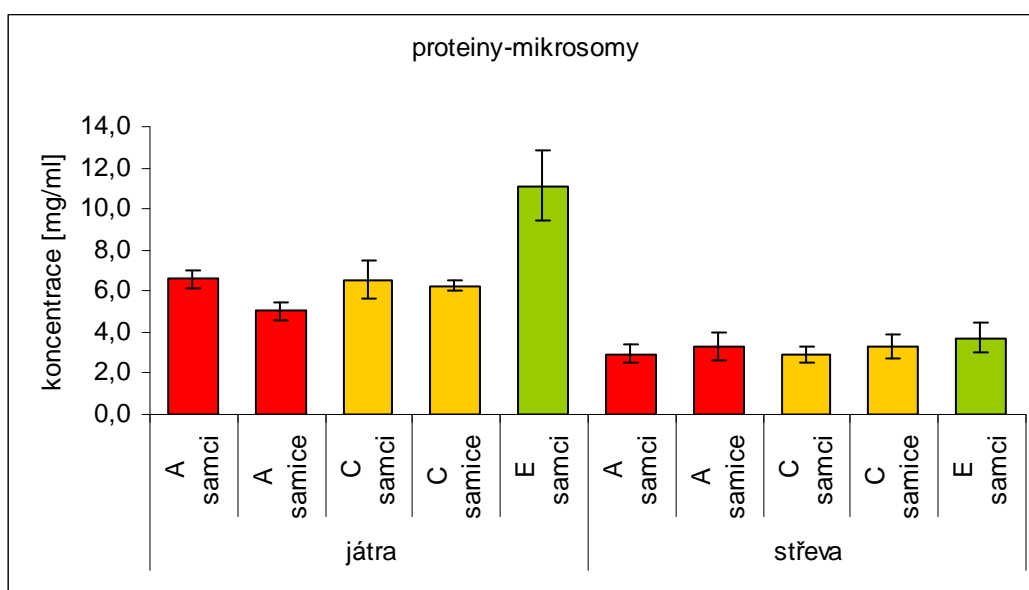
Obr. 21: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny

U jednotlivých vzorků byla proměřena absorbance, od středních hodnot absorbancí se odečetla absorbance slepého pokusu a z kalibrační přímky byly vypočteny odpovídající hodnoty koncentrace bílkoviny ve vzorcích.

Koncentrace bílkovin v mikrosomální a cytosolické frakci jednotlivých skupin jsou uvedeny spolu se směrodatnými odchylkami v následujících tabulkách a grafech.

Tab. 2: Koncentrace bílkoviny v mikrosomální frakci jater a střev u skupin ovcí A, C, E

mikrosomy	koncentrace bílkoviny [mg/ml]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	6,590 ± 0,448	5,027 ± 0,445	6,548 ± 0,896	6,252 ± 0,249	11,115 ± 1,721
střeva	2,936 ± 0,442	3,326 ± 0,662	2,894 ± 0,402	3,327 ± 0,595	3,702 ± 0,732



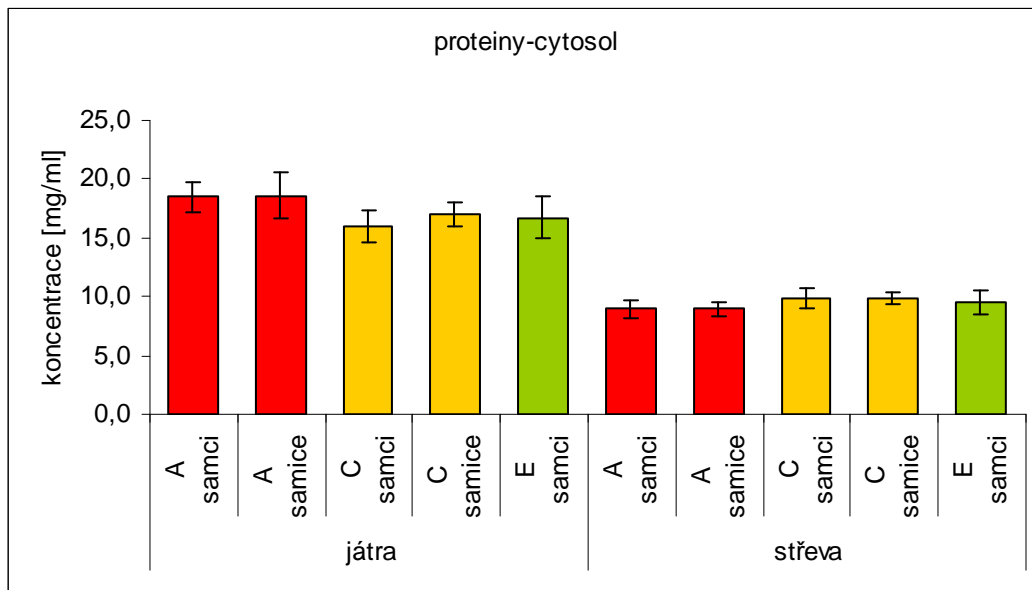
Obr. 22: Grafické srovnání koncentrace bílkovin v mikrosomální frakci mezi jednotlivými skupinami ovcí

V játrech se mikrosomální koncentrace bílkovin pohybovala od $5,027 \pm 0,445$ mg/ml (samice ze skupiny A) do $11,115 \pm 1,721$ (samci ze skupiny E). Koncentrace bílkovin se mezi skupinami A (zdravé ovce) a C (nemocné ovce) významně neliší, a to ani mezi samci a samicemi v rámci jednotlivých skupin. Od těchto hodnot se odchyluje skupina E (dále nemocné ovce), u níž je koncentrace bílkovin v porovnání s ostatními skupinami dvojnásobná.

Ve střevech se mikrosomální koncentrace bílkovin pohybovala od $2,894 \pm 0,402$ mg/ml (samci ze skupiny C) do $3,702 \pm 0,732$ (samci ze skupiny E). Rozdíl v koncentraci bílkovin není statisticky významný jak mezi skupinami, tak ani v rámci skupin mezi pohlavími.

Tab. 3: Koncentrace bílkoviny v cytosolické frakci jater a střev u skupin ovcí A, C, E

cytosol	koncentrace bílkoviny [mg/ml]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	18,472 ± 1,225	18,606 ± 1,982	15,935 ± 1,378	16,956 ± 1,018	16,751 ± 1,811
střeva	8,947 ± 0,709	8,931 ± 0,571	9,885 ± 0,812	9,885 ± 0,507	9,493 ± 1,053



Obr. 23: Grafické srovnání koncentrace bílkovin v cytosolické frakci mezi jednotlivými skupinami ovcí

Cytosolická jaterní frakce obsahovala proteiny v koncentraci od $15,935 \pm 1,378$ mg/ml do $16,956 \pm 1,018$ mg/ml. Množství proteinů není významně odlišné mezi skupinami, ani mezi samci a samicemi jedné skupiny.

Ve střevech jsou hodnoty koncentrací proteinů nižší: 8,931 – 9,885 mg/ml, rovněž se neliší mezi skupinami ani pohlavími jedné skupiny.

V mikrosomech byla zjištěna nižší koncentrace proteinů oproti cytosolu (přibližně třikrát). Obsah proteinů v játrech převyšoval v mikrosomech i cytosolu množství proteinu ve střevech asi dvakrát.

5.2 Stanovení aktivity CYP 1A, 2B, 3A

Stanovení aktivity těchto isoformů bylo provedeno spektrofotometrickou metodou se standardním přídatkem resorufinu (viz kapitola 4.2.3).

V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty specifické aktivity EROD-ethoxyresorufindeethylasy (CYP 1A1, částečně 1A2), MROD-methoxyresorufin-demethylasy (CYP 1A2, částečně 1A1), BROD-benzyloxyresorufindearylasy (CYP 3A, 2B) a PROD-pentoxyresorufindepentylasy (CYP 2B) v mikrosomální frakci jater spolu se směrodatnými odchylkami.

Tab. 4: Specifická aktivita EROD, MROD, BROD, PROD v játrech u jednotlivých skupin ovcí

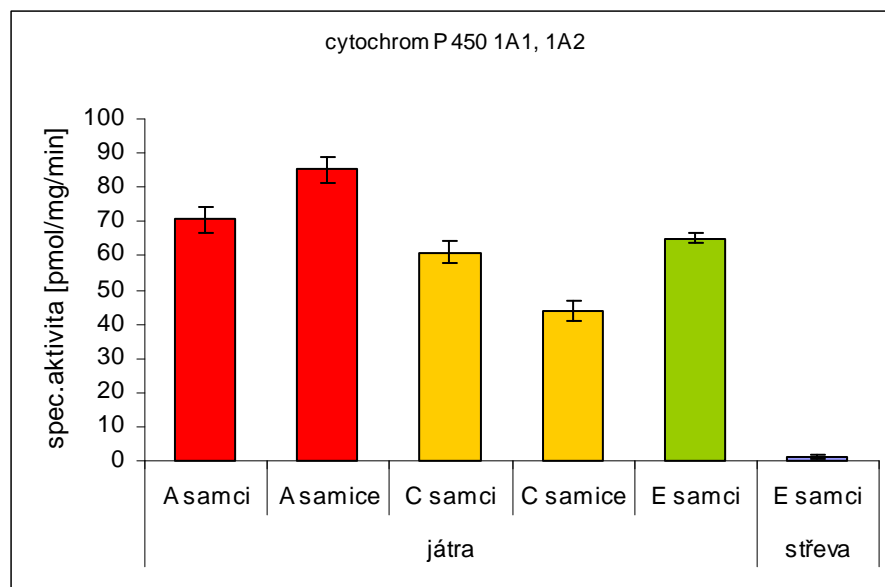
mikrosomy játra	specifická aktivita [pmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
EROD	70,638 ± 3,879	85,089 ± 3,517	61,032 ± 3,013	43,759 ± 3,088	64,997 ± 1,539
MROD	79,453 ± 1,445	99,065 ± 4,337	64,250 ± 2,459	31,602 ± 1,470	79,500 ± 1,459
BROD	19,636 ± 0,694	22,142 ± 2,329	11,356 ± 1,698	5,601 ± 1,434	19,785 ± 1,831
PROD	3,414 ± 0,694	3,351 ± 1,472	3,127 ± 0,188	---	3,301 ± 0,148

V mikrosomální frakci střev nebyla zjištěna enzymová aktivita. Výjimkou jsou samci skupiny E, u nichž byla nalezena nepatrná aktivita enzymu EROD (Tab. 5).

Tab. 5: Specifická aktivita EROD ve střevech samců ze skupiny E

mikrosomy střeva	spec.aktivita [pmol/mg/min]
	samci E
EROD	1,007 ± 0,509

V následujících grafech jsou srovnány specifické aktivity jednotlivých enzymů mezi skupinami.



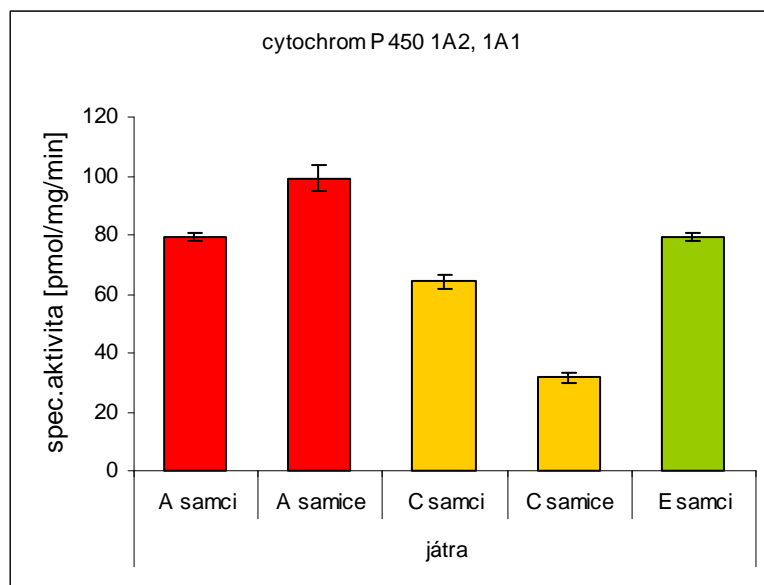
Obr. 24: Grafické zobrazení aktivity EROD v játrech u jednotlivých skupin, pro srovnání zobrazena i aktivita ve střevech sk. E

Hodnoty aktivit EROD se statisticky významně liší mezi samci ze sk. A a C a i mezi samicemi z těchto skupin. Z těchto výsledků vyplývá, že parazitóza vyvolaná *H.contortus* vede ke snížení aktivity CYP 1A1, 1A2. Dále trvající infekce nemá na aktivitu těchto isoformů výrazný vliv.

K odlišnostem v aktivitě došlo i v rámci jednotlivých skupin, tzn. mezi pohlavími. Zatímco u zdravých ovcí je aktivita EROD vyšší u samic, u nemocných ovcí je tomu naopak.

Pro názornost jsem do grafu začlenila i jedinou naměřenou aktivitu ve střevní frakci. Tato aktivita je v porovnání s hodnotami z jater mnohonásobně nižší.

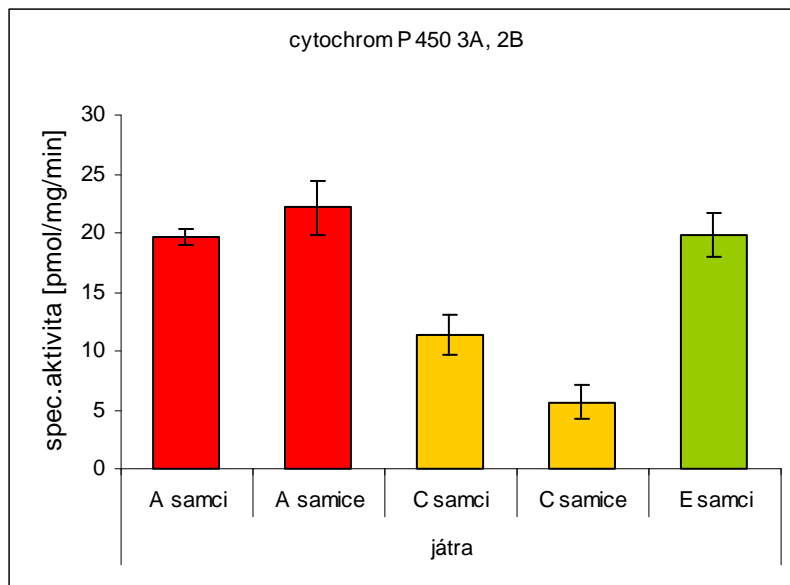
Statistická významnost u všech enzymových stanovení byla hodnocena pomocí Studentova nepárového T-testu ($p \leq 0,05$).



Obr. 25: Znárodnění aktivity MROD pro skupiny ovcí

Hodnoty aktivit MROD se liší rovněž mezi zdravými a nemocnými samci, i mezi zdravými a nemocnými samicemi. Parazitóza vede k statisticky významnému snížení aktivity MROD. Dále trvající parazitóza aktivitu významně neovlivnila.

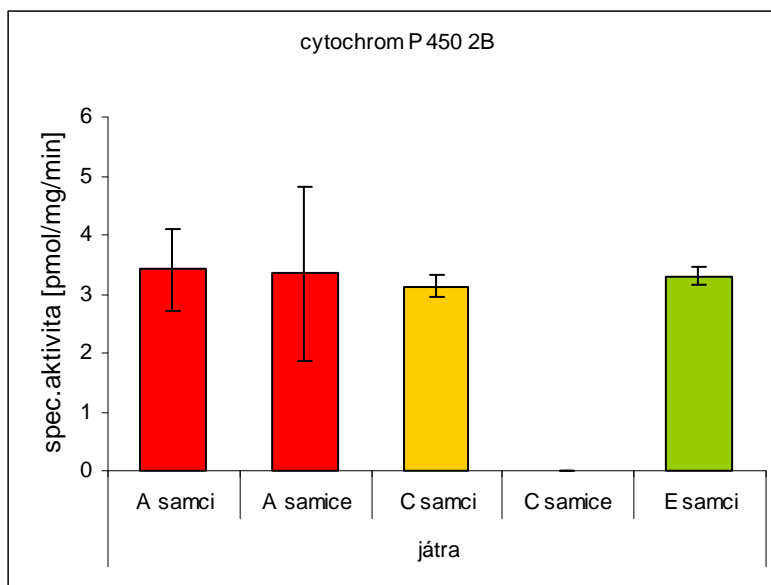
U zdravých samic je aktivita statisticky významně vyšší než u zdravých samců, u nemocných ovcí tato skutečnost neplatí (aktivita samic je menší než u samců). To může být dáno tím, že inhibiční vliv parazita se více projevuje u samic.



Obr. 26: Grafické zobrazení aktivity BROD u jednotlivých skupin

Stejně jako u dvou předcházejících enzymů se i u BROD projevil inhibiční vliv parazitózy na aktivitu enzymu jak u samců, tak u samic. U déle trvající parazitózy je tento vliv zanedbatelný.

V rámci skupiny A nejsou výrazné rozdíly mezi pohlavími. U nemocných ovcí enzymová aktivita samců převyšuje aktivitu u samic. Na základě toho se dá usuzovat, že inhibice enzymové aktivity parazitózou není pro obě pohlaví stejná.



Obr. 27: Porovnání aktivit PROD u jednotlivých skupin ovcí

Aktivita PROD není u samců ovlivněna infekcí způsobenou *H. contortus* - není významný rozdíl mezi sk. A, C a E. U zdravých ovcí se také neliší aktivity mezi pohlavími. Rozdíl byl zaznamenán u sk. C, kde u samic byla zjištěna nulová aktivita. Hodnoty aktivit PROD jsou velmi nízké.

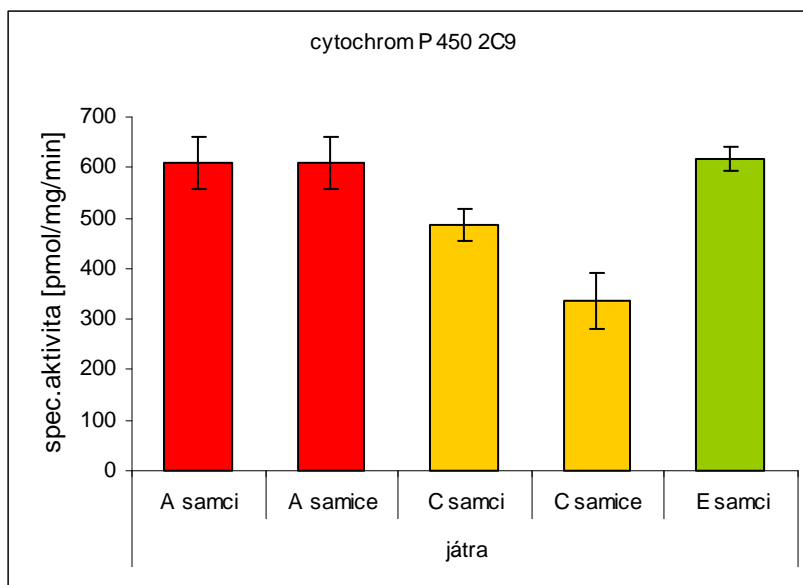
5.3 Stanovení aktivity CYP 2C9

Stanovení aktivity těchto isoform bylo provedeno spektrofluorimetrickou metodou se standardním přídatkem resorufinu (viz kapitola 4.2.4).

V následující tabulce (Tab. 6) a grafu (Obr. 28) jsou uvedeny hodnoty specifické aktivity v mikrosomální frakci jater spolu se směrodatnými odchylkami.

Tab. 6: Hodnoty specifické aktivity isoformy CYP 2C9 u jednotlivých skupin ovcí

mikrosomy játra	specifická aktivita [pmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
	609,431 ±50,244	610,183 ±52,070	485,502 ±32,672	336,645 ±55,178	618,128 ±23,545



Obr. 28: Grafické porovnání specifické aktivity mezi skupinami ovcí A, C, E

Hodnoty specifické aktivity enzymu CYP 2C9 se u ovcí pohybovaly od 337 pmol/mg/min (samice sk. C) do 618 pmol/mg/min (samci sk. E).

Z grafu je patrné, že enzymová aktivita je u zdravých ovcí vyšší než u nemocných ovcí ze sk. C. Tento jev, potvrzený i statistickým vyhodnocením, je způsoben inhibičním vlivem parazita na aktivitu CYP 2C9. Déle trvající parazitóza však změny v aktivitě nevyvolává.

V rámci skupiny A jsou hodnoty aktivity mezi samci a samicemi srovnatelné. U skupiny C mají samci statisticky významně vyšší aktivitu než samice, což by mohlo být způsobeno výraznějším inhibičním působením parazita na samice.

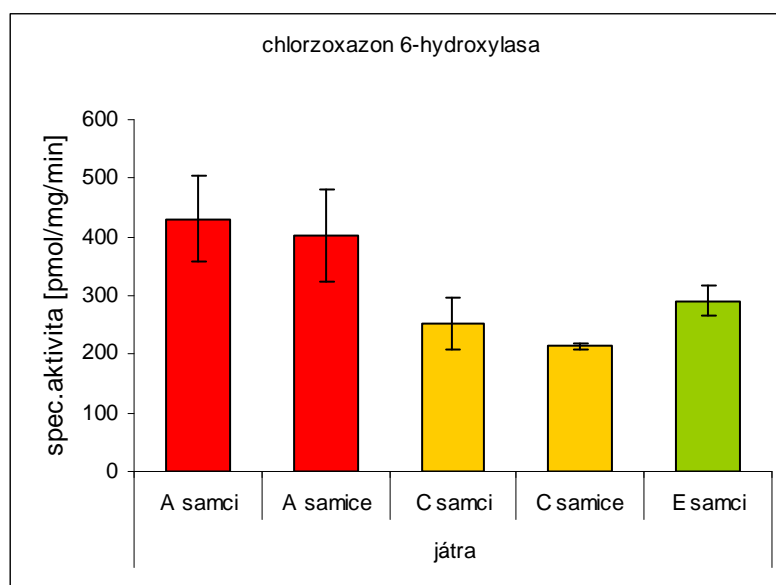
5.4 Stanovení aktivity CYP 2E1

Ke stanovení aktivity cytochromu CYP 2E1 byla použita metoda inkubace mikrosomálních frakcí s chlorzoxazonem. Následovala extrakce a HPLC analýza jeho metabolitu 6-hydroxychlorzoxazonu (viz 4.2.5). Měření bylo prováděno v jaterních a střevních mikrosomech.

V následující tabulce (Tab. 7) jsou uvedeny průměrné hodnoty specifické aktivity CYP 2E1 s příslušnými směrodatnými odchylkami. Grafické srovnání aktivit je na Obr. 29 a Obr. 30.

Tab. 7: Specifická aktivita CYP 2E1 u jednotlivých skupin ovcí, porovnání aktivit mezi játry a střevy

mikrosomy	specifická aktivita [pmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	431,212 ±72,740	402,986 ±77,882	252,557 ±44,597	213,520 ±4,388	290,405 ±26,151
střevo	3,569 ±2,222	2,400 ±1,446	0,690 ±0,299	1,799 ±0,636	2,560 ±1,420

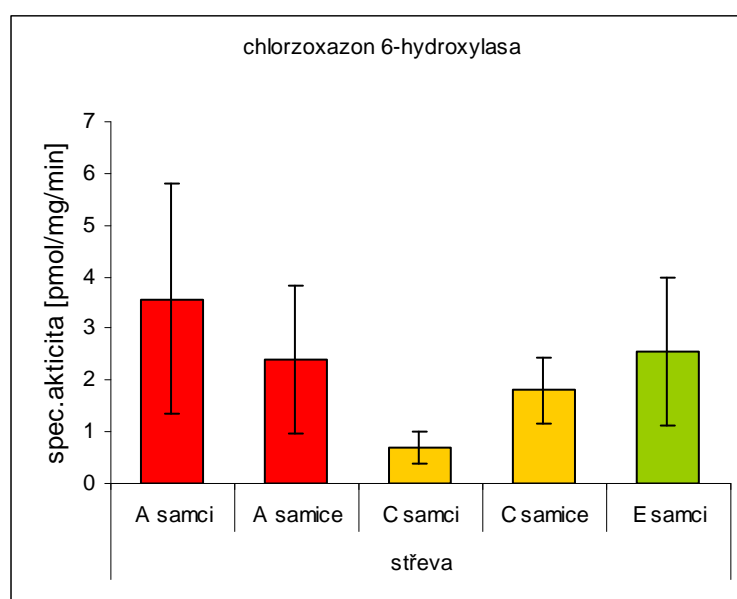


Obr. 29: Grafické porovnání specifických aktivit enzymu v játrech mezi skupinami ovcí

Hodnoty specifické aktivity CYP 2E1 (chlorzoxazon-6-hydroxylasy) se v jaterní frakci pohybovaly v řádu stovek pmol/mg/min.

Zdravé ovce vykazovaly vyšší aktivitu než ovce nemocné. Tento pozorovaný jev byl statisticky významný u samců i u samic skupiny A a C. Rovněž u déle nemocných ovcí (sk. E) došlo v porovnání se zdravými ovce k významnému snížení aktivity. Na základě této skutečnosti se dá usuzovat na inhibiční vliv parazitózy, a to i v případě jejího delšího trvání.

Odlišnost aktivit v rámci jednotlivých skupin, tzn. mezipohlavní rozdíly, nebyly ani v jedné skupině výrazné.



Obr. 30: Hodnoty specifických aktivit enzymu ve střevech u jednotlivých skupin

Ve střevní frakci se specifická aktivita enzymu pohybuje v řádu jednotek pmol/mg/min.

Enzymová aktivita u zdravých ovcí mírně převyšuje aktivitu u ovcí s parazitem, avšak tento rozdíl není statisticky významný.

Při srovnání aktivit enzymu v jaterní a střevní frakci je patrné, že aktivita střevního CYP 2E1 je o dva řády nižší.

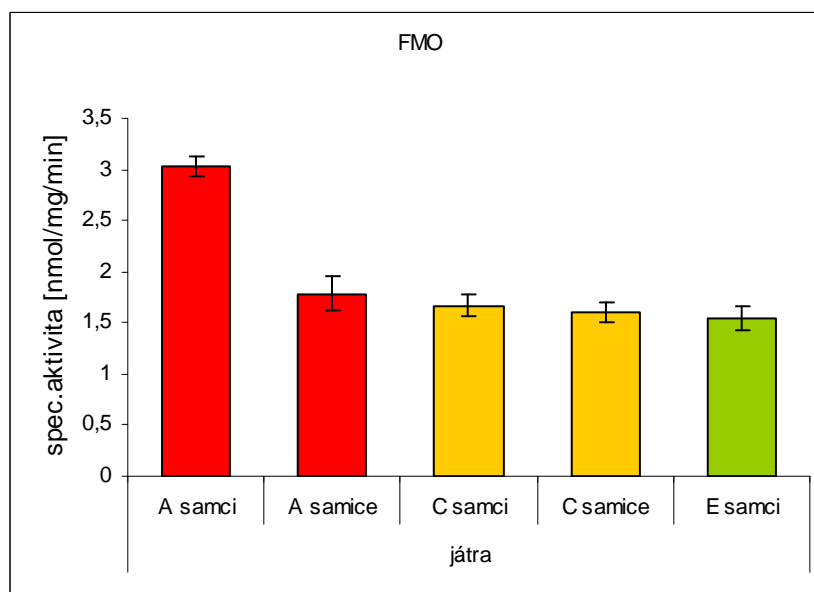
5.5 Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy

Specifická aktivita FMO byla určena na základě spektrofotometrického stanovení tvorby S-oxidu thiobenzamidu (viz 4.2.6). Měření probíhalo v mikrosomální frakci z jater.

V Tab. 8 jsou uvedeny průměrné hodnoty specifické aktivity FMO se směrodatnými odchylkami u zdravých a nemocných ovcí. Následuje grafické zobrazení aktivity.

Tab. 8: Porovnání hodnot specifické aktivity FMO v jaterních mikrosomech mezi skupinami ovcí

mikrosomy	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	3,032	1,784	1,670	1,597	1,540
	± 0,096	± 0,162	± 0,102	± 0,096	± 0,119



Obr. 31: Grafické vyjádření specifické aktivity jednotlivých skupin ovcí.

Specifická aktivita FMO se pohybovala od 1,540 nmol/mg/min (sk. E) do 3,032 nmol/mg/min (samci sk. A).

U zdravých samců je hodnota specifické aktivity statisticky významně vyšší než u nemocných samců ze skupiny C i E. U samic není rozdíl mezi skupinami patrný.

Ovlivnění aktivity FMO ve smyslu inhibice se projevilo pouze u samců, v případě FMO jsou tedy samci citlivější k inhibičnímu působení parazita než samice.

V rámci skupiny A vykazují samice signifikantně nižší aktivitu než samci. U skupiny C již rozdíl mezi pohlavími nebyl zaznamenán (inhibiční působení parazitózy se vztahuje jen na samce).

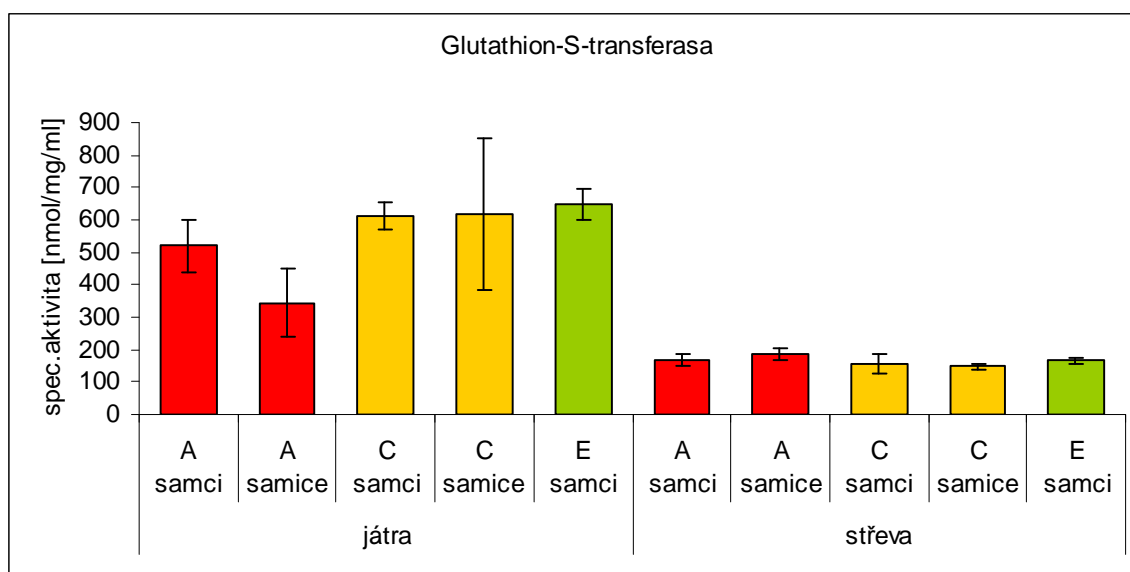
5.6 Stanovení glutathion-S-transferasy

Specifická aktivita GST byla měřena na základě spektrofotometrického stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu (viz kapitola 4.2.7). Aktivita byla zjišťována u všech skupin ovcí v cytosolické frakci z jater i střevní mukózy.

Tabulka (Tab. 9) zachycuje hodnoty specifické aktivity GST se směrodatnými odchylkami, grafické srovnání aktivit mezi zdravými a nemocnými ovci v jaterní a střevní frakci je na Obr. 32.

Tab. 9: Specifická aktivita GST u jednotlivých skupin ovcí v játrech a ve střevech

cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	520,094 ±81,030	344,655 ±106,952	614,404 ±42,254	618,590 ±233,326	648,702 ±46,488
střevo	169,585 ±17,127	186,261 ±19,677	156,439 ±32,362	147,034 ±9,007	165,444 ±10,232



Obr. 32: Grafické znázornění specifické aktivity GST v játrech a ve střevech

Specifická aktivita GST se pohybuje v řádu stovek nmol/mg/min, a to jak u jater, tak i u střev.

Aktivita GST v játrech je nejnižší u zdravých ovcí. To ukazuje na indukci enzymů vyvolanou parazitem *H. contortus*. Indukce se statisticky významně projevila u skupiny C, ke stejnému ovlivnění enzymu došlo i u dýle nemocných ovcí ve sk. E.

Ve skupině A mají větší aktivitu enzymu samci, ve skupině C tato závislost nebyla pozorována. Možným důvodem je vyšší indukce enzymu u samic než u samců.

Ve střevech byla aktivita GST mezi samci jednotlivých skupin srovnatelná, k ovlivnění aktivity hemonchózou nedošlo. U samic došlo u skupiny C k mírnému poklesu aktivity. Mezi pohlavími rozdíly pozorovány nebyly.

Hodnota aktivity ve střevech je oproti játrům několikrát menší.

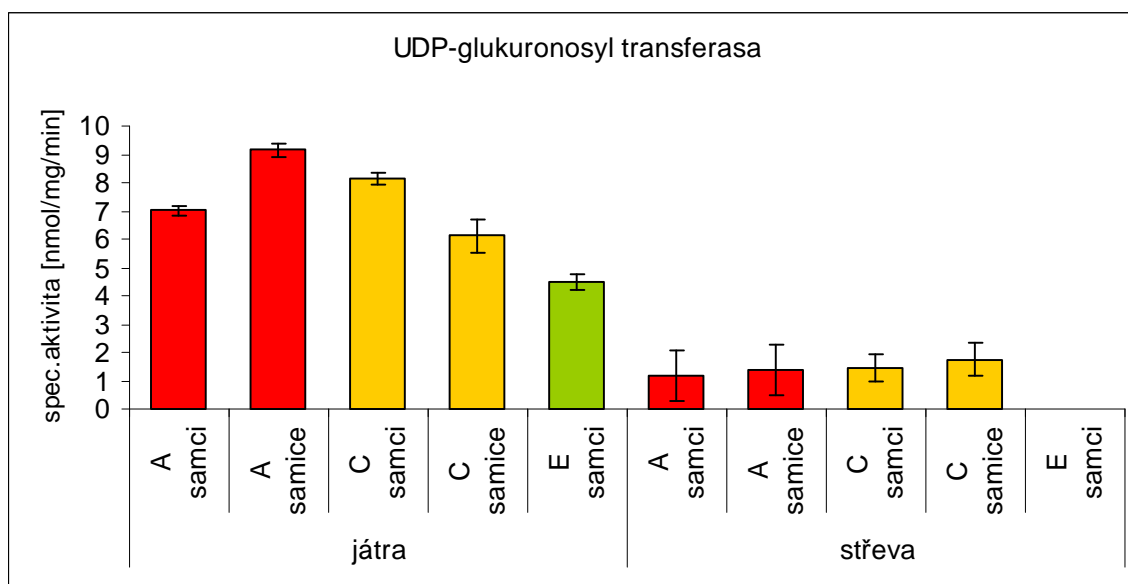
5.7 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy

Ke stanovení aktivity UGT byla použita spektrofotometrická metoda stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid. Měření aktivity bylo prováděno v mikrosomální frakci z jater a střevní mukózy.

Hodnoty průměrné specifické aktivity se směrodatnými odchylkami jsou pro skupiny A, C, E uvedeny v následující tabulce (Tab. 10). Grafické srovnání aktivit mezi zdravými a nemocnými ovci v jaterní a střevní frakci znázorňuje Obr. 33.

Tab. 10: Průměrné hodnoty specifické aktivity UGT v játrech a střevech pro jednotlivé skupiny ovcí

mikrosomy	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	7,016 ± 0,187	9,155 ± 0,242	8,119 ± 0,194	6,112 ± 0,580	4,480 ± 0,275
střeva	1,150 ± 0,900	1,395 ± 0,888	1,466 ± 0,495	1,745 ± 0,571	---



Obr. 33: Grafické porovnání aktivit jaterní a střevní UGT u zdravých a nemocných ovcí

Hodnoty aktivity UGT v játrech se pohybují od 4,480 (sk. E) do 9,155 nmol/mg/ml (samice sk. A). Ve střevech jsou hodnoty aktivity nižší, od 1,150 (samci sk. A) do 1,745 nmol/mg/ml (samice sk. C).

V játrech byly u samců v aktivitě UGT pozorovány statisticky významné rozdíly. U nemocných ovcí skupiny C došlo ke zvýšení aktivity konjugačního enzymu. Lze tedy předpokládat indukční vliv parazitózy. Avšak tento vliv není jednoznačný, protože u déle

nemocných ovcí dochází naopak k poklesu aktivity UGT. U samic se projevilo snížení aktivity, a to již při kratší expozici parazitu.

Rozdíly mezi pohlavími byly významné u skupiny A i C. Zatímco u skupiny A dominuje aktivita samic, u nemocných ovcí je tomu naopak. To může být způsobeno rozdílným působením parazita na aktivitu UGT mezi pohlavími.

Ve střevech nebyly mezi zdravými a nemocnými ovcemi (sk. C) vyzorovány rozdíly v aktivitě UGT (jak u samců, tak u samic). Ovlivnění aktivity UGT se projevilo až u déle trvající parazitózy, u níž došlo k inhibici enzymu. Rozdíly mezi pohlavími nebyly zaznamenány.

5.8 Spektrofotometrické stanovení aktivity redukčních enzymů

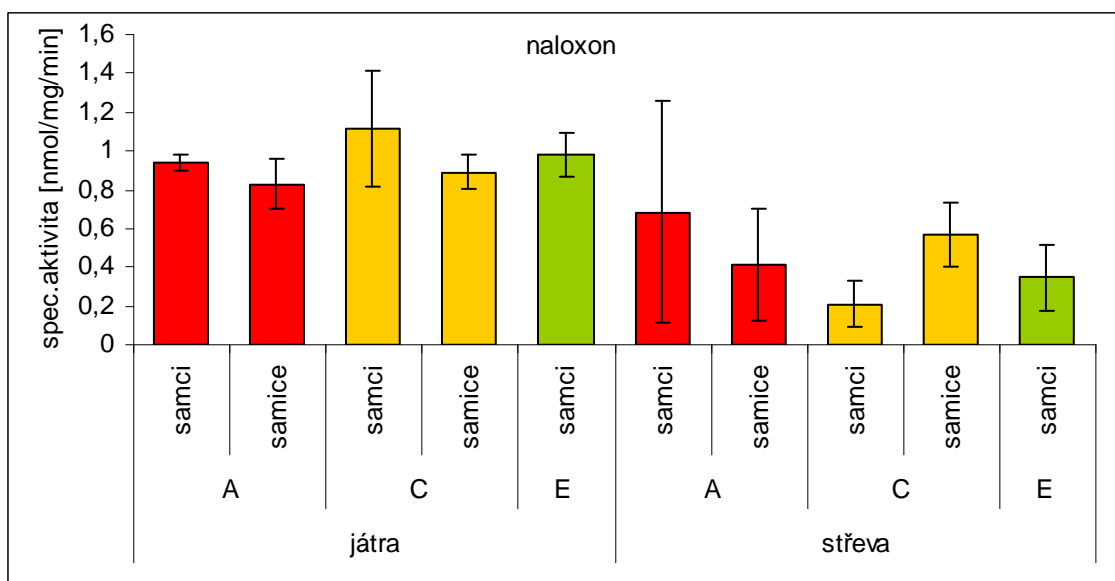
Aktivita reduktas jednotlivých substrátů byla stanovena spektrofotometrickou metodou, založenou na měření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP⁺ (popř. vzrůstu absorbance způsobeném přeměnou NADP⁺ na NADPH). Stanovení bylo prováděno v cytosolu jater a střev, u substrátu metyraponu a 4-pyridinkarboxaldehydu rovněž i v mikrosomech.

V tabulkách jsou uvedeny hodnoty specifických aktivit a jejich směrodatných odchylek u všech skupin ovcí v játrech a střevech. Za každou tabulkou, která se vztahuje vždy k jednomu substrátu, následuje grafické porovnání aktivity mezi jednotlivými skupinami.

5.8.1 Reduktasy naloxonu (AKR 1C1, 1C2, 1C4)

Tab. 11: Specifická aktivita reduktas naloxonu u jednotlivých skupin ovcí v játrech a ve střevech

NALOXON cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	0,938 ± 0,043	0,829 ± 0,129	1,111 ± 0,299	0,890 ± 0,087	0,977 ± 0,115
střeva	0,686 ± 0,592	0,411 ± 0,290	0,210 ± 0,121	0,570 ± 0,165	0,347 ± 0,172



Obr. 34: Grafické porovnání aktivity reductas naloxonu mezi skupinami ovcí a mezi játry a střevy

Hodnoty aktivity se v játrech pohybovaly od 0,829 do 1,111 nmol/mg/min, u střev byla zaznamenána nižší aktivita (0,210 – 0,686 nmol/mg/min).

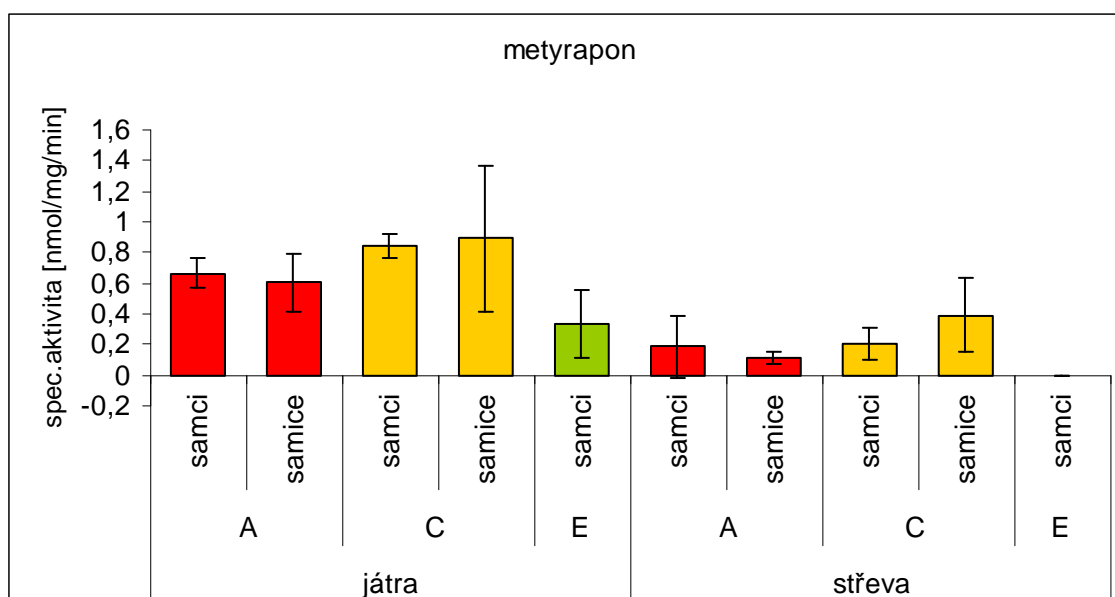
V játrech zdravých ovcí byla naměřena nepatrně nižší aktivita než u skupin nemocných ovcí, avšak tento rozdíl není významný. Rovněž mezi pohlavími se neprojevil významný rozdíl.

Ve střevech je situace obdobná, rozdíly nebyly pozorovány ani mezi skupinami, ani mezi pohlavími v rámci jednotlivých skupin.

5.8.2 Reduktasy metyraponu (AKR 1C, CR, 11 β -HSD)

Tab. 12: Průměrné hodnoty specifické aktivity reductas metyraponu v cytosolické frakci jater a střev u jednotlivých skupin ovcí

METYRAPON cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	0,662 ± 0,097	0,606 ± 0,186	0,841 ± 0,076	0,891 ± 0,477	0,338 ± 0,222
střeva	0,187 ± 0,201	0,116 ± 0,038	0,204 ± 0,107	0,393 ± 0,243	--- ---



Obr. 35: Porovnání aktivity reduktas metyraponu v cytosolu mezi zdravými a nemocnými ovci a mezi játry a střevy

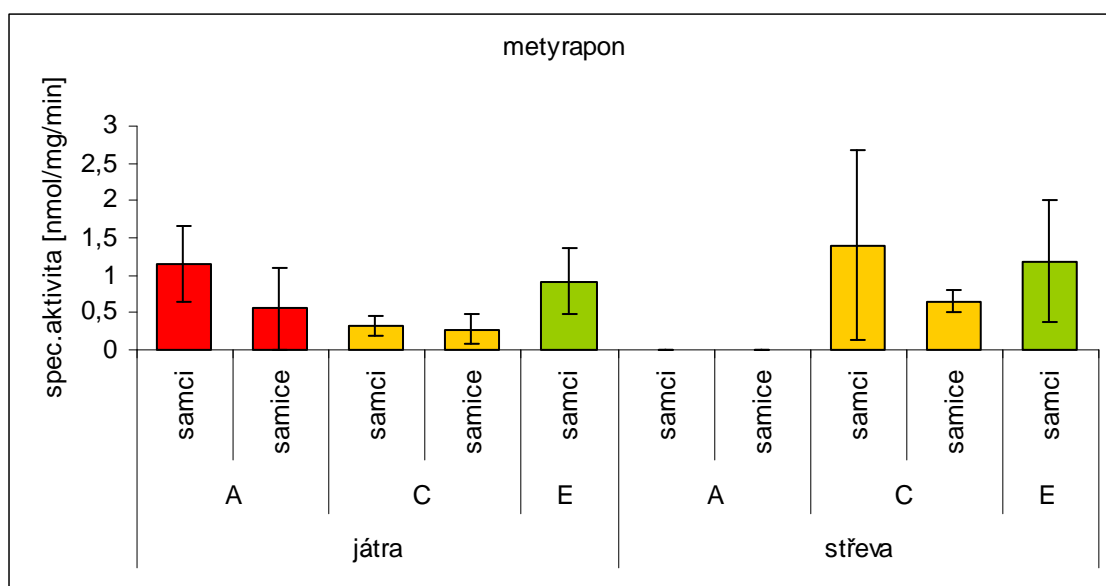
Hodnoty specifické aktivity reduktas metyraponu se v cytosolu pohybovaly v řádu desetin nmol/mg/min.

Játra zdravých ovcí vykazovala v porovnání s nemocnými ovci skupiny C nižší aktivitu reduktas metyraponu. Naopak u děle nemocných ovcí došlo oproti skupině A ke snížení aktivity. Rozdíly však nebyly statisticky významné. Mezipohlavní rozdíly v rámci jednotlivých skupin nebyly zaznamenány.

Rovněž ve střevech nebyly nalezeny významné rozdíly mezi skupinami A a C, ani mezi pohlavími v rámci těchto skupin. U samců skupiny E byla nalezena nulová aktivita, inhibiční vliv parazita se zřejmě projeví po delší době.

Tab. 13: Průměrné hodnoty specifické aktivity reduktas metyraponu v mikrosomální frakci jater a střev u jednotlivých skupin ovcí

METYRAPON mikrosomy	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	1,146 ± 0,513	0,550 ± 0,541	0,317 ± 0,138	0,281 ± 0,198	0,918 ± 0,437
střeva	---	---	1,405 ± 1,260	0,655 ± 0,138	1,192 ± 0,819



Obr. 36: Porovnání aktivity reductas metyraponu v mikrosomech mezi zdravými a nemocnými ovceci a mezi játry a střevy

Velikost aktivity reductas metyraponu v mikrosomech se příliš neliší od hodnot v cytosolu.

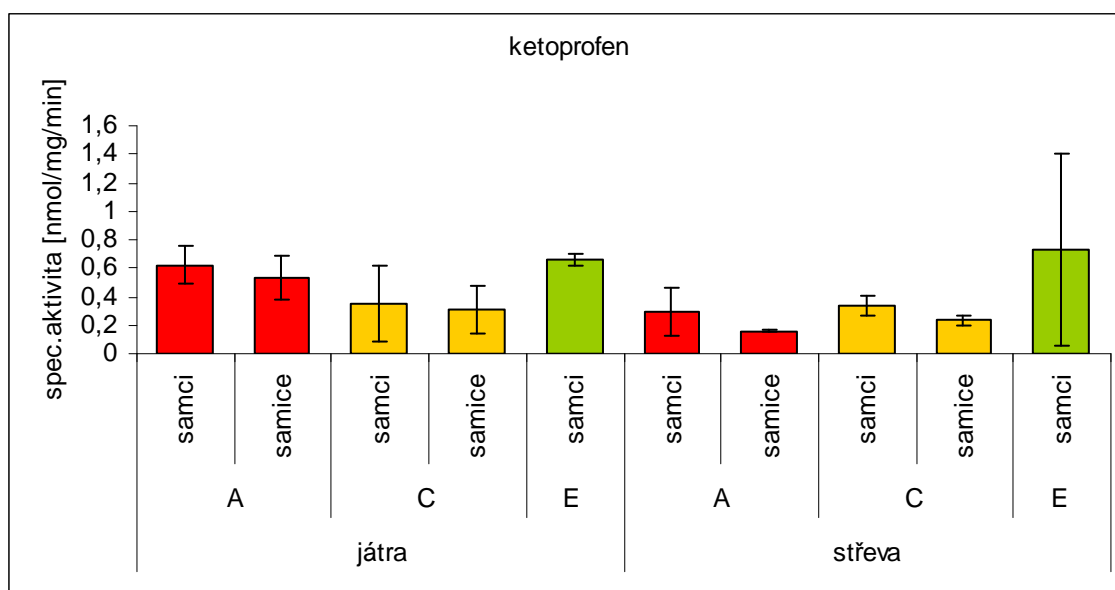
V játrech nebyl pozorován vliv parazita na aktivitu enzymů, aktivita reductas u zdravých a nemocných ovčí se neliší. Rovněž mezi pohlavími nebyl zaznamenán rozdíl.

Ve střevní frakci byla u zdravých ovčí naměřena nulová aktivita. Nemocné ovce určitou aktivitu reductas vykazují.

5.8.3 Reduktasy ketoprofenu (AKR 1C1, 1C2, 1C4)

Tab. 14: Specifická aktivita reductas ketoprofenu u jednotlivých skupin ovčí v játrech a ve střevech

KETOPROFEN cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	0,622 ± 0,136	0,531 ± 0,159	0,347 ± 0,267	0,310 ± 0,173	0,657 ± 0,044
střeva	0,294 ± 0,164	0,161 ± 0,008	0,339 ± 0,068	0,234 ± 0,034	0,731 ± 0,677



Obr. 37: Porovnání aktivity reductas ketoprofenu mezi játry a střevy jednotlivých skupin ovcí

Hodnoty specifické aktivity reductas ketoprofenu se v cytosolu pohybovaly v řádu desetin nmol/mg/min. U jater byla aktivita nepatrně vyšší než u střev.

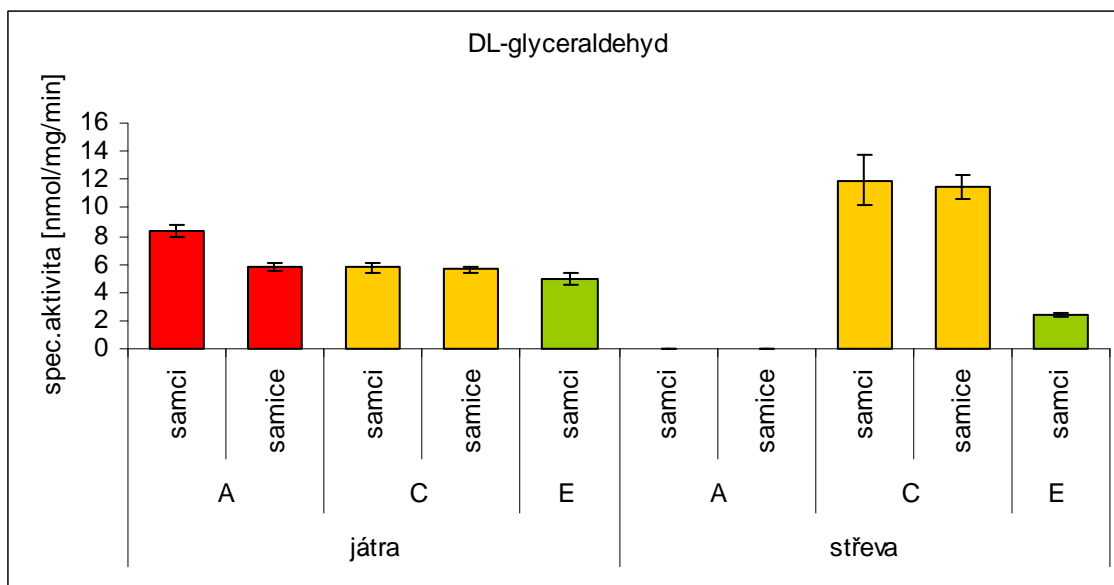
V játrech ovcí skupiny A byla naměřena o něco vyšší aktivita než u nemocných ovcí ze skupiny C. Tento rozdíl však není statisticky významný. Rovněž mezi pohlavími se neprojevil významný rozdíl.

Ve střevech nebyly mezi zdravými a nemocnými samci zaznamenány rozdíly. U samic se určitá odlišnost projevila (samice skupiny C vykazují vyšší aktivitu). Rozdíly v aktivitě enzymů mezi pohlavími se nevyskytují.

5.8.4 Reduktasy DL-glyceraldehydu (AKR 1A1)

Tab. 15: Hodnoty specifické aktivity se směrodatnými odchylkami u zdravých a nemocných ovcí v játrech a střevech

DL-GLYCERALDEHYD cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	8,384 ± 0,441	5,789 ± 0,266	5,738 ± 0,415	5,600 ± 0,158	4,935 ± 0,400
střeva	---	---	11,956 ± 1,775	11,520 ± 0,867	2,396 ± 0,139



Obr. 38: Grafické vyjádření aktivity reduktas DL-glyceraldehydu mezi jednotlivými skupinami

Hodnoty specifické aktivity reduktas DL-glyceraldehydu dosahují jednotek nmol/mg/min.

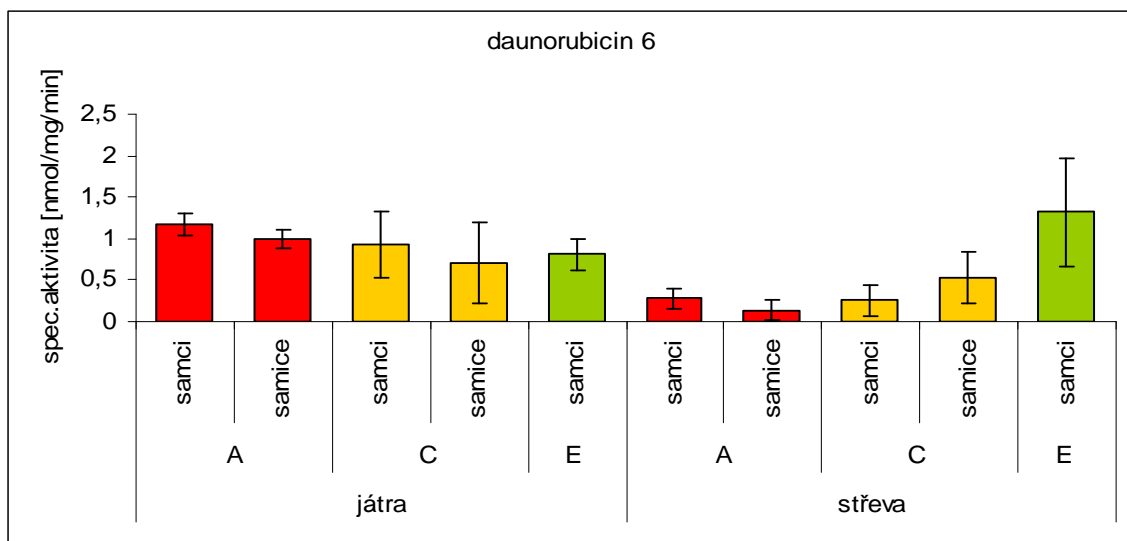
V játrech byla u zdravých samců naměřena vyšší aktivita než u samců ovlivněných parazitózou. Tento rozdíl byl pomocí Studentova nepárového T-testu vyhodnocen jako statisticky významný. Inhibice aktivity enzymů se pravděpodobně týká pouze samců. Mezi samicemi skupiny A a C odlišnosti nebyly zaznamenány. Rozdíly mezi pohlavími se týkají pouze skupiny A, kdy aktivita u samců převyšuje aktivitu u samic.

Ve střevech byla u zdravých ovcí naměřena nulová aktivita, zatímco u skupiny C byla zjištěna aktivita vyšší než u téže skupiny v játrech i než u skupiny E. To vede k předpokladu, že ve střevech dochází působením parazita k indukci reduktas DL-glyceraldehydu. Rozdíly mezi samci a samicemi ve skupině C nebyly zaznamenány.

5.8.5 Reduktasy daunorubicinu (pH 6,0; AKR 1C2, CR)

Tab. 16: Průměrné hodnoty specifické aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0 v játrech a střevech u jednotlivých skupin ovcí

DAUNORUBICIN cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	1,171 ± 0,125	1,000 ± 0,106	0,934 ± 0,398	0,715 ± 0,489	0,809 ± 0,191
střevo	0,279 ± 0,119	0,143 ± 0,117	0,258 ± 0,183	0,538 ± 0,308	1,319 ± 0,653



Obr. 39: Grafické srovnání aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6 mezi zdravými a nemocnými ovce v játrech a střevech

Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 6,0 se pohybovala v desetinách nmol/mg/min. Střevo vykazovala o něco nižší aktivitu než játra.

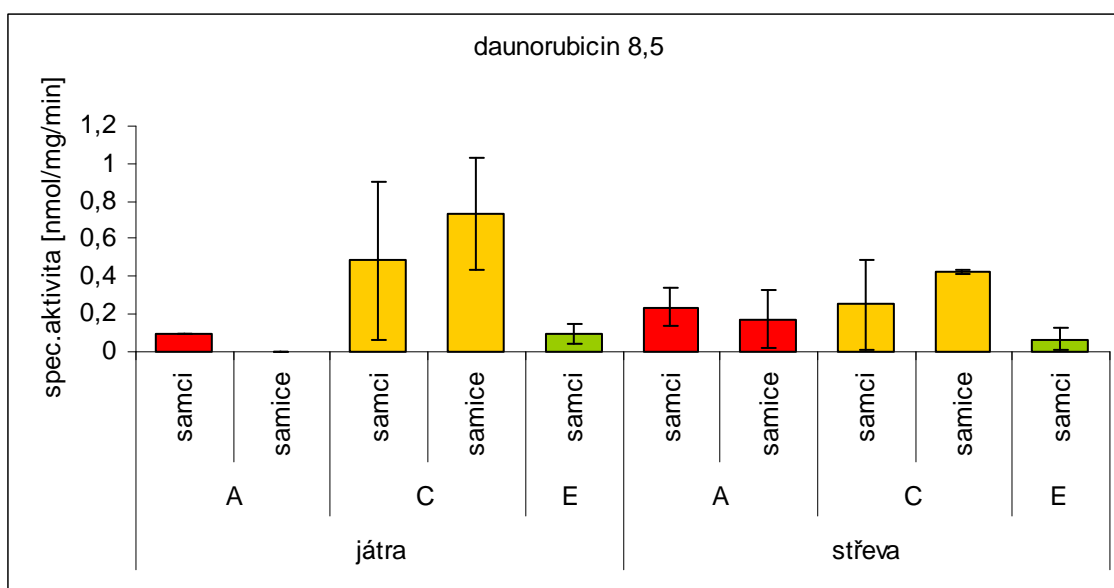
V játrech nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Parazitóza tedy nemá vliv na aktivitu enzymů. Rovněž mezi pohlavími se neprojevil významný rozdíl.

U střev je situace obdobná, nebyly zjištěny rozdíly mezi zdravými a nemocnými ovce ani mezi pohlavími.

5.8.6 Reduktasy daunorubicinu (pH 8,5; aldehydreduktasa)

Tab. 17: Specifická aktivita reductas daunorubicinu při pH 8,5 u jednotlivých skupin ovcí v játrech a ve střevech

DAUNORUBICIN cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	0,091 ±0,00003	--- ---	0,485 ± 0,418	0,731 ± 0,300	0,095 ± 0,055
střevo	0,238 ± 0,098	0,173 ± 0,152	0,250 ± 0,240	0,428 ± 0,011	0,067 ± 0,058



Obr. 40: Porovnání aktivity reductas daunorubicinu při pH 8,5 mezi játry a střevy jednotlivých skupin ovcí

Aktivita reductas daunorubicinu při pH 8,5 se pohybuje v rozmezí setin až desetin nmol/mg/min.

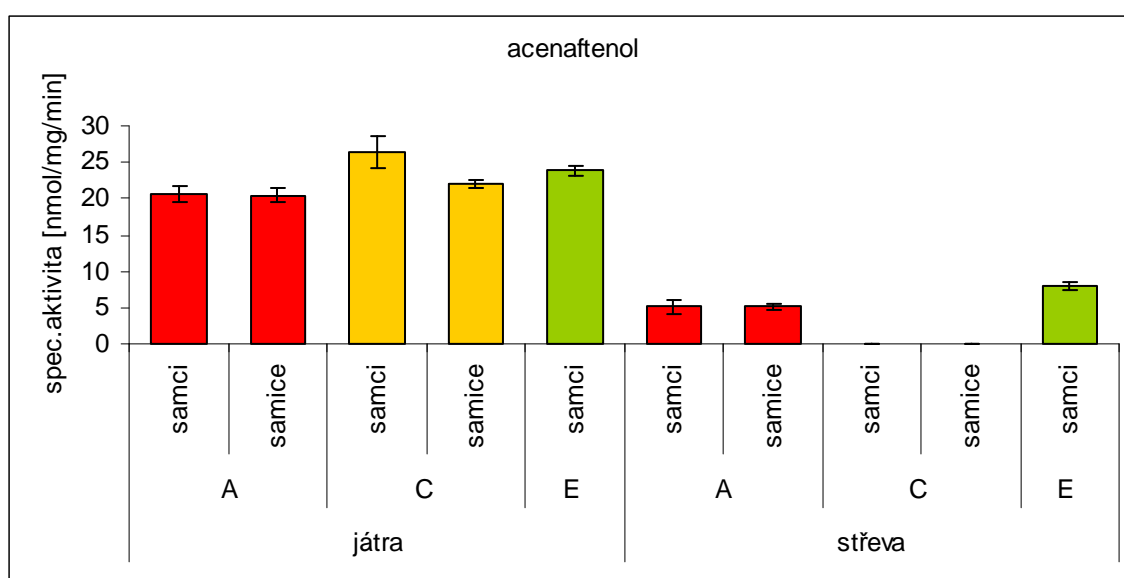
V játrech byla u nemocných ovcí ze skupiny C naměřena vyšší aktivita než u ovcí skupiny A. Tento rozdíl nebyl statisticky významný. Odlišnosti v aktivitě enzymu mezi pohlavími se neprojevily.

Ve střevech nebyly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými skupinami ani mezi pohlavími.

5.8.7 Reduktasy acenaftenolu (AKR 1C1, 1C2, 1C3, 1C4)

Tab. 18: Hodnoty specifické aktivity reductas naloxonu u jednotlivých skupin ovcí v játrech a ve střevech

ACENAFTENOL cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	20,604 ± 1,151	20,462 ± 0,953	26,419 ± 2,124	22,034 ± 0,658	23,885 ± 0,677
střeva	5,0922 ±1,0746	5,1195 ±0,3176	0,0021 ±0,0006	0,0017 ±0,0003	8,0475 ±0,5408



Obr. 41: Porovnání aktivity reductas acenaftenolu mezi játry a střevy jednotlivých skupin ovcí

Aktivita jaterních enzymů je v porovnání se střevními vyšší. V játrech dosahuje hodnot od 20,462 do 26,419 nmol/mg/min. Ve střevech se pohybuje od 0,0017 do 8,048 nmol/mg/min.

V játrech se u samců projevuje indukční vliv parazitózy, u zdravých samců je aktivita nižší než u nemocných samců ze skupin C a E. U samic není ovlivnění parazitem patrné. U zdravých ovcí nebyly zjištěny mezipohlavní rozdíly, které se však u skupiny C projevují (dáno vlivem parazita pouze na enzymy samců).

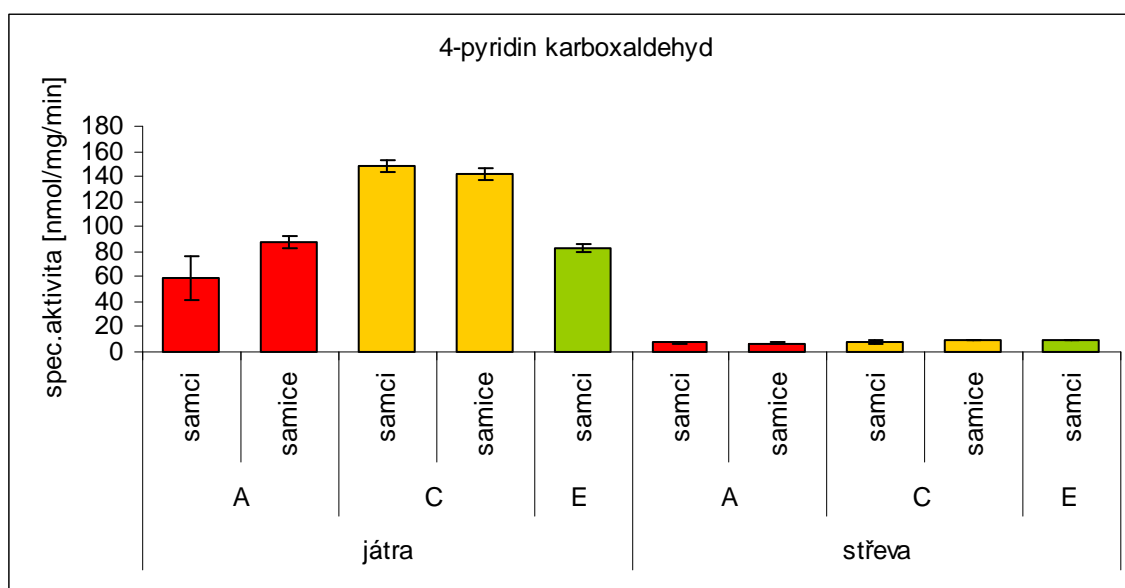
U střev dochází u skupiny C ke značnému poklesu aktivity reductas acenaftenolu. Naopak skupina E se vyznačuje vyšší aktivitou enzymů než zdravé ovce. To vede k předpokladu, že kratší působení parazita na hostitele vede ve střevech k inhibici

aktivity, zatímco déle trvající parazitóza ke zvýšení aktivity. Mezipohlavní rozdíly se významněji projeví jen u skupiny C.

5.8.8 Reduktasy 4-pyridinkarboxaldehydu (AKR 1A1, 1C1, 1C2, 1C4, 3 α -HSD)

Tab. 19: Průměrné hodnoty specifické aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolické frakci jater a střev u jednotlivých skupin ovcí

pyridinkarboxaldehyd cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	59,028 ±16,924	87,307 ±4,789	148,499 ±4,570	141,032 ±4,802	82,769 ±3,473
střevo	7,463 ±0,663	6,876 ±0,402	8,067 ±0,924	8,917 ±0,125	9,537 ±0,315



Obr. 42: Porovnání aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v cytosolu mezi zdravými a nemocnými ovci a mezi játry a střevy

Hodnoty specifické aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu se v cytosolu v játrech pohybovaly v řádu desítek až stovek nmol/mg/min. Střevo se vyznačují nižší aktivitou (jednotky nmol/mg/min).

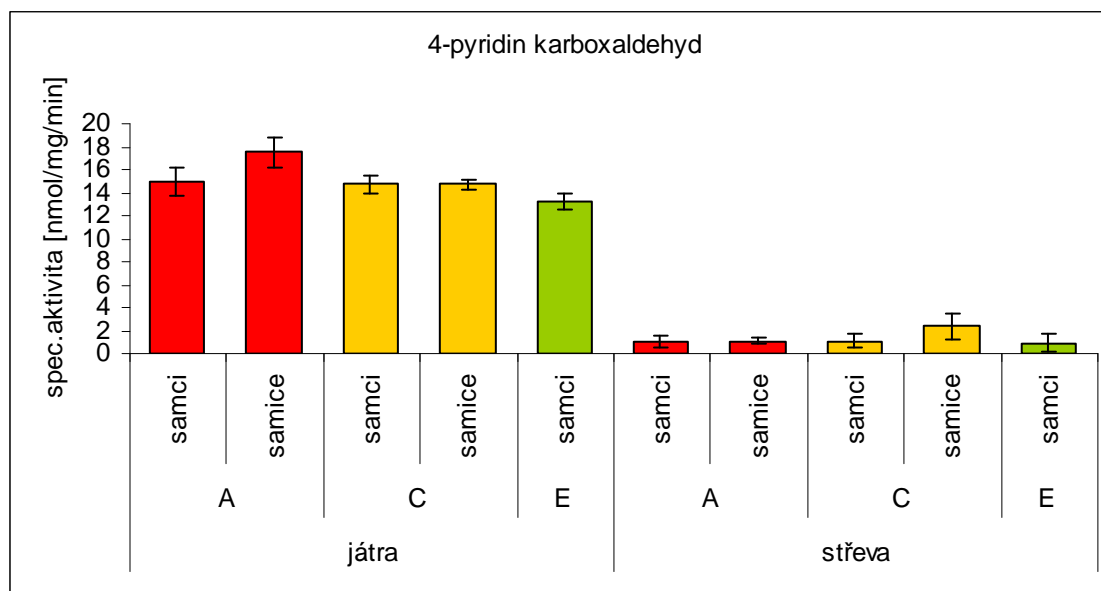
V játrech došlo u samců k ovlivnění enzymové aktivity parazitózou ve smyslu indukce, aktivita u zdravých samců je statisticky významně nižší než u samců skupiny

C. Delší působení parazita na hostitele nemělo na aktivitu enzymů vliv. U samic se rovněž projevilo zvýšení enzymové aktivity. Mezi pohlavími v rámci jednotlivých skupin byl rozdíl zaznamenán pouze u skupiny A.

Ve střevech u samců skupiny A a C nebyl zjištěn vliv parazitózy na aktivitu enzymů. U děle nemocných samců byla naměřena vyšší aktivita. Indukční vliv parazitózy se u samců ve střevě zřejmě projevuje až po delší době. U samic bylo zvýšení aktivity pozorováno již při kratším vystavení parazitu. Mezipohlavní rozdíly nebyly zaznamenány.

Tab. 20: Průměrné hodnoty specifické aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v mikrosomální frakci jater a střev u jednotlivých skupin ovcí

pyridinkarboxaldehyd mikrosomy	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	14,989 ±1,195	17,480 ±1,288	14,711 ±0,831	14,752 ±0,458	13,216 ±0,758
střeva	1,032 ±0,551	1,071 ±0,273	1,102 ±0,551	2,365 ±1,116	0,937 ±0,731



Obr. 43: Porovnání aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v mikrosomech mezi zdravými a nemocnými ovci a mezi játry a střevy

Hodnoty specifické aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu se v mikrosomech v játrech pohybovaly v řádu desítek nmol/mg/min, ve střevech byla naměřena nižší aktivita (jednotky nmol/mg/min). Ve srovnání s cytosolem byly aktivity nižší.

U jaterních enzymů nebyly rozdíly mezi samci patrné. U samic došlo vlivem parazitózy k poklesu aktivity, lze tedy předpokládat inhibiční vliv parazitózy na samice. Mezipohlavní rozdíly nebyly zaznamenány.

Ve střevech nebyly rozdíly pozorovány ani mezi jednotlivými skupinami, ani mezi pohlavími v rámci skupin.

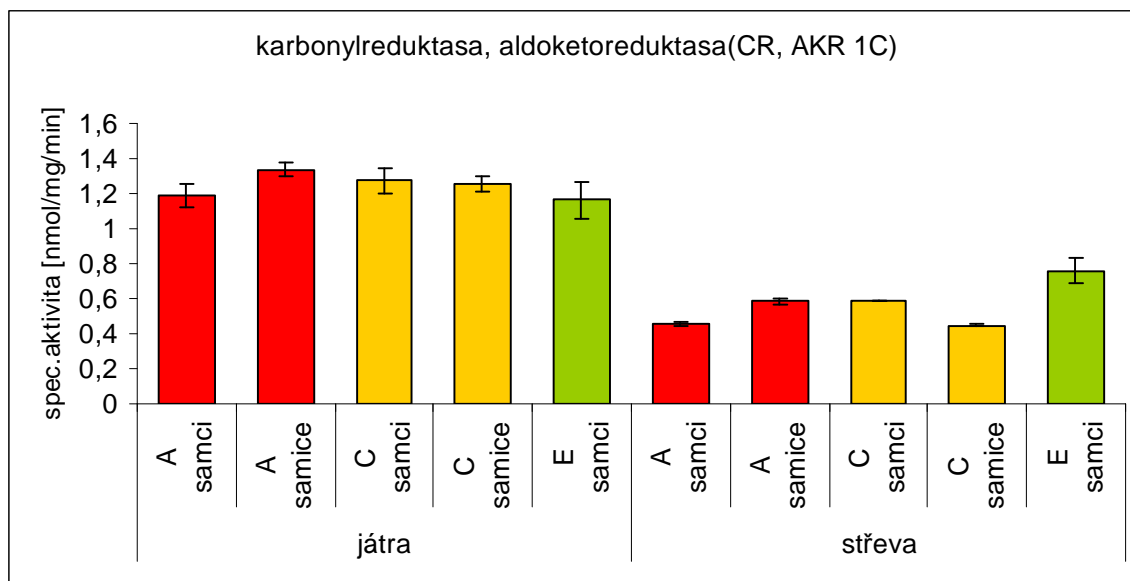
5.9 Stanovení aktivity AKR 1C a CR vůči oracinu

Aktivita AKR 1C a CR byla stanovena pomocí HPLC analýzy metabolitů oracinu. Té předcházela inkubace biologických frakcí s oracinem a následná extrakce metabolitů (viz kapitola 4.2.10). Měření bylo prováděno u jaterního a střevního cytosolu.

V tabulce (Tab. 21) jsou uvedeny průměrné hodnoty specifické aktivity CYP 2E1 s příslušnými směrodatnými odchylkami. Grafické srovnání aktivit je na Obr. 44.

Tab. 21: Hodnoty specifické aktivity AKR 1C a CR u jednotlivých skupin ovcí v játrech a ve střevech

cytosol	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	1,191 ± 0,068	1,339 ± 0,040	1,274 ± 0,076	1,261 ± 0,044	1,164 ± 0,105
střevo	0,455 ± 0,012	0,584 ± 0,021	0,592 ± 0,002	0,448 ± 0,005	0,761 ± 0,072



Obr. 44: Porovnání aktivity AKR 1C a CR v cytosolu mezi zdravými a nemocnými ovce a mezi játry a střevy

Specifická aktivita AKR 1C a CR se v játrech pohybovala od 1,164 do 1,339 nmol/mg/ml. Ve střevech byla aktivita o něco nižší, od 0,448 do 0,761 nmol/mg/min.

V játrech nebyly mezi zdravými a nemocnými samci zjištěny rozdíly v enzymové aktivitě. Ovlivnění aktivity působením parazita se neprokázalo ani v případě samic. Odlišnosti v aktivitě enzymů mezi pohlavími v rámci jednotlivých skupin se projeví pouze u skupiny A.

Ve střevech se vliv hemonchózy na aktivitu enzymů projevil u samců i samic. Zatímco u samic došlo k inhibici aktivity, u samců naopak k indukci. U déle nemocných samců skupiny E bylo zvýšení aktivity výraznější než u skupiny C. U zdravých ovcí se vyšší aktivitou AKR 1C a CR vyznačují samice, u nemocných naopak samci. Tyto mezupohlavní rozdíly jsou statisticky významné.

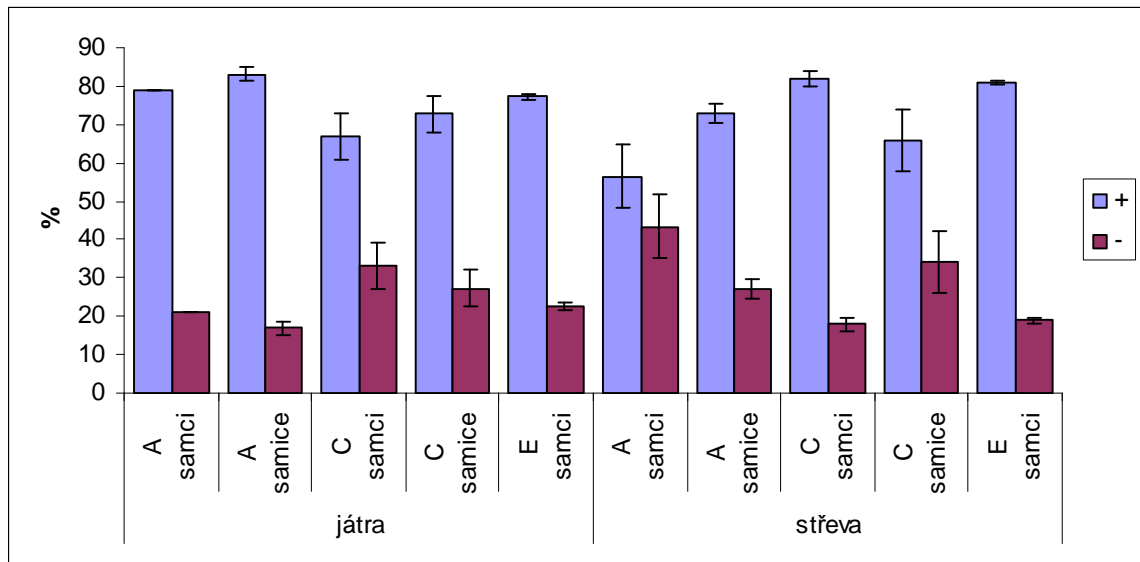
Kromě aktivity AKR 1C a CR bylo rovněž zjišťováno procentuální zastoupení obou vznikajících enantiomerů dihydrooracinu. Hodnoty jsou zaznamenány v Tab. 22 a Tab. 23, grafické vyjádření na Obr. 45.

Tab. 22: Procentuální zastoupení (+)-DHO a (-)-DHO v játrech působením cytosolické frakce

cytosol játra	%				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
(+)-DHO	78,90	83,10	66,87	72,77	77,27
(-)-DHO	21,10	16,90	33,13	27,23	22,73

Tab. 23: Procentuální zastoupení (+)-DHO a (-)-DHO ve střevech působením cytosolické frakce

cytosol střeva	%				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
(+)-DHO	56,53	72,80	81,97	65,77	81,13
(-)-DHO	43,47	27,20	18,03	34,23	18,87



Obr. 45: Procentuální zastoupení (+)-DHO a (-)-DHO vznikajících v cytosolické frakci

Při parazitóze trvající kratší dobu se v játrech u samců trochu snižuje poměr (+)-DHO/(-)-DHO. U střev dochází naopak vlivem parazitózy ke zvýšení poměru (+)-DHO/(-)-DHO, a to u skupiny C i E. Samice nejsou ovlivněny.

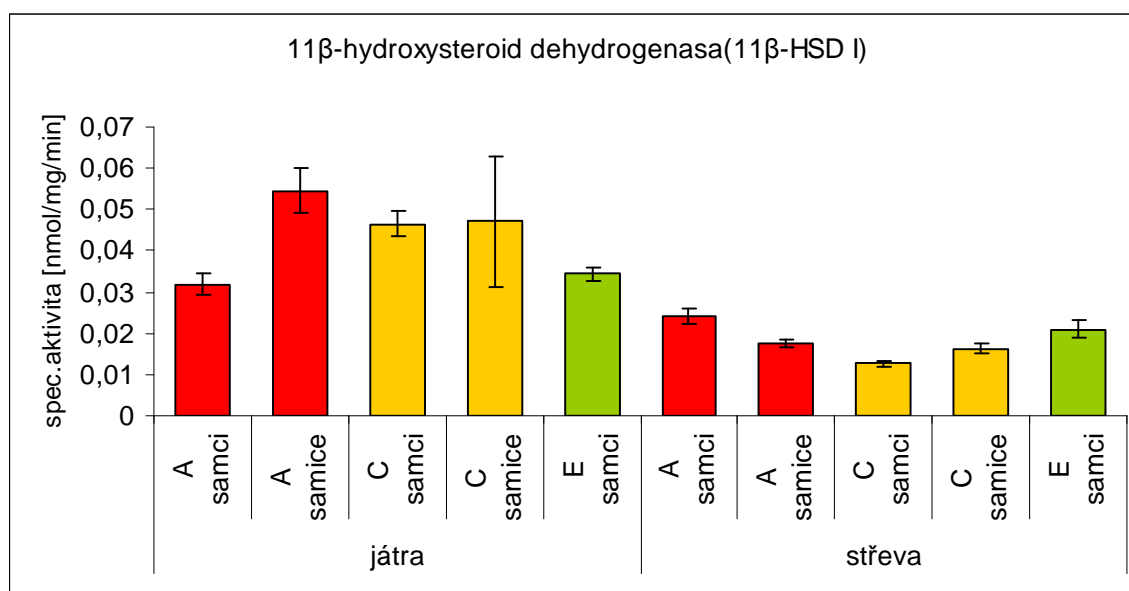
5.10 Stanovení aktivity 11 β -HSD typu 1 vůči oracinu

Aktivita 11 β -HSD 1 byla stanovena metodou inkubace mikrosomálních frakcí s oracinem s následnou extrakcí a HPLC analýzou metabolitů oracinu. Měření bylo prováděno u mikrosomů v játrech a střevech.

Následující tabulka zachycuje průměrné hodnoty aktivity se směrodatnými odchylkami. Grafické srovnání aktivit mezi zdravými a nemocnými ovci v jaterní a střevní frakci znázorňuje Obr. 46.

Tab. 24: Specifická aktivita AKR 1C a CR u jednotlivých skupin ovcí, porovnání aktivit mezi játry a střevy

mikrosomy	specifická aktivita [nmol/mg/min]				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
játra	0,032 ± 0,003	0,055 ± 0,005	0,047 ± 0,003	0,047 ± 0,016	0,034 ± 0,002
střeva	0,024 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,021 ± 0,002



Obr. 46: Grafické vyjádření specifických aktivit v mikrosomech jater a střev jednotlivých skupin ovcí

Hodnoty specifické aktivity 11 β -HSD 1 se pohybují v řádu desetin nmol/mg/min v játrech i střevech. Střeva se v porovnání s játry vyznačují nižší aktivitou.

V játrech měla parazitóza na aktivitu enzymu u samců skupiny C významný vliv, a to ve smyslu indukce. Déle nemocní samci tento trend nepotvrzují. Mezi zdravými a nemocnými samci odlišnosti pozorovány nebyly. Mezipohlavní rozdíly v rámci jedné skupiny byly zjištěny pouze u zdravých ovcí (aktivita samic je vyšší).

Rovněž ve střevech byly rozdílné aktivity zaznamenány pouze u samců. Zde však naopak došlo k inhibičnímu působení parazitózy (nemocní samci ze skupiny C vykazují nižší aktivitu, u skupiny E vliv parazitózy už nebyl zaznamenán). U samic nebyl rozdíl v aktivitě zjištěn. U skupiny A i C je velikost aktivity ovlivněna pohlavím.

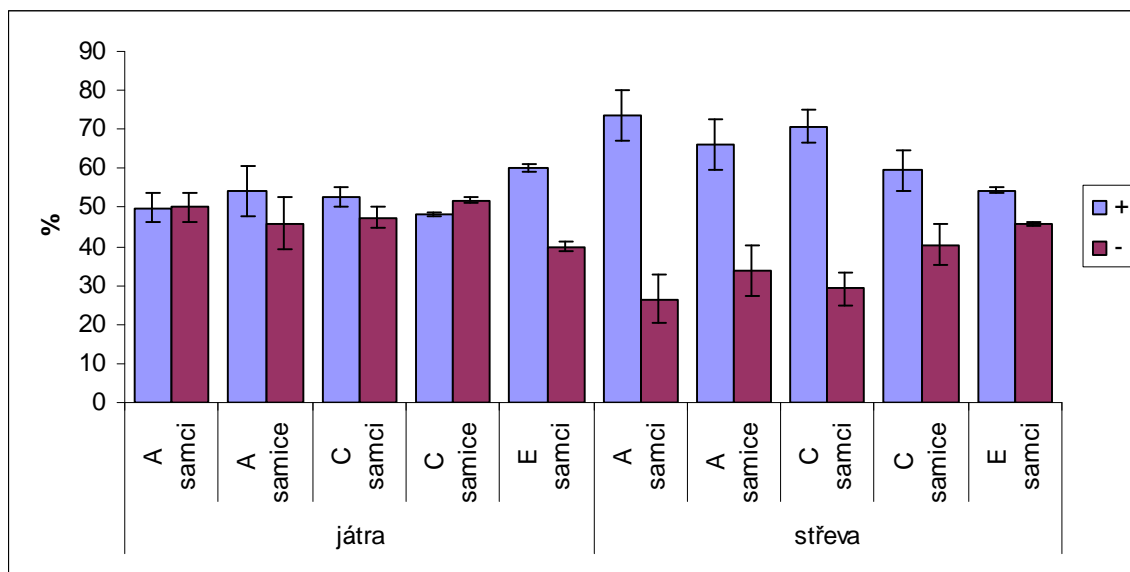
Kromě aktivity 11 β -HSD 1 bylo u mikrosomů, stejně jako u cytosolu, zjišťováno i procentuální zastoupení obou vznikajících enantiomerů dihydrooracinu. Hodnoty jsou vyjádřeny v Tab. 25 a Tab. 26. Grafické vyjádření je na Obr. 47.

Tab. 25: Procentuální zastoupení (+)-DHO a (-)-DHO v játrech působením mikrosomální frakce

mikrosomy játra	%				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
(+)-DHO	49,97	54,13	52,60	48,13	60,13
(-)-DHO	50,03	45,87	47,40	51,87	39,87

Tab. 26: Procentuální zastoupení (+)-DHO a (-)-DHO ve střevech působením mikrosomální frakce

mikrosomy střeva	%				
	A samci	A samice	C samci	C samice	E samci
(+)-DHO	73,50	66,17	70,85	59,57	54,40
(-)-DHO	26,50	33,83	29,15	40,43	45,60



Obr. 47: Grafické porovnání množství vznikajícího (+)-DHO a (-)-DHO v procentech působením mikrosomální frakce

V játrech je u zdravých samců zastoupení (+)-DHO i (-)-DHO 50%. U nemocných samců ze skupiny C je množství (+)-DHO 52%, u skupiny E už 60% (statisticky významné).

Ve střevech se oproti zdravým ovčím poměr (+)-DHO/(-)-DHO snižuje u skupiny děle nemocných ovcí ze skupiny E.

U samic nebyly pozorovány změny poměru (+)-DHO/(-)-DHO ani u jater ani u střev.

6. DISKUSE

Cílem této práce bylo zjistit, jak parazitóza způsobená vlasovkou slézovou ovlivňuje aktivitu enzymů u ovce domácí. V závislosti na sledovaném enzymu byly vypořádovány všechny tři možnosti ovlivnění - indukce, inhibice či žádná změna aktivity. Byly sledovány enzymy oxidační, konjugační i redukční. Aktivita byla zjišťována v mikrosomální a cytosolické frakci získané z jater a střevní mukózy ovce domácí. Hodnocení probíhalo pomocí Studentova nepárového T-testu s hladinou spolehlivosti 0,95.

Hodnoty aktivity byly vztaženy na mg proteinu, čímž byla získána specifická aktivita. Z tohoto důvodu bylo nutné stanovit koncentraci proteinů v jednotlivých frakcích. V cytosolu byla zjištěna vyšší koncentrace než v mikrosomech, tento fakt byl pozorován už dříve, např. Szotáková et al 2004. V obou těchto frakcích koncentrace proteinů v játrech převyšuje množství proteinů ve střevě. To je dáno tím, že v játrech se nachází více enzymů, protože játra jsou hlavním orgánem metabolismu léčiv. Množství proteinů se významně nelišilo mezi pohlavími, ani mezi skupinami zdravých a nemocných ovcí. Z toho vyplývá, že parazitóza nemění celkové množství proteinů. Může ale ovlivňovat hladinu proteinů jednotlivých enzymů či podíl neaktivní formy enzymu při zachování stejné celkové koncentrace proteinů.

Z **oxidačních enzymů** byly sledovány cytochromy P450, konkrétně EROD (CYP 1A1, částečně CYP 1A2), MROD (CYP 1A2, částečně 1A1), BROD (CYP 3A, 2B), PROD (CYP 2B), CYP 2C9, CYP 2E1, a dále flavinové monooxygenasy.

V játrech měření enzymové aktivity u zdravých a nemocných ovcí neprokázalo vliv parazitózy u PROD, u samic rovněž u FMO. Na rozdíl od samic byl u infikovaných samců v porovnání s kontrolní skupinou zaznamenán signifikantní pokles FMO. Z toho lze usuzovat na mezipohlavní rozdíly v citlivosti na působení parazita.

U EROD, MROD, BROD, 2C9, 2E1 došlo u samců i samic ze skupiny C ke snížení aktivity. Změna byla statisticky významná. Parazitóza vede k inhibici enzymové aktivity, což má význam pro léčiva biotransformovaná těmito enzymy. Následkem může být zpomalené vylučování léčiv z organismu, prodloužení jejich účinku či zvýšení toxicity. V praxi by se tyto poznatky daly využít ke snížení dávek anthelmintik pro hospodářská zvířata, popřípadě k prodloužení ochranných lhůt na jejich produkty.

U skupiny E byl inhibiční vliv zaznamenán pouze u CYP 2E1. Aktivita isoenzymů EROD, MROD, BROD, 2C9 nebyla parazitózou ovlivněna. Možným vysvětlením je určitá adaptace hostitele po delší době trvání infekce.

Ve střevech byla naměřena aktivita pouze u EROD a CYP 2E1. Aktivitu EROD jsme zaznamenali pouze u skupiny E, déle trvající parazitóza asi zvyšuje ve střevech aktivitu enzymu na úroveň detekovatelnosti. Hodnoty aktivity CYP 2E1 ve střevech jsou o dva řády nižší než v jaterní frakci. Vliv hemonchózy na zkoumané oxidační enzymy ve střevech prokázán nebyl.

Hemonchóza má v játrech výraznější vliv na oxidační enzymy než parazitóza vyvolaná rodem *Dicrocoelium* spp. Dikrocelióza má výraznější vliv pouze na FMO, a to ve smyslu indukce. Tato odlišnost může být způsobena jak jiným parazitem, tak i jiným hostitelem (*Ovis musimon*). Infekce ovčí motolicí *Fasciola hepatica* vede rovněž ke snížení aktivity CYP 3A (Skálová et al. 2007), stejně jako u hemonchózy.

Ze skupiny **konjugačních enzymů** byly sledovány GST a UGT. U GST došlo u samic a samců ze skupiny C i E ke zvýšení aktivity, které byla vyhodnoceno jako statisticky významné. Parazitóza tedy ovlivňuje aktivitu enzymu GST ve smyslu indukce.

Ačkoli parazitóza vyvolaná *H. contortus* vedla k indukci GST, při sledování vlivu dikroceliózy na aktivitu GST byly učiněny opačné závěry (Skálová et al 2007). Možnými příčinami je jiný druh sledovaného hostitelského zvířete a odlišný parazit. *Dicrocoelium* spp. na rozdíl od vlasovky způsobuje patologické změny v játrech, které většinou vedou ke snížení aktivity biotransformačních enzymů.

Ve střevech vliv hemonchózy na aktivitu tohoto konjugačního enzymu prokázán nebyl.

Zvýšení aktivity druhého sledovaného konjugačního enzymu, UGT, bylo zaznamenáno pouze u samců ze skupiny C. U déle nemocných samců ze skupiny E a u samic naopak došlo ke snížení aktivity. Zvýšená aktivita enzymu s následným poklesem biotransformace v důsledku pokročilé infestace parazitem byla rovněž pozorována např. u parazita *Schistosoma mansoni* (Renton 2001). Odlišný vliv infekce na samce a samice vede k závěru, že v ovlivnění biotransformačních enzymů parazitem hrají roli i rozdíly mezi pohlavími, zřejmě různá citlivost vůči působení parazita.

Hodnoty střevní UGT se u samic a samců ze skupiny C v porovnání s kontrolní skupinou příliš nelišily, vliv parazitózy ve střevech prokázán nebyl. Výjimku tvoří ovce

ze skupiny E, u nichž došlo po delší expozici vlasovce k poklesu aktivity, stejně jako u jater.

Z **redukčních enzymů** jsme v cytosolu stanovovali aktivitu reduktas naloxonu, metyraponu, ketoprofenu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu (při pH 6,0 a 8,5), acenaftenolu a 4-pyridinkarboxaldehydu. Dále jsme v cytosolu sledovali aktivitu AKR 1C a karbonylreduktasy vůči oracinu. V mikrosomech byla aktivita měřena u reduktas metyraponu, 4-pyridinkarboxaldehydu a také oracinu.

Ovlivnění biotransformačních enzymů hemonchózou se neprojevalo u reduktas naloxonu, reduktas daunorubicinu ani u cytosolických reduktas metyraponu. V jaterních mikrosomech byly získány stejné výsledky, ve střevech pak došlo u nemocných ovcí k indukci enzymové aktivity. K indukci ve střevech došlo i u reduktas ketoprofenu u samic. Aktivita jaterních reduktas DL-glyceraldehydu byla inhibována u samců, u samic nedošlo ke změně. Ve střevech naopak u nemocných ovcí došlo k indukci.

Reduktasy acenaftenolu a 4-pyridinkarboxaldehydu v jaterním cytosolu vykazují po kratší expozici parazitu zvýšení aktivity. U acenaftenolu tento trend potvrzují i ovce skupiny E, zatímco u 4-pyridinkarboxaldehydu se aktivita u skupiny E v porovnání s kontrolní skupinou nezměnila. U samic došlo k indukci pouze v případě reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu. Ve střevech se aktivita reduktas acenaftenolu u skupiny C snížila, reduktasy 4-pyridinkarboxaldehydu nebyly ovlivněny. U obou skupin reduktas nastala indukce u skupiny E. V mikrosomech byly naopak ovlivněny samice, parazitóza vyvolala pokles aktivity jaterních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu.

Aktivita AKR 1C a CR vůči oracinu byla parazitem modifikována pouze ve střevech. Do popředí zde vystupují i mezipohlavní rozdíly - u samců byla zaznamenána indukce, u samic inhibice. U 11 β -HSD 1 se aktivita vůči oracinu změnila pouze u samců skupiny C – v játrech ve smyslu indukce, ve střevech došlo k inhibici.

U těchto enzymů bylo rovněž zjišťováno procentuální zastoupení obou vznikajících enantiomerů dihydrooracinu. Enzymy redukující oracin v jaterních mikrosomech vykazují nízkou stereospecifitu, oba enantiomery jsou produkovány ve stejném množství. Reduktasy oracinu v jaterním cytosolu jsou mnohem více stereospecifické, což potvrzují i výsledky jiné studie (Wsól et al 2007).

Zatímco u AKR 1C a CR se v játrech u samců vlivem parazitózy trochu snižuje poměr (+)-DHO/(-)-DHO, ve střevech se naopak zvyšuje. U 11 β -HSD 1 dochází v játrech

v důsledku delšího působení parazitózy k zvýšení poměru (+)-DHO/(-)-DHO, ve střevech je tomu naopak.

Z výše uvedeného je patrné, že ovlivnění redukčních enzymů parazitózou je rozmanité, a závěry proto nejsou jednoznačné. Bylo zaznamenáno odlišné působení na jednotlivé enzymy, na játra, střevo a nemalý vliv má i pohlaví. Obecně lze říci, že u léčiv metabolisovaných redukčními enzymy (např. anthelmintikum flubendazol) by v důsledku indukce mohlo dojít ke snížení plazmatických koncentrací léčiva a tím i jeho účinnosti. Naopak inhibice by mohla vyvolat pomalejší odbourávání léčiva a jeho hromadění v organismu.

Parazitóza vyvolaná druhem *H. contortus* vyvolává u některých enzymů inhibici, u jiných indukcí. Prostřednictvím určitých látek z exkretů parazita či zánětlivých mediátorů může způsobit změny v aktivitě enzymů či v jejich expresi. Např. pokles aktivity řady enzymů, např. CYP, souvisí se zánětlivou odpovědí. Imunostimulanty jako lipopolysachyridy, γ -interferon, interleukiny, TGF α jsou účinné inhibitory exprese cytochromu P450. V některých případech se může objevit i indukce biotransformačních enzymů (Timir et al. 2003, Renton 2001).

Sledované enzymy jsou významnými biotransformačními enzymy léčiv, a proto by při terapii měl být zohledněn vliv parazitózy na aktivitu enzymů. Ovlivnění enzymů parazitózou vede k řadě farmakologických, toxikologických a fyziologických důsledků.

Snížená aktivita biotransformačních enzymů může mít za následek zpomalené odbourávání léčiv či jejich metabolitů, prodloužený účinek léčiv nebo jejich hromadění v organismu. Praktickým dopadem by mělo být případné snížení dávek či prodloužení ochranné lhůty na produkty ovce domácí.

Léčivo albendazol je metabolizováno oxidačními enzymy (CYP 1A, FMO, CYP 3A), které jsou parazitózou inhibovány. Klinický dopad by ale zřejmě byl zanedbatelný, neboť albendazol sám naopak vede k indukci enzymů, především CYP 1A (Velík et al. 2005), a inhibice vyvolaná *H. contortus* by se tedy zásadněji neprojevila. Léčba albendazolem se jeví jako vhodná.

Naopak zvýšená aktivita enzymů může vést ke snížení plazmatické hladiny, a tím k selhání terapie. Nízké dávky léčiva nezpůsobí eliminaci parazita, ale umožní mu přežít. Kontakt parazitů s nízkými dávkami anthelmintik vede ke snížení jejich citlivosti. Indukce biotransformačních enzymů přispívá nepřímě k rozvoji lékové rezistence parazitů (Geerts a Gryseels 2000).

Tato práce ukazuje, že důležitým faktorem, na který by se při léčbě hospodářských zvířat měl brát zřetel, je ovlivnění jejich biotransformačních enzymů parazitem. Pro účinnou a bezpečnou terapii se ale musí zohlednit i další významné faktory, jako například případné změny biotransformačních enzymů vyvolané podávaným léčivem nebo vliv metabolických pochodů samotného parazita. Znalost těchto jevů umožňuje vybrat vhodné farmakoterapeutikum s co nejnižšími interakcemi.

Výsledky práce se týkají ovce domácí a parazita *H.contortus*, z důvodu mezidruhových rozdílů je tedy nelze zevšeobecnit a použít pro všechna hospodářská zvířata a pro jiné parazitózy.

7. ZÁVĚR

- 1) Z jater a střevní mukózy zdravých a experimentálně infikovaných ovcí vlasovkou slézovou byly připraveny subcelulární frakce, cytosolická a mikrosomální.
- 2) Z oxidačních enzymů měla hemonchóza vliv na EROD, MROD, BROD, CYP2C9, CYP2E1, u samic i na FMO, a to ve smyslu inhibice enzymové aktivity.
- 3) Aktivita jaterní GST byla u nemocných ovcí zvýšena, u UGT v játrech byly podobné závěry učiněny pouze u ovcí s kratší expozicí parazitu. U déle nemocných ovcí došlo naopak ke snížení aktivity.
- 4) Působení parazitózy na sledované redukční enzymy je různé, nelze vyslovit jednoznačný závěr. Ovlivnění enzymové aktivity se liší dle sledovaného enzymu, subcelulární frakce, délky nemoci, rozdíly byly zaznamenány i mezi pohlavími.
- 5) Vliv pohlaví na aktivitu enzymů se projevil u řady oxidačních, konjugačních i redukčních enzymů. Ovlivnění je různé v závislosti na sledovaném enzymu a subcelulární frakci. Pohlaví také ovlivňuje působení parazitózy na enzymovou aktivitu (např. FMO, jaterní UGT i GST, 11 β -HSD 1).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Baliharová V., Skálová L., Mass RF., De Vrieze G., Bull S., Fink- Gremmels J. (2003): The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and Hep G2 cells, *Veterinary Science* 75 (1), 61 – 69

Baliharová V., Velík J., Fimanová K., Lamka J., Szotáková B., Šavlík M., Skálová L. (2005): Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro, *Pharmacological reports* 57, 97 – 106

Baner B., Hartz A., Fricker G., Miller D. (2005): Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood- brain barrier, *Experimental Biology and Medicine* 230, 118 – 127

Burczynski M. E., Lin H-K, Penning T. M. (1999): Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: Implications for the alternative pathway of PAH activation catalysed by human dihydrodiol dehydrogenase, *Cancer Research* 59, 607 – 614

Burke M. D., Thompson S., Weaver R. J., Wolf C. R., Mayer R. T. (1994): Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver, *Biochem. Pharmacol.* 48, 923 – 936

Burke J. M., Miller J. E., Terill T. H. (2006): Use of copper oxide wire particles (COWP) to control Barber Pole Worm in lambs and kids, *Veterinary Parasitology* 139, 145 – 149

Cashman J. R., Hanzlik R. P. (1981): Microsomal oxidation of thiobenzamid. A photometric assay for the flavine-containing monooxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 98 (1), 147 – 153

Crespi C. L., Stresser D. M. (2000): Fluorimetric screening for metabolism-based drug – drug interactions, *J. Pharm. Toxicol. Methods* 44, 325 – 331

Crosas B., Cederlund E., Torres D., Jörnvall H., Farrés J., Parés X. (2001): A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol, *Journal of Biological Chemistry* 276, 19132 – 19140

Felsted R.L., Bachur N.R. (1980a): Ketone reductases. In: Jacoby W.B., ed., *Enzymatic Basis of Detoxification*, Vol. 1, New York, Academic Press, pp. 281-293

Felsted R.L., Bachur N.R. (1980b): Mammalian carbonyl reductases, *Drug Metab. Rev.* 11, 1 – 60

Forkert P., D'Costa D., El-Mestrah M. (1999): Expression and inducibility of Alpha, Pi and Mu Glutathione-S-Transferase protein and mRNA in murine lung, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20, 143 – 152

Geerts S., Gryseels B. (2000): Drug resistance in human helminths: Current situation and lessons from livestock, *Clinical Microbiology Reviews* 13, 207 – 222

Gibson G. G., Skett P. (2001): Introduction to drug metabolism, 3rd ed., Nelson Thornes Publishers, Cheltenham

Habig H. W., Jacoby B. W. (1981): Glutathion S-transferases (rat and human), *Methods Enzymol.* 77, 218 - 404

Honkakoski P., Kojo A., Lang M. A. (1992): Regulation of the mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and phenobarbital, *The Biochemical Journal* 285, 979 – 983

Jacquiet P., Cabaret J., Cheikh D., Thiam A. (1995): Experimental study of survival strategy of *Haemonchus contortus* in sheep during dry season in desert areas of the Mauritania, *The Journal of Parasitology* 81, 1013 – 1015

Jez J. M., Bennet M. J., Schlegel B. P., Lewis M., Penning T. M. (1997): Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily, *The Biochemical Journal* 326, 625 – 635

Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I. K., Kador P. F., Lee Y. S., Tsai J. Y., Fujisawa S., Lizak M. J., Sinz A., Sato S. (1999): Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats, *Biochem. Pharmacol.* 58, 517 – 524

Keane O. M., Dodds K. G., Crawford A. M., McEwan J. C. (2007): Transcriptional profiling of *Ovis aries* identifies *Ovar-DQAI* allele frequency differences between nematode-resistant and susceptible selection lines, *Physiological Genomics* 30, 253 – 261

Kelly J. D., Whitlock H. V., Thompson H. G., Hall C. A., Martin I. C., Le Jambre L. F. (1978): Physiological characteristic of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus*, susceptible or resistant to benzimidazole anthelmintics, *Veterinary Science* 25 (3), 376 – 385

King C. D., Rios G. R., Green M. D., Tephly T. R. (2000): UDP-glucuronosyltransferases, *Current Drug Metabolism* 1(2), 143 – 161

Kurkela M., García-Horsman J. A., Luukkanen L., Mörsky S., Taskinen J., Baumann M., Kostianen R., Hirvonen J., Finel M. (2003): Expression and characterisation of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), *Journal of Biological Chemistry* 278, 3536 – 3544

Kvasničková E. (1995): Xenobiochemie, Karolinum, Praha

Kvasničková E., Šroler A. (1992): Indukce enzymů, které metabolizují látky tělu cizí, *Československá farmacie*, roč.XLI, 9 – 10

Machala M., Souček P., Neča J., Ulrich R., Lamka J., Szotáková B., Skálová L. (2003): Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants, *Archives of Toxicology* 77, 555 – 560

Maser E. (1995): Xenobiotic carbonyl reduction and physiological steroid oxidoreduction, *Biochem. Pharmacol.* 49, 421 – 434

Maser E., Oppermann U. C. T (1997a): Role of type-1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes, *Eur. J. Biochem.* 249, 356–369

Maser E., Oppermann U. C. T (1997b): The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase system , a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action. *Eur. J. Biochem.* 249, 365 – 369

Matsunaga T., Shintani S., Hara A. (2006): Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds, *Drug metabolism and Pharmacokinetics* 21, 1 – 18

Mehlhorn H.(Ed.), Armstrong P. M. (2001): Encyclopedic reference of parasitology, 2nd ed., Springer

Mizuma T., Mashida M., Hayashi M., Awazu S. (1982): Correlation of drug conjugative metabolism rates between in vivo and in vitro: glucuronidation and sulfation of p-nitrofehenol as a model compound in rat, *J. Pharmaco biodyn.* 5, 811 – 817

Nayebzadeh H., Seyfi Abadshapouri M., Hoghooghi Rad N. (2005): Immunisation of Arabian sheep against haemonchosis with *Haemonchus contortus* intestinal homogenate, 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen / Denmark, April 2-5, 2005

O' Connor T., Ireland L. S., Harrison D. J., Hayes J. D.(1999): Major differences exist in function and tissue- specific expression of human aflatoxin B₁ aldehyde reductase and the principal human ado-keto eductase AKR1 family members, *The Biochemical Journal* 343, 487 – 504

Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Kara A. (1995): Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochemical Pharmacology* 50, 221 – 227

Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G., Penning T. M.(2001): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1), *Chem.-Biol. Interact.* 130-132, 815 – 824

Parkinson A. (1996): Biotransformation of xenobiotics, *Technology for the study of xenobiotics*, 113 – 186

Peter R., Böcker R., Beaune P. H., Iwasaki M., Guengerich F. P., Yang Ch. S. (1990): Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1, *Chem. Res. Toxicol.* 3, 566 – 573

Price R. J., Surry D., Renvick A. B., Meneses-Lorente G., Lake B. G., Evans D. C. (2000): CYP isoform induction screening in 96-well plates: use of benzyloxytrifluoromethylcoumarin as a substrate for studies with rat hepatocytes, *Xenobiotica* 30, 781 – 795

Reavill C. (2000): "Ovis aries" (On-line), Animal Diversity Web
http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_aries.html

Renton K.W. (2001): Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation, *Pharmacol. Therap.* 92, 147 – 163

Sendow J. (2003): "Haemonchus contortus" (On-line), Animal Diversity Web.
http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Haemonchus_contortus.html

Shallig H. D. F. H. (2000): Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*, *Parasitology* 120, 63 – 72

Skálová L., Křížová V., Cvilink V., Szotáková B., Štorkánová L., Velík J., Lamka J. (2007): Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver, *Veterinary Parasitology* 146, 254 – 262

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

Szotáková B., Skálová L., Wsól V., Kvasničková E. (2000): Reduction of the potential anticancer drug oracin in the rat liver in-vitro, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 495 – 500

Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Nožinová E., Wsól V., Velík J., Machala M., Neča J., Souček P., Šusová S., Skálová L. (2004): Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep, *Veterinary Science* 76, 46 – 51

Testa B.: *The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics, Biochemistry of Redox Reactions*, Academic Press, London, 1995, 70-121

Timir B.S., Nilaujana D., Manika D., Radharani M. (2003): Mechanism of impairment of cytochrome P450-dependent metabolism in hamster liver during leishmaniasis, *Biochemical and Biological Research Communication* 312, 75 – 79

Vaz A. D., Pernecky S. J., Raner G. M., Coon M. J. (1996): Peroxo-iron and oxenoid iron species as alternative oxygenating agents in CYP450-catalysed reactions: Switching by threonine-302 to alanine mutagenesis of CYP450 2B4, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 4644 – 4648

Velík J., Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Šavlík M., Wsól V., Šnejdrová E., Skálová L. (2005): Albendazole repeated administration induces cytochromes P450 1A and accelerates deactivation in mouflon (*Ovis musimon*), *Research in Veterinary Science* 78, 255 – 263

Wolbold R., Klein K., Burk B., Nüssler A., Neuhaus P., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U.M. (2003): Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver, *Hepatology* 38, 978 – 988

Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Cepková H., Kvasničková E. (2000): The main metabolic pathways of oracin, a new potential cytostatic drug, in human liver microsomes

and cytosol: stereoselectivity of reoxidation of the principal metabolite 11-dihydrooracin to oracin, *Enantiomer* 5, 263 – 270

Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Maser E. (2004): The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Toxicology* 197, 253 – 261

Wsól V., Szotáková B., Martin H-J., Maser E.(2007): Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man, *Toxicology* 238, 111 – 118

Yamaori S., Yamazaki H., Iwano S., Kiyotani K., Matsumura K., Saito T., Parkinson A., Nakagawa K., Kamataki T. (2005): Ethnic differences between Japanese and Caucasians in the expression levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7, lack of co-regulation of the expression of CYP3A in Japanese livers, *Xenobiotica* 35 (1), 69 – 83

Yuan R., Madani S., Wei X., Reynolds K., Huan S. (2002): Evaluation of cytochrome P450 probe substrate commonly used by the pharmaceutical industry to study invitro drug interaction, *Drug Metabolism and Disposition* 30, 1311 – 1319

www.aces.edu/pubs/docs/U/UNP-0078/

www.ansi.okstate.edu/breeds/sheep/

http://cs.wikipedia.org/wiki/Ovce_dom%C3%A1c%C3%AD

<http://en.wikipedia.org/wiki/CYP2E1>

http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450_oxidase

http://en.wikipedia.org/wiki/Flavin-containing_monooxygenase_system

<http://en.wikipedia.org/wiki/Sheep>

www.fda.gov/cder/drug/drugReactions/CERT%20Educational%20Module%201/sld026.htm

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=439723#Properties>

www.sheep101.info

www.tumbledownfarm.com

www.wikipedia.org

www.wormboss.com.au

www.zeldia.cap.ed.ac.uk/nematodeESTs/species/HCC.htm