

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Vliv opakovaného podávání flubendazolu na biotransformační
enzymy ovce domácí**

(diplomová práce)

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

Hradec Králové 2008

Martina Štěpničková

„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.“

.....

Velké poděkování patří mé školitelce paní doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za vedení při experimentální práci, za pomoc při vyhodnocování výsledků a za návrhy a připomínky při sepisování. Dále patří poděkování kolegyni Haně Bártíkové a ostatním zaměstnancům katedry za ochotu a přátelské prostředí.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: Martina Štěpničková

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

Název diplomové práce: Vliv opakovaného podávání flubendazolu na biotransformační enzymy ovce domácí

Flubendazol je benzimidazolové anthelmintikum používané k léčbě a prevenci helmintóz hospodářských i volně žijících zvířat. V dnešní době je velkým problémem vznik rezistence různých druhů červů na dostupná anthelmintika. Teprve detailní znalost mechanismů helmintorezistence povede k úspěšné terapii parazitóz zvířat. V této práci byly zkoumány vlivy opakovaného podání flubendazolu na vybrané isoformy cytochromů P450, flavinové monooxygenasy, některé redukční enzymy karbonylové skupiny, glutathion-S-transferasy a UDP-glukuronosyltransferasy ovce domácí. Aktivity enzymů byly měřeny v subcelulárních frakcích připravených z jater a mukózy tenkého střeva kontrolních ovcí, flubendazolem léčených ovcí a *Haemonchus contortus* infikovaných, následně flubendazolem léčených ovcí. Flubendazol byl ovcím podáván ve třech dávkách a to 15mg/kg živé váhy. Výsledky ukázaly, že podávání flubendazolu neovlivňuje aktivitu CYP 2B, CYP 3A, a glutathion S-transferasy. U CYP 2E po podání flubendazolu byla pozorována inhibice. U CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2C9, flavinových monooxygenas a UDP-glukuronosyltransferasy se výsledky lišily v závislosti na pohlaví sledovaných zvířat a nakažení zvířete parazitem. Z redukčních enzymů byla nejvíce ovlivněna 11 β -HSD a karbonylreduktasa. Zvláště indukce oxidačních, redukčních nebo konjugačních enzymů ovlivňuje léčebný výsledek jak flubendazolu samotného, tak i ostatních současně podávaných léčiv. Indukcí biotransformačních enzymů je léčivo rychleji metabolizováno a vylučováno, tudíž jsou v organismu hostitele přítomny nižší koncentrace než terapeutické. Helmint tak může aplikaci léčiva přežít a vytvářet si obranné mechanismy.

Abstract

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

Title, Name, Surname of candidate: Martina Štěpničková

Title, Name, Surname of tutor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of a diploma work: Modulation of biotransformation enzymes by repeated administration of flubendazole in domestic sheep.

Flubendazole is benzimidazole anthelmintic widely used in veterinary medicine for treatment and prevention of helminthosis in domestic and wild animals. Currently the effectiveness of available anthelmintics is being diminished by the worms newly formed resistance mechanisms. This work was designed to test the influence of flubendazole on cytochrome P450 isoforms, flavine monooxygenases, some carbonyl reducing enzymes, glutathion S-transferase and UDP-glucuronosyl transferase in domestic sheep. Activities of these enzymes were observed in subcellular fractions which were prepared from the liver and small intestine of the following groups of tested subjects: control sheeps, flubendazole treated sheeps and *Haemonchus contortus* infected sheeps that were subsequently treated by flubendazole. Flubendazole was administered to each sheep three times in a dose of 15mg/kg. The results indicated that flubendazole does not influence the activity of CYP 2B, CYP 3A, and glutathion-S-transferases. After the flubendazole therapy was observed the inhibition in activities of CYP 2E. Activities of CYP 1A, CYP 2B, CYP 2C9, flavinmonooxygenases and UDP-glucuronosyl transferases were depended on animal gender and helminthosis. The largest influence of flubendazole on reduction enzymes was appeared in activities of 11 β -HSD and carbonylreductase. Especially the induction of oxidation, reduction and conjugation enzymes has a profound negative effect on the efficacy and pharmacokinetics of flubendazole itself and any other simultaneously or consecutively administered drugs. Induction of these enzymes results in a faster metabolism and elimination of flubendazol which cuts down its therapeutic levels. Under these conditions, worms are able to survive flubendazole administration and activate their resistance mechanisms.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. Helmintózy.....	11
2.1.1. Trematodózy	11
2.1.2. Cestodózy.....	12
2.1.3. Nematodózy	12
2.1.3.1. Haemonchus contortus.....	13
2.2. Anthelmintika	15
2.2.1. Makrocyclické laktony	15
2.2.2. Imidazolthiazoly	15
2.2.3. Salicylanilidy.....	16
2.2.4. Izothiokyanáty	16
2.2.5. Tetrahydropyrimidiny	16
2.2.6. Syntetické pyrazinové deriváty	16
2.2.7. Jednoduché heterocyclické sloučeniny.....	16
2.2.8. Benzimidazoly.....	17
2.2.8.1. Flubendazol	17
2.3. Ovce domácí.....	19
2.4. Biotransformační enzymy	22
2.4.1. Charakteristika biotransformačních enzymů.....	22
2.4.2. Biotransformační reakce	22
2.4.3. Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů.....	23
2.5. Přehled sledovaných biotransformačních enzymů.....	26
2.5.1. Oxidační enzymy	26
2.5.1.1. Cytochromy P450 (CYP).....	26
2.5.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO).....	29
2.5.2. Redukční enzymy	30
2.5.2.1. Aldoketoreduktasy (AKR)	31
2.5.2.2. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	32
2.5.2.3. Substráty redukčních enzymů použitých v této práci	33
2.5.3. Konjugační enzymy	36
2.5.3.1. Glutathion-S-tranferasy (GST).....	37

2.5.3.2. UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).....	37
3. CÍL PRÁCE.....	39
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1. Biologický materiál.....	40
4.2. Přístroje.....	41
4.3. Pracovní postupy	41
4.3.1. Příprava subcelulárních frakcí.....	41
4.3.2. Stanovení koncentrace bílkovin	42
4.3.3. Stanovení aktivity CYP 1A1, 1A2, 2B, 3A	44
4.3.4. Stanovení aktivity CYP 2C9	45
4.3.5. Stanovení aktivity CYP 2E1, částečně 1A1	47
4.3.6. Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy.....	48
4.3.7. Stanovení aktivity redukčních enzymů.....	49
4.3.8. Stanovení aktivity reduktas oracinu	52
4.3.9. Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy.....	53
4.3.10. Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy	54
4.3.11. Statistické zpracování výsledků	55
5. VÝSLEDKY	56
5.1. Stanovení koncentrace bílkovin	56
5.2. Stanovení aktivity CYP 1A1, 1A2, 2B, 3A.....	58
5.2.1. Stanovení aktivity CYP 1A1, částečně 1A2	58
5.2.2. Stanovení aktivity CYP 1A2, částečně 1A1	59
5.2.3. Stanovení aktivity CYP 2B.....	60
5.2.4. Stanovení aktivity CYP 3A, částečně 2B	61
5.3. Stanovení aktivity CYP 2C9.....	62
5.4. Stanovení aktivity CYP 2E1, částečně 1A1.....	63
5.5. Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy.....	64
5.6. Stanovení aktivity redukčních enzymů.....	66
5.6.1. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu.....	66
5.6.2. Stanovení aktivity cytosolických reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu.....	67
5.6.3. Stanovení aktivity reduktas acenaftenonu	68
5.6.4. Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0	70
5.6.5. Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu při pH 8,5	71

5.6.6. Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu	72
5.6.7. Stanovení aktivity reduktas ketoprofenu	73
5.6.8. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas metyraponu.....	74
5.6.9. Stanovení aktivity cytosolických reduktas metyraponu	75
5.6.10. Stanovení aktivity reduktas naloxonu.....	76
5.7. Stanovení aktivity reduktas oracinu	77
5.7.1. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas oracinu	77
5.7.2. Stanovení aktivity cytosolických reduktas oracinu	78
5.8. Stanovení aktivity glutathiontransferasy.....	80
5.9. Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy.....	81
6. DISKUSE	83
7. ZÁVĚR	87
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

1. ÚVOD

Živé organismy se neustále dostávají do styku s řadou látek, které jsou pro ně cizí, neslouží jako zdroj energie ani nejsou prekursory pro syntézu užitečných molekul. Aby tyto cizí látky neznamenal ohrožení jejich vnitřního prostředí, vybudovaly si organismy řadu mechanismů, jak se cizím látkám bránit. Nejčastějším zásahem je chemická změna struktury takových látek.

Věda, která studuje metabolické přeměny látek tělu cizích (xenobiotik) se nazývá xenobiochemie. Zkoumá enzymy, které tyto přeměny katalyzují, zkoumá faktory ovlivňující aktivitu těchto enzymů. Odhaluje strukturu, vlastnosti a biologickou aktivitu metabolitů xenobiotik. Přispívá k pochopení mechanismu účinku xenobiotika a studuje jejich vliv na důležité metabolické cesty endogenních látek.

Mezi látky tělu cizí patří konzervační látky, potravinářská barviva, umělá sladidla, kontaminanty vody a půdy, nečistoty vzduchu jako výfukové plyny nebo cigaretový kouř a především léčiva. Pro specifický účinek léčiv je nezbytná jejich přesná chemická struktura. Pokud organismus svými mechanismy strukturu léčiva změní, může dojít ke změně nebo dokonce anulaci účinku léčiva.

Při zvýšeném a opakovaném kontaktu s xenobiotiky se organismus brání zvýšením aktivity biotransformačních enzymů. Výsledkem je rychlejší vylučování látky z organismu. V případě léčiv je důležité snížení jejich koncentrace v cílových tkáních a umožnění vzniku rezistence k jejich účinku. Tento mechanismus může hrát roli i při vzniku rezistence parazitických červů.

Nemoci způsobené parazitujícími červy, helmintózy představují jednu z nejrozšířenějších příčin ohrožení zdravotního stavu hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Samotným zvířatům působí velké zdravotní problémy a v závažných případech i předčasnou smrt, chovatelům pak značné ekonomické ztráty. Jediným zatím všeobecně dostupným prostředkem v boji s parazitujícími červy je farmakoterapie a farmakoprolaxe s využitím vhodných anthelmintik. Počet dostupných léčiv je ale relativně malý a během uplynulých desetiletí se značně snížila jejich účinnost. Parazité si totiž postupně vytváří mechanismy, kterými se úspěšně brání toxickému působení anthelmintik. Léková rezistence mnohých druhů červů se stala celosvětovým problémem.

K rozvoji helmintorezistence na dostupná léčiva přispívá indukce biotransformačních enzymů jak hostitele, tak i parazita. Zvýšení aktivity enzymů hostitele

vede ke snížení terapeutických hladin anthelmintik a tím se zvyšuje šance parazitů přežít aplikaci léčiva. Právě kontakt parazitů s nízkými dávkami anthelmintik vede k iniciaci jejich obranných mechanismů a následně ke snížení jejich citlivosti k léčivu. Teprve detailní znalost mechanismů helmintorezistence povede k úspěšné terapii parazitóz hospodářských zvířat.

Tato práce má za cíl vysledovat ovlivnění biotransformačních enzymů hostitele po podání léčiva. Jako léčivá látka byl vybrán flubendazol a jako modelový parazitující červ byla vybrána vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*). Vlasovka je velice častým a relativně velmi patogenním parazitem domácích i volně žijících přežvýkavců. K terapii zvířat postižených tímto parazitem jsou využívána benzimidazolová anthelmintika a v literatuře je již v řadě lokalit popsáno navození rezistence vlasovky právě na benzimidazoly, mezi které patří i flubendazol. Jako hostitel byla zvolena ovce domácí, která je vlasovkou často napadána a z přežvýkavců je nejvhodnějším druhem k experimentálním účelům.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Helmintózy

Helmintózy jsou parazitární infekční onemocnění způsobené cizopasnými červy (helminty) nebo jejich infekčními stádii. Nejrozšířenější helmintózy jsou způsobeny třemi třídami červů (plochými červy – motolicemi = *Trematoda* a tasemnicemi = *Cestoda*, oblými červy – hlísticemi = *Nematoda*). Projevy onemocnění jsou závislé na typu parazita a místě postižení hostitele. K nákaze helminty může docházet cestou perorální (požití hostitelem), perkutánní (přímý průnik larválních stádií povrchem těla hostitele), kongenitální (z matky na plod), spojivkovým vakem a dalšími tělními otvory.

2.1.1. Trematodózy

Trematodózy představují z parazitologického hlediska velmi závažnou skupinu helmintóz především pro hospodářská a volně žijící zvířata (přežvýkaví býložravci), menší význam mají pro chovy ostatních zvířat (Lamka a Ducháček 2006).

Motolice jsou biohelmintickými parazity se složitými vývojovými cykly. Jejich nesegmentované tělo je silně dorzoventrálně zploštělé, podélně oválné až lístkovité. Velikost dospělých motolic je variabilní a pohybuje se od několika milimetrů až do několika centimetrů. Typickými orgány motolic jsou přísavky. Ústní (rostrální) přísavka slouží k přichycení a obsahuje ústní otvor motolice. Břišní (ventrální) přísavka (také zvaná acetabulum) slouží jen k přichycení a některým čeledím může chybět. U břišní přísavky většinou ústí vývody pohlavních orgánů. Povrch těla tvoří metabolicky aktivní tegument. Trávicí soustava je jednoduchá, chybí anus. Motolice přijímají potravu nasáváním svalnatým hltanem uloženým na dně ústní přísavky, který pokračuje do párového, různě větveného střeva. Po strávení se potrava ve střevě resorbuje. Nestrávené zbytky se regurgitují zpět přes hltan. Motolice se živí polotekutou stravou, jako je střevní obsah, hlen, krev či tkáňová tekutina hostitele (Jíra 1998). Většina motolic jsou hermafrodité. Přestože jsou oboupohlavní, proces oplození probíhá častěji mezi dvěma jedinci (<http://cs.wikipedia.org>).

Boj proti trematodózám by měl směřovat na potlačení dospělých (omezeněji nedospělých stádií) v definitivním hostiteli nebo na narušení vývojových cyklů motolic ovlivněním mezihostitelských organismů (Lamka a Ducháček 2006).

K zástupcům motolic patří: motolice podivná (*Urogonimus macrostomus*), motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*), motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), krevnička močová (*Schistosoma haematobium*) (Jíra 1998).

2.1.2. Cestodózy

Cestodózy jsou druhově-parazitologicky skupinou menšího rozsahu postihující především domácí masožravce, býložravce, ale i ryby.

Původci cestodóz jsou tasemnice. Vývojové cykly tasemnic jsou nepřímé, složité se střídáním řady mezihostitelů a hostitelů. Dospělá forma tasemnic je zploštělá a člení se na hlavičku, krček a tělo složené z jednotlivých článků. Hlavička je v poměru k tělu malá a je vybavena přichytným ústrojím. V krčku se ze zárodečných buněk tvoří základy článků. Tělo může být složeno ze 2 nebo až ze 4 000 článků. Potravu přijímají celým povrchem těla. Tasemnice jsou hermafroditi a oplození je u nich vnitřní (Jíra 1998).

Potlačování cestodóz je možné zásahem do vývojového cyklu tasemnic v definitivním hostiteli nebo ovlivněním populací mezihostitelů (Lamka a Ducháček 2006).

K zástupcům tasemnic řadíme: tasemnice kočičí (*Taenia taeniaeformis*), tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*), tasemnice bezbranná (*Taenia saginata*), měchožil zhoubný (*Echinococcus granulosus*), škulovec široký (*Diphyllobothrium latum*) (Jíra 1998).

2.1.3. Nematodózy

Nematodózy jsou z hlediska druhově-parazitologického nejrozsáhlejší skupinou helmintóz. Je známo téměř 20 tisíc druhů nematod parazitujících v obratlovcích, mnoho dalších druhů představuje parazity bezobratlých a rostlin nebo žijí volným způsobem života (Lamka a Ducháček 2006).

Parazitické hlístice jsou dominantně geohelminți, velmi omezeně biohelminți. Mají protáhlé, válcovité, nesegmentované tělo kryté odolnou mnohavrstevnou kutikulou s povrchovými útvary různých tvarů. Délka dospělých jedinců kolísá od několika mm až po 1 m. Na těle hlístic se rozlišují tři základní části. V přední části se nachází orgány sloužící k přijímání potravy a orgány smyslové. Ve střední části se je uloženo střevo, gonády s vývody, exkreceční a osmoregulační soustava. V zadní části se nachází vyústění střeva a samčích pohlavních orgánů. Trávení zajišťuje trávicí trubice procházející pseudocoelem, která má na jedné straně ústní otvor s hltanem určený pro nasávání potravy z hostitele a na

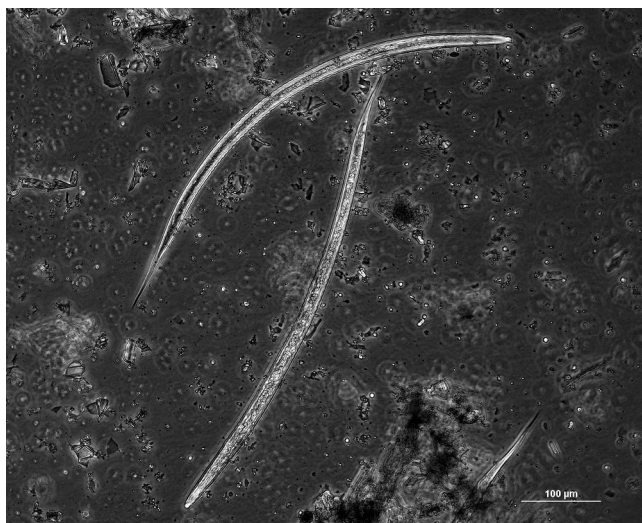
straně druhé rektum vyúsťující v anus. Parazitické hlístice se živí pohlčováním krve, lymfy, lyzované tkáně nebo střevním obsahem hostitele. K vylučování dochází prostřednictvím jednobuněčných vylučovacích trubic v postranních tělních dutinách. Jsou to zpravidla gonochoristé a vyskytuje se u nich výrazný pohlavní dimorfismus (Jíra 1998).

Předcházení a aktivní kontrola nematodóz je v současnosti založena na kombinaci zoohygienických opatření v prostředí chovu a podávání antinematod hostitelským zvířatům.

Důležitými zástupci třídy nematod jsou bezpochyby: roup dětský (*Enterobius vermicularis*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*), svalovec stočený (*Trichinella spiralis*), vlasovec mizní (*Wuchereria bancrofti*), vlasovec oční, háďátko řepné a pšeničné. (Lamka a Ducháček 2006).

Mezi nematoda patří i vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*), která je pro tuto práci vybrána jako modelový parazit.

2.1.3.1. Haemonchus contortus



Obr. 1: Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*)

Jedním z nejnebezpečnějších cizopasníků spárkaté zvěře a přežvýkavců vůbec je vlasovka slézová, *Haemonchus contortus* (Naučný slovník zemědělský 1972). Taxonomicky náleží do čeledi *Trichostrongylidae*, *Nematoda*. Vývoj má přímý, nepotřebuje mezihostitele. Dospělí jedinci žijí ve slézu přežvýkavců (abomasu) a živí se krví.

Dospělé formy jsou vlasovité, červeně zbarvené. Samci měří 10-20 x 0,4 mm, samice 18-30 x 0,5 mm. U samic jsou červená střeva obtočena bílými vaječníky, takže mají vzhled dvojbarevného spirálovitě stočeného provázku.

Samice produkuje denně 5 000 až 10 000 vajíček o rozměrech 70-85 x 41-48 µm, která se dostávají do vnějšího prostředí s výkaly hostitele. Z vajíček se za příznivých podmínek v půdě postupně vyvíjí larvy. Vzhledem k tomu, že larvální kutikula hlístic neroste, jsou od sebe jednotlivé vývojové formy odděleny svlékáním (angl. molting). Larvální stadia L1 a L2 se živí bakteriemi z prostředí a jsou odolné vůči zaschnutí až 1,5 roku. Při příznivých podmínkách (teplé a vlhké klima) se během sedmi dní přemění na larvální stadium L3. Toto stadium migruje na vrcholky trav a je infekční pro hostitele alimentární cestou. V trávicím traktu hostitele se larvy dále dvakrát svlékají a dosahují dospělosti. Dospělci se zavrtají do sliznice slézu, spáří se a celý cyklus se opakuje. Po nakažení invazivními larvami se první vajíčka v trusu zvěře objevují po 21-28 dnech (www.wormboss.com.au). Ojedinele může k infekci docházet i skrz kůži (<http://ucdnema.ucdavis.edu>).

Napadená zvěř trpí anémií, hubne, objevují se u ní otoky a má odstávající matnou srst. Průjmy nebo zácpy jsou způsobené zánětem slezu a střev. Těžké infekce mohou být pro zvíře fatální. Zprávy o výskytu u člověka jsou sporadické; pocházejí z Íránu, z Brazílie a z Austrálie (Jíra 1998).

Diagnostikovat napadení zvířete vlasovkou lze podle příznaků anémie - bledé dásně, oči a kůže a opuchlé čelisti. K tomuto účelu slouží tzv. FAMACHA metoda, která využívá porovnávání barvy spodního očního víčka zvířat s tabulkou se spektrem barev nemocných zvířat v různých stádiích. Čím světlejší barva víčka, tím větší anémie a tím závažnější stupeň onemocnění. Jednoznačnou diagnostikou je pak průkaz vajíček ve stolici zvířete, jejich následná kultivace a přesné určení druhu helminta.

V dnešní době je mnoho populací vlasovek rezistentní vůči všeobecně dostupným anthelmintikům. Nejvyšší rezistence je pozorována u ivermektinu, albendazolu a fenbendazolu, nižší pak u levamizolu. Zatím nízká je rezistence k moxidektinu, proto by mělo být jeho použití racionální (www.attra.org). Ošetření zvířat ve stádě by mělo být komplexní a měly by být dodržovány určité zásady, jako např. po ročních intervalech střídát druh anthelmintika, dodržovat předepsané terapeutické dávky, ošetřit nově přichozí zvířata, střídát pastviny aj. (www.cals.ncsu.edu).

2.2. Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva používaná k terapii či profylaxi helmintóz. Anthelmintika různými mechanismy usmrcují, inaktivují nebo jen paralyzují parazitární helminty v hostitelském organismu. Používají se tedy k odčervení (dehelmintizaci) zvířat a lidí.

Mezi anthelmintiky dnes převládají léčiva chemická, synteticky připravená, která pro své výhodné vlastnosti (stále stejná jakost, ekonomicky výhodná výroba, vhodná forma pro uchovávání i pro aplikaci) prakticky zcela vytlačila rostlinné drogy a z nich izolované účinné látky.

Anthelmintika můžeme třídit podle různých hledisek. Nejstarší princip klasifikace léčiv působících na střevní helminty je rozdělení na vermicida (léčiva helminty usmrcující) a vermifuga (léčiva vyvolávající paralýzu a následující vypuzení helminta ze střeva). Další klasifikace je podle taxonomických skupin na antitrematodika, anticestodika a antinematodika. Farmakologická klasifikace dělí anthelmintika dle mechanismu působení (Jíra 1998).

2.2.1. Makrocyclické laktony

Avermektiny a milbemyciny jsou fermentačními produkty plísní druhu *Streptomyces avermitilis* a *Streptomyces cyanogriseus*. Jedná se o přirozené nebo semisyntetické makrocyclické laktony. Cílem jejich účinku jsou glutamátové chloridové kanály v nervových buňkách nematod a svalových buňkách členovců, kde blokují neurotransmisi. Způsobují paralýzu nebo úhyn parazitů a jejich následnou eliminaci z těla hostitele. Jsou účinné proti nematodům a široké škále ektoparazitů, ale nezasahují trematoda a cestoda. Léčivé látky patřící do skupiny makrocyclických laktonů jsou ivermektin, moxidectin, doramektin, epinomektin

2.2.2. Imidazolthiazoly

Imidazolthiazoly patří mezi dlouhodobě užívaná anthelmintika s výhradně antinematodními účinky. Způsobují zástavu syntetické aktivity mitochondriálních enzymů, které regulují anaerobní metabolismus nematod. Účinek se projeví zablokováním neuromuskulární aktivity s následnou svalovou kontrakcí parazitů. Do těla parazitů penetrují přes kutikulu. Nemají ovocidní účinky. Používá se levamizol a tetramizol.

2.2.3. Salicylanilidy

Podstatou účinku salicylanilidů proti tasemnicím je inhibice oxidativní fosforylace a působení na tvorbu ATP. Hlavním místem účinku je hlavička a proximální segment. Po odumření parazita se hlavička uvolní ze střevní stěny. Zástupci této skupiny anthelmintik jsou niklosamid a halogenovaný derivát rafoxanid.

2.2.4. Izothiokyanáty

Nitroskanát zasahuje do energetického metabolismu buněk *in vitro* dvojitým způsobem. Jednak inhibicí fosfátů (adenosintrifosfátů ATP a fruktózo-1,6-difosfátů), jednak zvýšením exkrece laktátu a acetátu. Je vysoce toxický pro kočky.

2.2.5. Tetrahydropyrimidiny

Pyrantel je cholinergním agonistou, který působí jako excitační neurotransmiter na nikotinergních receptorech v gangliích. Jeho výsledným efektem je spastická paralýza vnímavých nematod, kteří jsou vypuzeni peristaltikou střeva v živém stavu z těla hostitele. Působí proti nezralým a dospělým formám citlivých helmintů ve střevě, nezasahuje však migrující stadia ve tkáních. Nepůsobí vermucidně ani ovocidně.

2.2.6. Syntetické pyrazinové deriváty

Podstatou účinku těchto látek na vnímavé zástupce tasemnic a motolic je cholinesterasový antagonismus, který paralyzuje přenos nervových vzruchů. Způsobuje zvýšení permeability buněčné membrány určitých monovalentních a bivalentních kationtů, zvláště kalcia. Dochází tak ke svalovým kontrakcím a spastické paralýze svaloviny parazita. Objevuje se vakuolizace tegumentu a jeho rozpad. Parazit je následující aktivizací hostitelova obranného mechanismu eliminován. Účinnost je dosažena u zralých i nezralých stadií tasemnic a motolic. Zástupci této skupiny anthelmintik jsou praziquantel a epsiprantel.

2.2.7. Jednoduché heterocyklické sloučeniny

Anthelmintický účinek piperazinu a jeho derivátů spočívá v blokádě působení acetylcholinu v myoneurálních spojích parazitů. Imobilizované hlístice nejsou schopny se udržet v těle hostitele a jsou živé vypuzovány peristaltikou střeva. Piperazin je absorbován z proximální části gastrointestinálního traktu (Vernerová a Svobodová 2002).

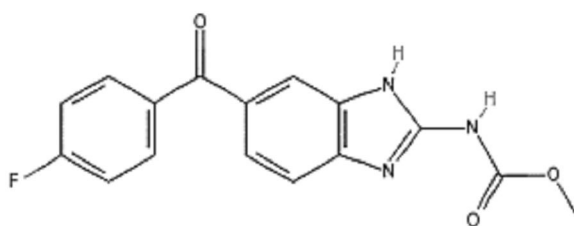
2.2.8. Benzimidazoly

Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku. Jsou to látky odvozené od jedné chemické struktury – benzimidazolu. Benzimidazoly mají tři základní mechanismy účinku. Prvním je inhibice fumarátreduktasy helmintů, čímž je ovlivněna jejich energetická produkce. Druhým je inhibice transportu glukózy s následnou redukcí glykogenových rezerv parazitujících červů. Třetím mechanismem jejich působení je vazba léčiva na β -tubulin, protein nutný k tvorbě mikrotubulů. Mezi tubulinem savců a helmintů existují strukturální rozdíly, proto nedochází k toxickému působení na hostitele. Výsledkem je neschopnost absorpce živin, rozvrat energetického metabolismu, vyčerpání zásob energie, imobilizace a následná smrt citlivých parazitů (Jíra 1998).

Benzimidazoly jsou indikovány u helmintóz skotu, ovcí, koz, prasat, lovné zvěře, bažantů, psů, koček, koní, drůbeže a holubů. V terapii či profylaxi endoparazitických nálezů u zvířat se používají konkrétně tiabendazol, mebendazol, fenbendazol, albendazol, kambendazol, triklabendazol, oxfendazol, oxibendazol, flubendazol, luxabendazol, parbendazol, ciklobendazol. Léčiva netobimin, febantel a thiofanát jsou prolečiva (probenzimidazoly), v cílovém organismu jsou konvertovány na anthelminticky účinné metabolity. Většina benzimidazolů je účinná vůči larválním stádiím a dospělcům nematod, fenbendazol, oxfendazol a oxibendazol jsou také ovocidní (Lamka a Ducháček 2006).

Jako zástupce benzimidazolových anthelmintik byl pro tuto práci vybrán flubendazol.

2.2.8.1. Flubendazol



Obr. 2: Strukturální vzorec flubendazolu

Flubendazol je methyl-[5-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát se sumárním vzorcem $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ a molekulární hmotností $M_r = 313,29$ g/mol. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v lihu 96% a v dichlormethanu (Český lékopis 2005).

Patří mezi benzimidazolová anthelmintika se širokým spektrem účinku proti hlísticím a tasemnicím. Působí proti dospělým i vývojovým stádiím helmintů (Lamka a Ducháček 2006).

K prevenci a léčbě helmintóz je flubendazol využitelný v humánní i veterinární medicíně; především se používá u prasat, drůbeže a bažantů. Po perorálním podání má nízkou biologickou dostupnost, protože jeho absorpci z GIT limituje nízká rozpustnost ve vodě. Většina podané dávky léčiva se z těla vyloučí v nezměněném stavu stolicí. Absorbovaný flubendazol je rychle biotransformován. V krvi, v tkáních a v ostatních tělních tekutinách převažují metabolity nad parentní látkou.

Hlavními cestami metabolismu flubendazolu jsou redukce ketoskupiny na methyl-[5-[(fluorofenyl)hydroxymethyl]-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát nebo hydrolyza karbamátu na (2-amino-1*H*-benzimidazol-5-yl)(4-fluorofenyl)methanon. Redukce ketoskupiny je hlavní metabolickou cestou u drůbeže, hydrolyza karbamátu dominuje u prasat. Oba metabolity (redukovaný i hydrolyzovaný flubendazol) jsou později konvertovány na 2-amino- α -(4-fluorofenyl)-1*H*-benzimidazol-5-yl-methanol (www.emea.eu).

2.3. Ovce domácí

Ovce domácí (plemeno merinolandschaf) byla vybrána pro tuto práci jako pokusné zvíře. Především díky snadné manipulovatelnosti a relativně nízké ceně.



Obr. 3: Ovce domácí, *Ovis aries*

Ovce patří k nejstarším domestikovaným přežvýkavcům. Taxonomicky se řadí do kmene obratlovců (*Vertebrata*), třídy savců (*Mammalia*), řádu kopytníků (*Ungulata*), podřádu sudokopytníků (*Artiodactyla*), přežvýkavců (*Ruminata*), čeledi turovitých (*Bovidae*) a podčeledi *Caprina* (Naučný slovník zemědělský 1972).

Ovce domácí, *Ovis aries* je označení forem ovcí, které vznikly domestikací muflona (*Ovis musimon*), ovce kruhorohé (*Ovis orientalis*) a argaliho (*Ovis ammon*) asi 7000 let př.n.l. V současnosti se chová asi 600 plemen, která se lze třídit podle mnoha kritérií, např.: 1) podle utváření ocasu na plemena dlouhoocasá (ovce bergamská, paduánská, merino, cigájská), tlustoocasá (ovce karakulská), tlustožadká (awassi) a krátkoocasá (nordická, vřesová, finská, romanovská) 2) podle typu vlny na plemena jemnovlnná, polojemnovlnná, polohrubovlnná, hrubovlnná a srstnatá 3) podle užitkového typu na plemena vlnářská (merino), masná (suffolk), dojná (ovce východofříská), kožešinová (ovce karakulská, persián), kožichová (ovce romanovská) a kombinovaná (zušlechtěná valaška a šumavka). Základní metodou šlechtění ovcí je čistokrevná plemenitba (Encyklopedie v osmi svazcích 1999).

Podle jednotlivých plemen se ovce liší tělesnou konstitucí, výškou, váhou nebo třeba barvou vlny. Barva ovcí je od čistě bílých až po tmavě hnědé, některé mohou být i strakaté. Samice váží od 45 do 100 kg, samci od 45 do 160 kg. Na plemeni je také závislý výskyt rohů, buď mají rohy obě pohlaví, ani jedno pohlaví nebo jen samci. Průměrně se ovce dožívají deseti až dvanácti let.

Dospělá ovce má 32 zubů se zubním vzorcem: I:0/4 C:0/0 P:3/3 M:3/3. Ovce mají dobrý sluch a perfektní periferní vidění. Díky zorným úhlům 270° až 320° mohou vidět za sebe, aniž by otočily hlavu. Na druhou stranu mají ovce špatné prostorové vidění. Lehce se

tudíž zaleknou stínů a prohlubní v zemi. Ovce mají vynikající čich. V kyčelní oblasti, v mělké jamce kosti slzné a mezi dvěma hlavními prsty na nohou mají umístěny speciální pachové žlázy, které dodávají ovčím jejich charakteristickou vůni (<http://www.issg.org>).

Ovce mají značně vyvinutý sociální smysl, tráví celý život v těsném společenství s jinými příslušníky stáda, které individuálně rozlišují. Sociální izolace má na ně zvlášť nepříznivý vliv. Jemnovlnná plemena, např. merino, vytvářejí těsnější společenství, než horská plemena ze severní Evropy, jako jsou na příklad skotské černohubky.

Ovce jsou výlučně býložravci. Mají složený žaludek, který jim dovoluje zpracovat celulózu z travin a listů na jednodušší sacharidy. Potrava se nejprve hromadí v předžaludcích – bachoru, čepci a knize. Zde dochází ke kvašení krmiva pomocí symbiotických bakterií, prvoků a kvasinek. Takto upravená potrava je regurgitovaná po jednotlivých soustech zpět do úst, kde dochází k jejímu dalšímu rozmělnování. Během kvašení v bachoru dochází k tvorbě plynů, při dietní chybě a nadměrné tvorbě plynů může ovce až uhynout. Chemické trávení a první vstřebávání živin probíhá ve vlastním žaludku zvaném sléz (<http://en.wikipedia.org>).

Reprodukční cyklus ovčí je charakteristický dobou anestrů, kdy je pohlavní aktivita snížena. V našich klimatických podmínkách se pohlavní aktivita zvyšuje se zkracujícím se dnem. Plodné období ovčí je tedy na podzim a na jaře. Říje trvá 1 až 2 dny a opakuje se v 17ti denních cyklech. Březost bahnic trvá v průměru 150 dnů a jehňata se rodí na jaře. Ovce má většinou jedno, méně často dvě mláďata. Jehňata jsou schopna postavit se na nohy během několika málo minut po narození. Sexuální dospělosti dosahují samice i samci během jednoho roku (www.zootechnika.estranky.cz).

Ovce domácí může trpět mnoha chorobami. Mezi metabolické onemocnění patří pastevní tetanie, ketóza bahnic, nutriční svalová dystrofie a mléčná horečka. Z infekčních nemocí se u ovčí vyskytují ovčí neštovice, přímět pysková, nakažlivá hniloba paznehtů a enterotoxemie. Z parazitárních onemocnění lze jmenovat střečkovitost, svrab, klošovitost, motoličnatost, plicní červivost, slézovou a střevní červivost. Poslední jmenovanou červivost vyvolávají oblí červi z čeledi Trichostronglidae (např. *Haemonchus contortus*) a nejvíce vnímavá jsou jehňata od 6 do 9 měsíců (www.crnet.cz/kollar).

Plemeno merinolandschaf

Plemeno merinolandschaf bylo vyšlechtěno v Německu křížením místních jemnovlnných ovčí s plemenem zaupel. Plemenem bylo merinolandschaf uznáno v polovině dvacátého století. V minulosti se podílelo na vzniku mnoha plemen.

Plemeno je rané, ovce jsou velkého tělesného rámce s kombinovanou užitkovostí, chodivé, vlnu mají bílou. Hlava je středně dlouhá a ne příliš široká. Uši dlouhé, široké a mírně svislé. Na čele mají typickou vlněnou šešulku. Hrudník hluboký a přiměřeně široký. Hřbet je dlouhý, středně široký, přechází v mírně sraženou zád'. Končetiny jsou ve srovnání s merinem delší, klouby pevné, paznehty středně tvrdé. Obě pohlaví jsou bezrohá. Živá hmotnost bahnic 65-75 kg, beranů 90-120 kg. Ovce jsou schopny ujít při pastvě stovky kilometrů a snášejí celoroční pobyt venku v přírodě.

Zvláštností je asezónnost říje (téměř celoroční plodné období). Jehnice lze při dobrém odchovu zapouštět již v deseti měsících věku. Bahnice se vyznačují velmi dobrými mateřskými vlastnostmi a mléčnou užitkovostí.

Plemeno je vhodné k chovu v nížinných a podhorských oblastech. V ČR je chováno od druhé poloviny osmdesátých let dvacátého století (www.merino-landschaf.schok.cz).

2.4. Biotransformační enzymy

2.4.1. Charakteristika biotransformačních enzymů

Enzymy jsou jednoduché či složené bílkoviny, které katalyzují chemické přeměny v živých organismech. Určují povahu i rychlost chemických reakcí. Aktivita enzymů spočívá v podstatném snížení aktivační energie katalyzovaných reakcí a je zejména závislá na koncentraci substrátu, teplotě, pH, aktivátorech a inhibítorech (Nečas a kol. 2000).

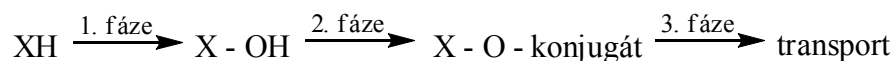
Enzymy katalyzují přeměnu jak látek tělu vlastních – endobiotik, tak látek tělu cizích – xenobiotik. Xenobiotika jsou látky různých chemických struktur, zpravidla lipofilního charakteru. Biotransformační enzymy xenobiotik mají v porovnání s enzymy biotransformujícími endogenní látky nízkou substrátovou specifitu, preferují lipofilní substráty a jsou snadněji indukovatelné.

Výsledkem biotransformace xenobiotik je jejich deaktivace, aktivace, změna účinku nebo toxikace. Při deaktivaci se z lipofilní látky stává hydrofilnější, lépe vylučitelný metabolit. Aktivaci lze využít při podávání léčiv ve formě prodrugu. Toxikace xenobiotika vede ke vzniku pro organismus nebezpečných látek, např. karcinogenů (Kvasničková 1995).

2.4.2. Biotransformační reakce

Xenobiotika lišící se polaritou mají v organismu odlišnou cestu biotransformace. Pokud je xenobiotikum dostatečně polární, je z organismu eliminováno beze změny. Xenobiotika s vyšší lipofilitou jsou pomocí enzymů přeměněna na hydrofilní produkty a teprve ty jsou eliminovány z organismu.

Schematicky znázorněný průběh biotransformace je uveden na následujícím obrázku (Obr. 4).



Obr. 4: Schéma biotransformace xenobiotik

V první fázi biotransformace je xenobiotikum přeměněno příslušnými enzymy na hydrofilnější metabolit zavedením nebo odkrytím polární funkční skupiny. Na tento substituent se v dalších fázích mohou navázat endogenní substráty. V této fázi probíhají především reakce oxidační, redukční a hydrolytické.

Ve druhé fázi biotransformace reaguje xenobiotikum nebo jeho metabolit z první fáze prostřednictvím konjugačních enzymů s endogenními sloučeninami (např. kyselina

glukuronová, glutathion, aminokyseliny). Jedná se o syntetické reakce. Vzniká konjugát, který je ionizován, není resorbován a je snadno vyloučen z organismu. Energie potřebná pro průběh konjugačních reakcí je dodána buď aktivací konjugačního činidla nebo aktivací substrátu. V této fázi probíhá glukuronidace, sulfatace, N-, O-, S-methylace, acetylace, konjugace s glutathionem, aminokyselinami nebo cukry (Gibson a Skett 2001).

Třetí fázi biotransformace xenobiotik představuje jejich transport přes cytoplasmatickou membránu pomocí různých přenašečů (Keppler 2005). Transport představuje jak import xenobiotika do buňky, tak jeho export z buňky ven. Této fáze se účastní např. přenašeče organických kationtů a aniontů, ABC transportéry a P-glykoprotein.

2.4.3. Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů

Aktivita biotransformačních enzymů je ovlivněna celou řadou faktorů. Patří mezi ně faktory interindividuální, konstantní během života jedince - živočišný druh, pohlaví a genetická výbava. A faktory intraindividuální, měnící se během života jedince – věk, stres, výživa, onemocnění, těhotenství, indukce a inhibice.

Mezidruhové rozdíly

Mezidruhové rozdíly se projevují jako rozdíly v rychlosti metabolismu, v produkovaných metabolitech a v poměru produkovaných metabolitů. Např. u potkanů je velmi nízká N-hydroxylace, u koček, lvů a rysa úplně chybí glukuronidace, u vepřů a vačic zase chybí sulfátová konjugace. Člověk hydrolyzuje kumarin v poloze 7, králik v poloze 3 a dále ho oxidačně štěpí (Kvasničková 1995).

Příkladem mezidruhových rozdílů může být i rozdílné působení induktorů a inhibitorů enzymů. Např. rifampicin je významným induktorem CYP 3A u člověka a králíka, ale ne u potkana a myši (Parkinson 1996).

Pohlaví

Závislost aktivity biotransformačních enzymů na pohlaví je spojena s velkou mezidruhovou variabilitou. Např. u potkana byly popsány isoformy CYP specifické pro samce a jiné pro samice (Parkinson 1996), zatímco u jiných druhů se tyto isoformy vyskytují ve stejné míře u obou pohlaví. Expresí genů pohlavně specifických isoform jsou závislé na přítomnosti androgenů v krvi a hormonech, které jejich hladinu regulují (Kvasničková 1995).

Genetické rozdíly

Genetické rozdíly jednotlivců jsou podstatou individuální citlivosti k účinku xenobiotik. Jako příklad může posloužit N-acetyltransferasa. V populaci je možné nalézt její dva fenotypy- pomalé a rychlé acetylátory. U pomalých acetylátorů dochází díky pomalejší metabolizaci xenobiotik k prodloužení jejich účinku a zvýšení toxicity. Při expozici určitými kancerogeny tak přináší vyšší riziko vzniku karcinomu např. močového měchýře a byla také prokázána zvýšená vnímavost pomalých acetylátorů na kancerogeny v cigaretovém kouři. U fenotypu rychlého acetylátora se zvyšuje riziko kolorektálního karcinomu. Dalším polymorfním enzymem je CYP 2D6. V populaci se nachází dokonce 4 různé skupiny metabolizátorů: pomalí, střední, rychlí a velmi rychlí. Aktivita se může lišit u různých jedinců až 1 000 krát (Masopust 2003).

Věk

Aktivita biotransformačních enzymů je u novorozenců výrazně nižší než u dospělé populace a ke stáří opět pozvolně klesá. Může to být zčásti způsobeno redukováným krevním průtokem játry. Například se s věkem snižuje aktivita enzymů první fáze a klesá celkové množství cytochromu P450, což je dáno postupným úbytkem hladkého endoplasmatického retikula v buňkách.

Potrava

Vliv základních živin v dietě je nejednoznačný. Dlouhodobá dieta s nízkým obsahem tuků, proteinů, nadbytkem sacharidů nebo nedostatek některých vitaminů způsobuje pokles aktivity biotransformačních enzymů. Krátkodobé hladovění neovlivňuje aktivitu většiny enzymů, dlouhodobější mění aktivitu mikrosomálních monooxygenas a enzymů glukuronové konjugace. Akutní podání alkoholu působí jako inhibitor řady enzymů, při chronickém zneužívání působí u těchto enzymů jako induktor.

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. V užším slova smyslu znamená indukce zvýšení syntézy nebo stabilizaci mRNA, po které následuje syntéza specifického enzymu za určitou dobu po podání induktoru. Pro většinu enzymů je induktorem jejich substrát. Tím substrát urychluje svou

vlastní biotransformaci a zároveň i biotransformaci dalších xenobiotik, která jsou substrátem týchž enzymů (Kvasničková 1995).

Inhibice

Enzymová inhibice může probíhat různými mechanismy. Kompetitivní inhibice mezi dvěma xenobiotiky biotransformovanými stejným enzymem trvá jen krátkou dobu, po eliminaci inhibitoru se obnoví funkce enzymu. Při tvorbě komplexů enzym-intermediární metabolit dochází k obnovení katalytické aktivity po disociaci komplexu. Autokatalytická inaktivace je ireverzibilním druhem inhibice a k obnovení katalytické aktivity dochází až po nasyntetizování enzymu *de novo*.

Inhibice enzymu jednou látkou může narušit biotransformaci druhé látky a může tak vést ke zvýšení farmakologické nebo toxické odpovědi organismu na druhou látku (Parkinson 1996).

2.5. Přehled sledovaných biotransformačních enzymů

2.5.1. Oxidační enzymy

Oxidační reakce se při metabolismu xenobiotik řadí k první fázi biotransformace. Jsou to hydroxylace, N- a S-oxidace, oxidační dealkylace, deaminace, dehalogenace, oxidace dvojně vazby, aj. Největší roli hrají při oxidačních reakcích mikrosomální monooxygenasy. Jsou to membránové enzymy lokalizované na hladkém endoplasmatickém retikulu buněk různých tkání, zvláště jater, plic, ledvin, kůže a placenty. Pro svoji aktivitu potřebují donor vodíku, kterým je redukovaný NADPH a molekulární kyslík. Jeden atom kyslíku inkorporují do molekuly substrátu a druhý redukují na vodu. Monooxygenasy dělíme na flavinové monooxygenasy a cytochromy P450.

2.5.1.1. Cytochromy P450 (CYP)

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny pevně vázané na membránách endoplasmatického retikula a mitochondrií živočišných buněk, u bakterií jsou v rozpustné formě v cytosolu. Pro funkci cytochromu P450 je nutná součinnost NADPH-cytochrom P450 reduktasy a fosfatidylcholin, který je součástí membrán a udržuje enzymy v nativní konformaci.

Zjednodušený mechanismus katalýzy cytochromem P450 je následující. Substrát (RH) se váže s oxidovanou formou cytochromu na komplex $\text{RH-P450(Fe}^{3+}\text{)}$. Tento komplex je redukován na $\text{RH-P450(Fe}^{2+}\text{)}$, který po navázání kyslíku a dalším sledem reakcí poskytuje oxidovaný produkt ROH a přitom se cytochrom P450 regeneruje.

Cytochromy mají aktivitu monooxygenasovou (nejvýznamnější), oxytransferasovou a reduktasovou vůči kyslíku i vůči xenobiotikům.

Cytochromy P450 zprostředkovávají oxidační reakce xenobiotik i endogenních sloučenin (steroidní hormony, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostaglandiny, leukotrieny, biogenní aminy, retinoidy aj.). Jedna látka může být substrátem pro několik isoform enzymu a naopak jedna isoforma může mít více substrátů různé struktury.

V názvu cytochrom P450 znamená P-pigment a 450-absorpční maximum při diferenční spektrometrii, které vykazuje cytochrom po redukcí a vazbě s CO. Pro cytochromy se užívá klasifikace vycházející z podobnosti sekvencí aminokyselin v molekule bílkoviny. Jsou řazeny do rodin a podrodin, v rámci nichž jsou rozlišeny

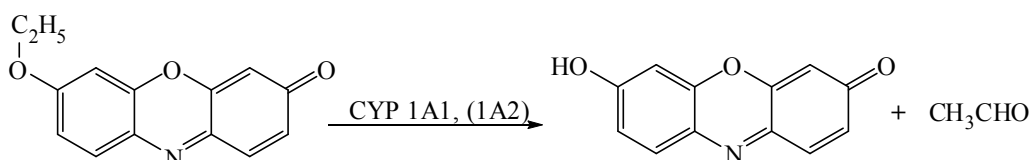
jednotlivé isoformy. Členové jedné rodiny by měli mít více než 40 % aminokyselinové totožnosti s ostatními rodinami, v dané rodině jsou podrodiny definovány více než 60% totožností aminokyselinové sekvence. Pro označení cytochromu P450 jako enzymu se používá zkratka CYP, pro označení genu kódujícího enzym zkratka *CYP* psaná kurzívou. (Lewis 2001). Za zkratkou CYP následuje arabská číslice označující rodinu, velké písmeno označující podrodinu a arabská číslice označující konkrétní isoformu.

CYP 1A

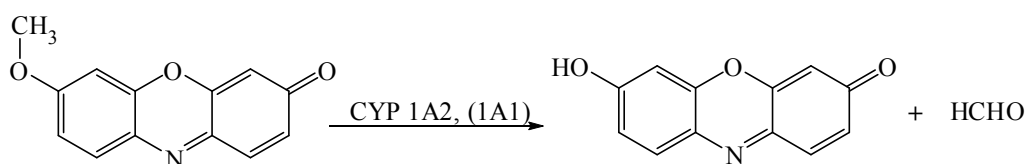
Savci mají dvě indukovatelné isoformy: CYP 1A1 a CYP 1A2. Jejich výskyt je rozdílný mezidruhově i mezi jednotlivými orgány v rámci téhož druhu, liší se i aktivitou. CYP 1A2 je u lidí obsažen pouze v játrech a je vysoce aktivní. CYP 1A1 se vyskytuje v plicích, střevní stěně, kůži, lymfocytech a placentě (Parkinson 1996).

Enzymy se účastní oxidativního metabolismu řady léčiv, například paracetamolu, kofeinu, teofylinu a warfarinu. Inhibiční účinek na ně mají fluorochinolonová antibiotika, fluvoxamin a cimetidin a α -naftoflavon. Indukční vliv mají polyhalogenované aromatické uhlovodíky z cigaretového kouře, kofein a omeprazol.

V této práci je aktivita CYP 1A1 a CYP 1A2 sledována pomocí dvou substrátů: 7-ethoxyresorufinu a 7-methoxyresorufinu. Rovnice reakcí jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obr. 5 a Obr. 6).



Obr. 5: O-dealkylace 7-ethoxyresorufinu



Obr. 6: O-dealkylace 7-methoxyresorufinu

CYP 2B

Isoforma CYP 2B se nachází v játrech, gastrointestinálním traktu a plicích. Vyskytuje se zde ve formě jak konstitutivní, tak indukibilní. I když je množství CYP 2B v organismu malé, nelze tento enzym vyloučit z podílu na kancerogenezi. Účastní se totiž aktivace některých karcinogenů a hraje roli v metabolismu protinádorových léčiv, jako

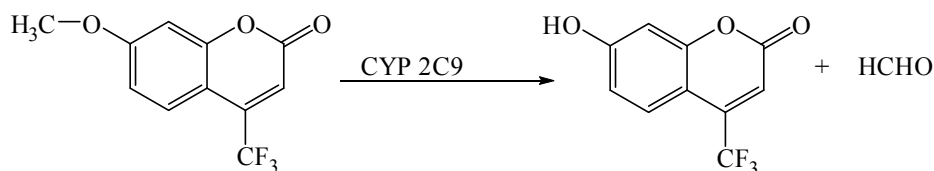
jsou cyklofosfamid a ifosfamid. Jeho další substráty jsou např. aflatoxin, nikotin a 6-aminochrysen. Indukován může být barbituráty a dexamethasonem (Stiborová 1999).

Jako relativně specifického substrátu pro určení aktivity CYP 2B bylo v této práci použito pentoxyresorufinu.

CYP 2C9

Tento isoenzym je polymorfní, jeho množství, funkce a regulace se liší u jednotlivých živočišných druhů. Enzym se účastní oxidativního metabolismu řady léčiv, např. glipizidu, losartanu, warfarinu a nesteroidních antiflogistik. Je inhibován sulfafenazonem a flukonazolem a indukován barbituráty a rifampicinem.

V práci bylo pro určení aktivity CYP 2C9 použito 7-methoxy-4-trifluormethylkumarinu. Rovnici reakce znázorňuje následující obrázek (Obr. 7).

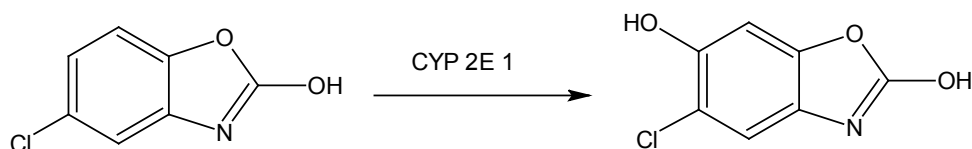


Obr. 7: O-dealkylace 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarinu

CYP 2E1

Cytochrom P450 2E1 se významně uplatňuje v metabolismu toxikologicky důležitých látek s malou molekulovou hmotností. Je zodpovědný za tvorbu reaktivních metabolitů z mnoha látek (benzen, styren, vinylchlorid, akrylonitril, vinylkarbamát, ethylkarbamát, trichlorethylen, chloroform). Je konstitutivním enzymem jaterní tkáně, avšak je také indukovatelný řadou látek, které jsou většinou i jeho substráty. Nejznámějšími induktory jsou ethanol a aceton, fyziologicky důležitá je indukce vyvolaná hladověním (endogenní tvorba acetonu). Inhibici způsobují diallylsulfidy.

Aktivita CYP 2E1 byla sledována díky přeměně chlorzoxazonu na hydroxychlorzoxazon. Reakce je znázorněna na následujícím obrázku (Obr. 8).

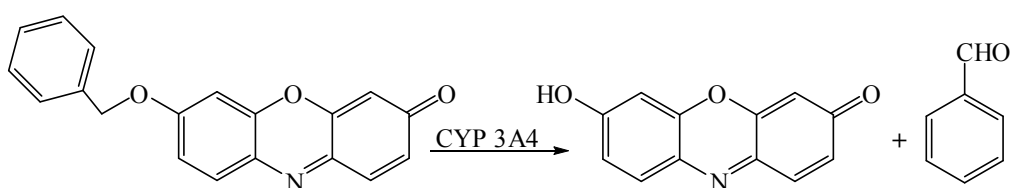


Obr. 8: Hydroxylace chlorzoxazonu na 6-hydroxychlorzoxazon

CYP 3A

CYP 3A4 je co do obsahu v tkáních, i co do množství substrátů, které přeměňuje, rozhodně nejvýznamnější isoformou cytochromu P450. Je přítomen nejen v játrech, ale i v ledvinách, GITu, plicích, děloze a placentě. Substráty tohoto isoenzymu jsou některé přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a z endogenních látek pak steroidní sloučeniny (17-alfa-estradiol, testosteron, progesteron, kortisol). Je indukován barbituráty, rifampicinem a dexamethasonem. Inhibován je pak ketokonazolem, kortikosteroidy a grapefruitovou šťávou (Stiborová a kol. 1999).

Následující obrázek (Obr. 9) zobrazuje reakci benzyloxyresorufinu katalyzovanou CYP 3A.



Obr. 9: O-dealkylace benzyloxyresorufinu

2.5.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO)

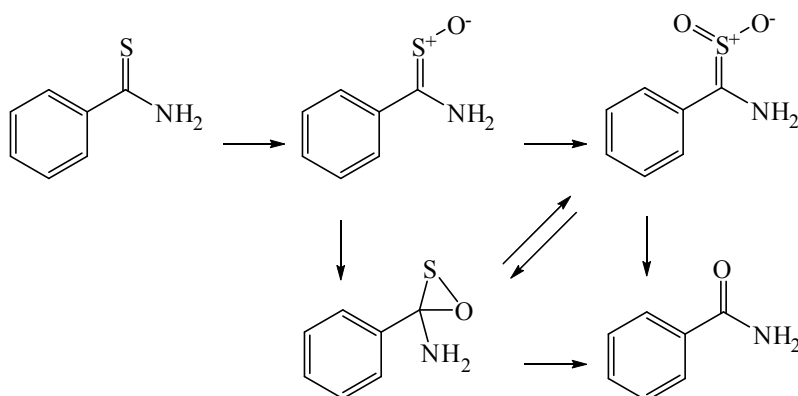
Flavinmonooxygenasy představují další významné enzymy první fáze biotransformace. Koenzymem flavinových monooxygenas je flavinadeninukleotid (FAD). Donor elektronů NADPH redukuje FAD na FADH₂, který reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku nejdůležitějšího meziprojektu 4 α -hydroperoxidu flavinu (FAD-OOH). Ten pak reaguje se substrátem za vzniku oxygenovaného produktu S-OH. 4 α -hydroperoxid flavinu se tak mění na 4 α -hydroxid flavinu (FAD-OH), který se dále regeneruje na FAD. Jedinečnost katalýzy flavinových monooxygenas tkví v tom, že k aktivaci kyslíku dochází bez účasti substrátu a substrát přijímá kyslík v jediném kroku. Ostatní kroky znamenají regeneraci všech reakčních meziprojektů, kterých se substrát neúčastní (Kvasničková 1995). Stejně jako cytochromy jsou FMO lokalizovány na membránách endoplasmatického retikula buněk. Společnou s cytochromy mají i existenci mnoha isoform. Na rozdíl od cytochromů jsou ale FMO méně indukovatelné.

Substráty FMO jsou sloučeniny různé struktury, fyzikálně-chemických vlastností i biologických účinků. Jejich společným znakem je nukleofilní centrum v molekule, které je

často tvořeno heteroatomem. Tento předpoklad splňují aminy, thioly, sulfidy, thioamidy, fosfiny.

FMO jsou termolabilní a zvýšená teplota tedy působí inhibici enzymu. Jsou však odolné vůči neionickému detergentu, který způsobuje inhibici CYP. Také se liší pH-optimum těchto systémů, pro FMO je to 8 až 10, pro většinu CYP 7 až 8 (Parkinson 1996).

Na následujícím obrázku (Obr. 10) je zachycena biotransformace thiobenzamidu použitého v této práci pro stanovení aktivity FMO.



Obr. 10: Biotransformace thiobenzamidu

2.5.2. Redukční enzymy

Redukční přeměny xenobiotik zahrnují redukce karbonylových skupin, dvojných vazeb, N-oxidů, sulfoxidů, redukce aromatických niro- a azo-sloučenin, redukční dehalogenace, redukce hydroxámových kyselin aj. I když je výčet redukčních reakcí obsáhlý, redukční reakce jsou organismem využívány podstatně méně než reakce oxidační nebo konjugační.

Redukční enzymy jsou obsaženy v membránách endoplasmatického retikula buňky (nerozpustné formy), v cytosolu (rozpustné formy) a ve značné míře v bakteriích střevní mikroflóry. Jako koenzymy vyžadují NADPH a NADH.

U substrátů použitých v této práci dochází působením redukčních enzymů především k redukci karbonylové skupiny. Karbonylreduktasy se řadí do tří nadrodin:

Aldoketoreduktasy (AKR)

Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

2.5.2.1. Aldoketoreduktasy (AKR)

Nadrodinu aldoketoreduktas tvoří více než 120 proteinů rozdělených podle procentuální aminokyselinové identity v současnosti do 15 rodin, AKR 1 – AKR 15. Rodiny jsou dále členěny na podrodiny. Největší rodinou je AKR1 a především k této rodině patří savčí aldoketoreduktasy. Podle substrátové specifity je rozdělena na aldehydreduktasy (AKR 1A), aldosoreduktasy (AKR 1B), dihydrodiol/hydroxysteroid dehydrogenasy (AKR 1C) a steroidreduktasy (AKR 1D).

Struktura aldoketoreduktas se vyznačuje charakteristickým uspořádáním α -helixů a β -skládaných listů do tzv. $(\alpha/\beta)_8$ -soudků.

AKR se vyznačují širokou substrátovou specifitou, která ztěžuje přesné pojmenování těchto proteinů. Enzymy náležející do nadrodiny AKR mají několik názvů v závislosti na substrátové specifitě a použité nomenklatuře.

AKR 1A - aldehydreduktasy

Členové rodiny AKR 1A katalyzují NADP(H)-dependentní redukce širokého spektra aldehydů na příslušné alkoholy. K jejich fyziologickým úlohám patří metabolismus aldehydických neurotransmiterů produkovaných monoaminoxidasou, detoxikace reaktivních aldehydických intermediátů a osmoregulace (Allan a Lohnes 2000).

Aldehydreduktasa AKR 1A1 je všeobecně rozšířený enzym. Jedná se o konstitutivně exprimovaný a v největších množstvích zastoupený enzym z nadrodiny AKR. Fyziologicky je součástí metabolické cesty syntézy cholesterolu a triglyceridů.

AKR 1C - dihydrodioldehydrogenasy

Členové podrodiny AKR 1C mají širokou substrátovou specifitu. Metabolizují přednostně endogenní substráty jako hydroxysteroidy, žlučové kyseliny a hydroxyprostaglandiny. Často působí jako dvousměrné katalyzátory a vzájemně přeměňují karbonyly a sekundární alkoholy za využití kofaktorů NAD(P)H nebo NAD(P)⁺. Produkcí alkoholů z řady aldehydů a ketonů zvyšují dostupnost biotransformovaných látek konjugačním reakcím. Metabolizují i exogenní substráty- aromatické aldehydy, ketony a chinony, z xenobiotik použitých v této práci např. ketoprofen, naloxon, daunorubicin, metyrapon, oracin.

2.5.2.2. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

Do nadrodiny SDR se řadí více než 3 000 enzymů. V mnohém se liší, ale mají společný tzv. Rossmannův záhyb v aktivním místě. Je to centrální β -list složený z vysoce konzervativní tetrády aminokyselin: Asn, Ser, Tyr, Lys.

Karbonylreduktasa (CR)

Karbonylreduktasa (prostaglandin-9-ketoreduktasa) je NADPH dependentní oxidoredukční enzym lokalizovaný v cytosolu buňky. Katalyzuje redukce velkého množství karbonylových sloučenin na příslušné alkoholy. Je zapojena do detoxikace chinonů, metabolismu prostaglandinů, neuroprotektce a metabolismu anthracyklinů. Jejimi substráty jsou aromatické aldehydy, ketony, daunorubicin, prostaglandin E a F aj. Inhibována může být progesteronem, indometacinem, furosemidem, kumarinem, barbitalem (www.brenda-enzymes.org).

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 β -HSD)

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa katalyzuje oxidaci hydroxylové skupiny nebo redukci oxoskupiny na 11. pozici cyklopentanoperhydrofenanthrenového jádra. Má klíčovou roli v tkáňově specifické modulaci účinků steroidních hormonů. Byly identifikovány dvě isoformy s rozdílnou funkcí, afinitou k substrátu a kofaktorovou specifitou.

11 β -HSD1 jako kofaktor využívá $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ a je lokalizovaná v mikrosomální frakci. 11 β -HSD1 má převažující expresi v játrech, mozku, plicích a tukové tkáni. *In vivo* u ní převažuje aktivace volně kolujícího kortizonu resp. 11-dehydrokortikosteronu na aktivní kortizol resp. kortikosteron. Tato regulace může způsobovat lokální zvýšení glukokortikoidů v různých tkáních a regulovat tak metabolismus v těchto tkáních.

11 β -HSD2 je NAD^+/NADH dependentní, vykazuje téměř 100 x vyšší afinitu k substrátu než 11 β -HSD1 a má pouze dehydrogenasovou aktivitu. Je exprimována v mineralokortikoidních cílových tkáních: v ledvině, kolonu, ileu a placentě. Rychlou inaktivací kortizolu resp. kortikosteronu na kortizon resp. 11-dehydrokortikosteron působí jako protektce mineralokortikoidních receptorů před jeho vazbou. Porušení této funkce má za následek tzv. falešný mineralokortikoidní syndrom, který se projevuje nadbytkem mineralokortikoidních účinků (hypertenze, hypernatremie a hypokalemie). Zatím ještě není přesně známa lokalizace 11 β -HSD2 na buněčné úrovni.

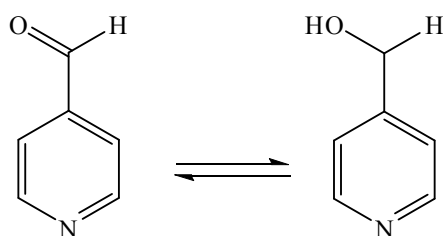
Mezi inhibitory 11 β -HSD patří některé steroidy s methylovými substituenty na C21 a C2 α pozicích, androgeny, žlučové kyseliny, flavonoidy vyskytující se v grapefruitu a kyselina glycyrrhetinová (www.natur.cuni.cz).

2.5.2.3. Substráty redukčních enzymů použitých v této práci

4-pyridinkarboxaldehyd

Jedná se o kapalnou látku o molekulové hmotnosti 107 g/mol. Je dobře mísitelný s vodou. Patří mezi potenciálně toxické aromatické uhlovodíky.

V cytosolické frakci jater je 4-pyridinkarboxaldehyd redukován aldehydreduktasou AKR 1A1, v mikrosomální frakci pak 3 α -HSD. V dalších metabolických přeměnách mohou hrát roli i AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4 (Palackal a kol. 2001).

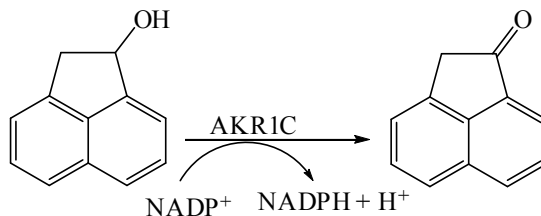


Obr. 11: Redukce 4-pyridinkarboxaldehydu na 4-pyridylkarbinol

Acenaftenol

Molekulární hmotnost acenaftenolu je 170,207 g/mol, je špatně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Acenaftenol se působením cytosolických aldoketoreduktas AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C3, AKR 1C4 oxiduje na acenaftenon. Současně se NADP⁺ redukuje na NADPH.

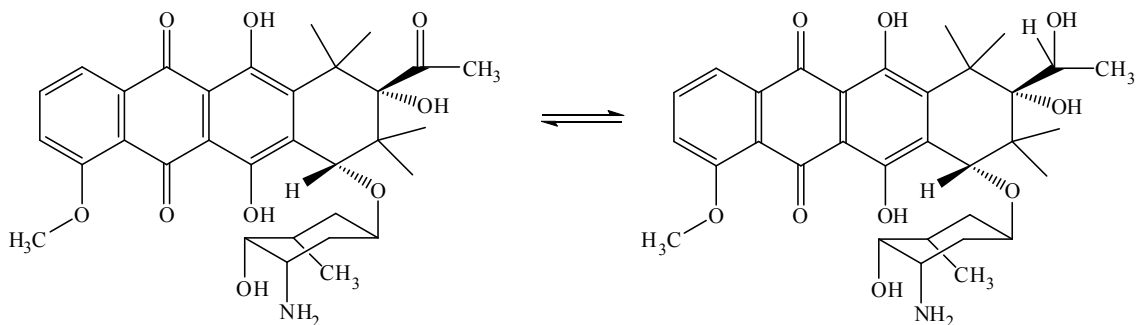


Obr. 12: Oxidace acenaftenolu na acenaftenon

Daunorubicin

Daunorubicin je pevná látka oranžovo-červené barvy o molekulové hmotnosti 564 g/mol. Je využíván jako cytostatikum při léčbě akutní leukemie a u blastického zvratu myeloidní leukémie.

Daunorubicin je redukován na daunorubicinol několika reduktasami. Nejvyšší aktivitu při pH 6,0 vykazuje AKR 1C2 a karbonyl reduktasa, při pH 8,0 má nejvyšší redukční aktivitu aldehydreduktasa (Ohara a kol. 1995).

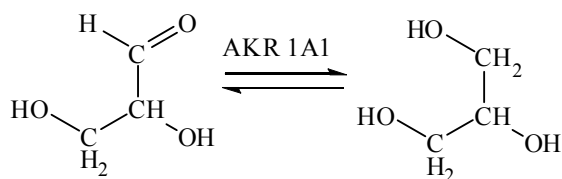


Obr. 13: Redukce daunorubicinu na daunorubicinol

DL-glyceraldehyd

Jedná se o pevnou látku o molekulové hmotnosti 90 g/mol, obtížně rozpustnou ve vodě a dobře rozpustnou v DMSO.

DL-glyceraldehyd je endogenní substrát redukováný v cytosolu většiny savčích orgánů aldehydreduktasou AKR 1A1 na glycerol (Kawamura a kol.1999).

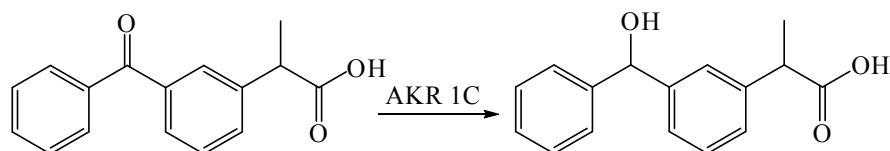


Obr. 14: Redukce DL-glyceraldehydu na glycerol

Ketoprofen

Tato pevná látka o molekulové hmotnosti 254 g/mol je ve vodě nerozpustná, rozpustná v DMSO. Terapeuticky se využívá jako nesteroidní antiflogistikum při zánětlivých a degenerativních revmatických onemocněních

Ketoprofen je v játrech redukován na dihydroketoprofen dihydrodiol-dehydrogenasami AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4 (Ohara a kol. 1995).

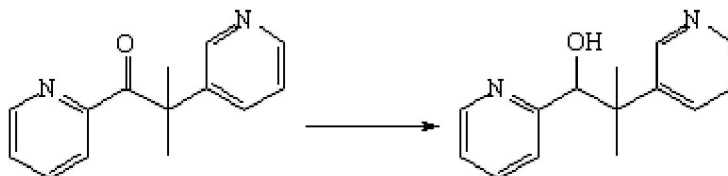


Obr. 15: Redukce ketoprofenu na dihydroketoprofen.

Metyrapon

Metyrapon je pevná látka o molekulární hmotnosti 226 g/mol. Je rozpustný ve vodě. Z farmakologického hlediska je využíván jako diagnostikum funkce předního laloku hypofýzy a jako doplňková léčba u stavů nadprodukce gluko- a mineralokortikoidů.

Metyrapon je redukován na alkoholický metabolit metyrapol jak cytosolickými, tak mikrosomálními enzymy náležejícími do nadrodiny aldo-ketoreduktas (cytosolické dihydrodioldehydrogenasy a karbonylreduktasy) a krátkořetězcových dehydrogenas/reduktas (mikrosomální 11 β -HSD1) (Maser a Oppermann 1997).

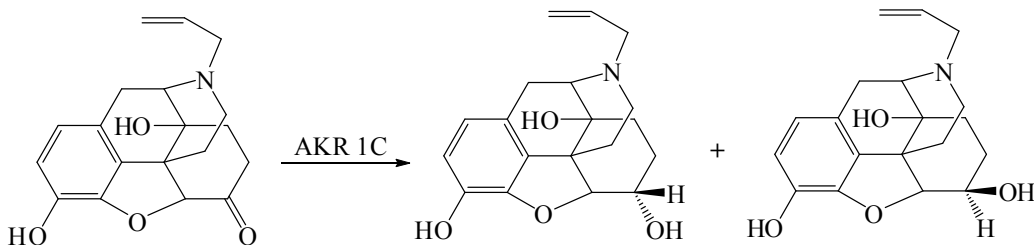


Obr. 16: Redukce metyraponu na metyrapol

Naloxon

Naloxon je ve vodě rozpustná pevná látka o molekulární hmotnosti 364 g/mol. Využívá se jako antidotum morfinových narkotik a jako diagnostikum morfinové závislosti.

Naloxon je v játrech redukován na 6 α -naloxol a 6 β -naloxol dihydrodioldehydrogenasami AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4 (Ohara a kol. 1995).

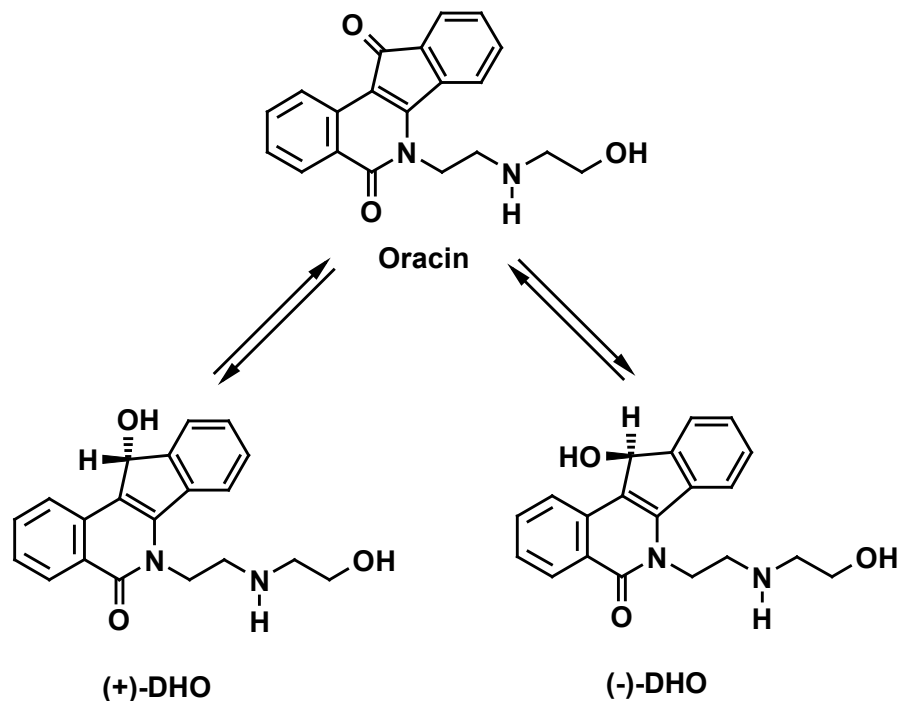


Obr. 17: Redukce naloxonu na 6 α -naloxol a 6 β -naloxol.

Oracin

Oracin je pevná látka oranžové barvy o molekulové hmotnosti 370,85 g/mol. Jedná se o potenciální cytostatikum pro orální užití.

V mikrosomech je oracin biotransformován především 11 β -HSD1. V cytosolu dochází k redukci oracinu karbonylreduktasou a aldoketoreduktasami AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4 (Wsól a kol. 2005). Redukcí oracinu pomocí těchto enzymů vzniká 11-dihydrooracin.



Obr. 18: Redukce oracinu na 11-dihydrooracin.

2.5.3. Konjugační enzymy

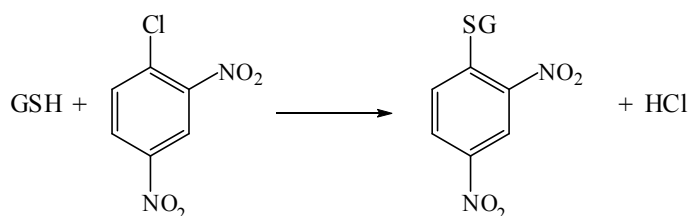
Konjugační enzymy katalyzují syntetické reakce ve druhé fázi biotransformace xenobiotik a nazývají se transferasy. Při konjugaci může být jeden substrát využit několika transferasami a vznikají tak různé konjugáty, které jsou následně vyloučeny žlučí nebo močí. Substrátem pro konjugační reakce je rovněž řada eobiotik, jako např. steroidní hormony, žlučové kyseliny a bilirubin. Transferasy se vyskytují ve všech tkáních organismu, nejvíce však v játrech. V buňce jsou lokalizovány jak v cytosolu, tak na hladkém endoplasmatickém retikulu. Mezi reakce konjugačních enzymů patří glukuronidace, sulfatace, methylace, acetylace, peptidová konjugace, tvorba merkaptopurinových kyselin aj.

2.5.3.1. Glutathion-S-transferasy (GST)

Glutathion je fyziologicky významný tripeptid (γ -glutamylcysteinglycin, GSH), který se kromě jiných funkcí účastní i metabolismu xenobiotik. Je silným nukleofilním činidlem a s některými látkami obsahujícími elektrofilní atom (epoxydy nebo arenoxidy) reaguje i bez enzymové katalýzy. V organismu jsou enzymy, které tuto reakci dokáží urychlit: glutathion-S-transferasy. GST jsou přítomny v játrech, ledvinách, plicích, střevě a varlatech. Na buněčné úrovni jsou lokalizovány v cytosolu. Substráty GST jsou lipofilní a obsahují elektrofilní atom.

Na rozdíl od ostatních konjugátů nejsou konjugáty s glutathionem konečným produktem biotransformace. Účinkem γ -glutamyltranspeptidasy je konjugát s GSH dále transformován. Nejprve dojde k odštěpení glutamátu, v dalším stupni glycinu. Zbýlý cystein-S-konjugát je acetyltransferasou acetylován a vzniká příslušná merkapturová kyselina. Vhodnými substráty pro tvorbu merkapturových kyselin jsou halogenované alkylsloučeniny, nenasycené alkeny, nenasycené alifatické, aromatické, alicyklické sloučeniny s ketoskupinou v postranním řetězci, epoxydy aromatických uhlovodíků, aromatické nitrokyseliny, aminokyseliny (Kvasničková 1995).

Na následujícím obrázku (Obr. 19) je znázorněna konjugace glutathionu s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem použitá v této práci pro měření aktivity GST.



Obr. 19: Konjugace GSH s 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem

2.5.3.2. UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)

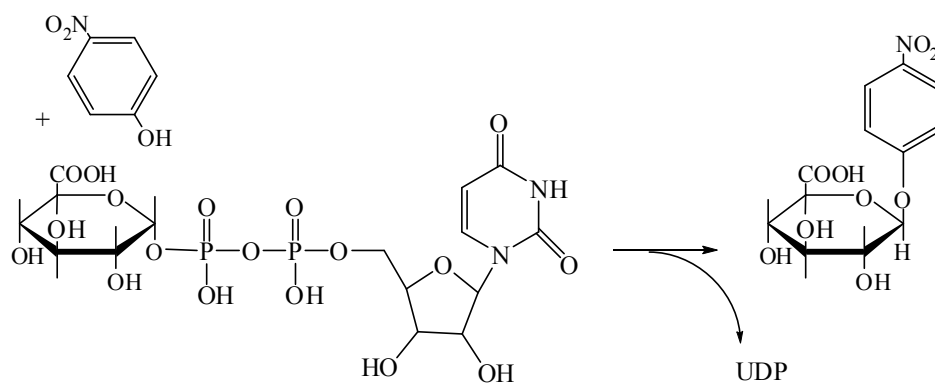
UDP-glukuronosyltransferasy katalyzují glukuronidaci, která je považována za nejčastější konjugační reakci. Vzniklé konjugáty jsou většinou rozpustné, disociované a jsou posledními produkty ve sledu biotransformačních přeměn.

Nejvyšší aktivitu vykazují UDP-glukuronosyltransferasy v játrech, dále pak v ledvinách, gastrointestinálním traktu a kůži. Na subcelulární úrovni jsou lokalizovány na membránách endoplasmatického retikula v blízkosti cytochromů P450.

Kofaktorem UGT je UDP-glukuronová kyselina, která vzniká dehydrogenací UDP-glukosy. Ke glukuronidaci dochází přenosem glukuronosylu z uridinfosfoglukuronátu

na vhodný nukleofilní akceptor (např. hydroxyl, karboxyl, aminoskupinu) a přitom dochází k inverzi na anomerickém uhlíku cukerného zbytku. Tímto typem konjugační reakce mohou vznikat C-, O-, N-, S-glykosidy.

Vhodným substrátem pro měření aktivity UGT je p-nitrofenol. Reakce je popsána na následujícím obrázku (Obr. 20).



Obr. 20: Konjugace p-nitrofenolu s UDP-glukuronovou kyselinou

3. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce je součástí grantového projektu GA524/06/1345-Biotransformační enzymy hostitele a parazita - význam pro terapii parazitóz a helmintorezistenci u přežvýkavců (2006-2008) podporovaného Grantovou agenturou České republiky. Cílem projektu je stanovit aktivity redukčních biotransformačních enzymů ovce domácí i vlasovky slézové vůči anthelmintiku flubendazolu a specifickým modelovým substrátům, studovat změny v aktivitě těchto enzymů v závislosti na léčbě ovce domácí.

Vlastním cílem této práce je porovnat, jestli a jak se mění aktivity biotransformačních enzymů ovce domácí při léčbě parazitóz po podávání flubendazolu.

Konkrétní úkoly jsou:

- zpracování biologického materiálu na subcelulární frakce
- stanovení aktivit jednotlivých enzymů
 - oxidačních- CYP 1A1, 1A2, 2B, 2C9, 2E1, 3A; FMO
 - redukčních- AKR 1A1, 1C; 3 α -HSD; 11 β -HSD1; karbonylreduktasa
 - konjugačních- GST; UGT
- porovnání aktivit enzymů ovcí kontrolních a zdravých, léčených
- porovnání aktivit enzymů ovcí kontrolních a nemocných, léčených
- porovnání aktivit enzymů ovcí zdravých, léčených a nemocných, léčených
- porovnání aktivit enzymů vzhledem k pohlaví sledovaných zvířat

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Biologický materiál

Pro pokusy byly použity mikrosomální a cytosolické frakce z jaterní a střevní tkáně ovčí domácích (*Ovis aries*, plemeno merinolandschaf) ze tří pokusných skupin. Všechny ovce byly při vstupu do pokusu 3-4 měsíce staré.

Skupiny ovčí:

Skupina A - ovce **kontrolní** (3 samci, 3 samice)

Skupina B - ovce **zdravé, léčené** (4 samci, 4 samice)

- ovčím byl třikrát podán flubendazol v dávce 15mg/kg živé váhy

Skupina D - ovce **nemocné, léčené** (4 samci, 4 samice)

- ovce byly perorální cestou experimentálně infikovány 5 000 kusy L3 larev *Haemonchus contortus* a po sedmi týdnech jim byl třikrát podán flubendazol v dávce 15 mg/kg živé váhy

Pro potřeby grantového projektu byly použity další skupiny ovčí, které však pro tuto práci nebyly podstatné.

Skupina C - ovce nemocné (4 samci, 4 samice)

- ovce byly perorální cestou nakaženy 5 000 kusy L3 larev *Haemonchus contortus* po dobu 7 týdnů

Skupina E – ovce dlouhodobě nemocné (4 samci)

- ovce byly perorální cestou nakaženy 5 000 kusy L3 larev *Haemonchus contortus* po dobu 10 týdnů

Na konci pokusu byla zvířata usmrcena. Do 5-ti minut jim byla vyjmuta játra a část tenkého střeva. Levý lalok jater byl rozdělen na malé kousky a zmražen v tekutém dusíku během transportu do laboratoře. Tenká střeva byla vypláchnuta fyziologickým roztokem, aby byla zbavena obsahu a taktéž byla zmražena v tekutém dusíku. Dále byla játra i střeva až do zpracování na subcelulární frakce uložena v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

4.2. Přístroje

laboratorní předvážky OWA Labor

analytické váhy Scaltec SBC22

pH-metr Jenway LTD 3020

multikanálová pipeta Eppendorf Research

třepačka Reax TOP

koncentrátor Eppendorf 5301

termoblok s nástavcem Thermomixer Comfort Eppendorf

čtečka Biorad, Microplate Reader, model 550

UV-VIS spektrofotometr Heliosβ

Spektrofluorimetr Perkin Elmer LS 50 B

vysokoučinný kapalinový chromatograf

homogenizátor PotterS

centrifuga Heraeus

ultracentrifuga Beckman

stolní centrifuga Eppendorf

4.3. Pracovní postupy

4.3.1. Příprava subcelulárních frakcí

Princip:

Principem přípravy subcelulárních frakcí je rozrušení buněčné struktury a následné oddělení mikrosomů od cytosolu frakční ultracentrifugací.

Postup:

Vzorky jater jednotlivých zvířat byly vyndány z hlubokomrazícího boxu, po mírném rozehrátí byly nastříhány na velmi malé kousky a rozváženy do mističek uložených na ledu po 5 g. Další práce se odehrávaly v chladicí místnosti.

Homogenizace byla provedena s 0,1 M sodno-fosfátovým pufrům pH 7,4 v pístovém homogenizátoru PotterS. Pohybem pístu nahoru a dolů a jeho rotací v homogenizační zkumavce došlo k rozrušení buněčných membrán. Získaný homogenát byl centrifugován.

První centrifugace proběhla v centrifuze Heraeus (4°C, 5 000 g, 20 minut). Peleta obsahovala potřáhané buněčné membrány, vazivo, cévy a jádra buněk. Supernatant byl přelit do čistých kyvet a odstředěn na stejné centrifuze (4°C, 20 000 g, 60 minut). Po druhém stočení tvořily peletu mitochondrie, které nebyly použity. Supernatant byl přelit do čistých kyvet pro ultracentrifugaci. Třetí odstředění proběhlo v centrifuze Beckman (4°C, 100 000 g, 65 minut). Supernatant obsahující buněčný cytosol byl opatrně odebrán a za stálého míchání rozpipetován po 1,1 ml do mikrozkušavek Eppendorf. K peletě ze třetího točení obsahující mikrosomy byl přidán 0,1 M sodno-fosfátový pufr pH 7,4 a směs byla resuspendována malým homogenizačním pístem. Takto připravený materiál obsahující mikrosomy byl centrifugován v centrifuze Beckman (4°C, 100 000 g, 65 minut). Nyní byly očištěné mikrosomy obsažené v peletě resuspendovány v 0,1 M sodno-fosfátový pufru pH 7,4 s 20% glycerolu. Následně byly homogenizovány za pomoci ultrazvukové lázně a pak za stálého míchání rozpipetovány po 0,33 ml do mikrozkušavek Eppendorf.

Takto byly postupně zpracovány všechny vzorky z jednotlivých zvířat. Každá mikrozkušavka s mikrosomy a cytosolem byla řádně označena (mikrosomy nebo cytosol; skupina zvířat A, B nebo D; samec nebo samice; číslo zvířete). Mikrozkušavky pak byly uloženy do popsaných krabiček a byly uchovávány pro další použití v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80°C.

Zmražená střeva jednotlivých zvířat byla lehce rozmrazena, podélně rozstříhnutá a ze stěn byla stíráním získána mukóza. Ta pak byla navážena do mističek po 5 g. Další postup se shodoval se zpracováním jater.

Před měřením aktivit jednotlivých enzymů byly v rámci každé skupiny zvířat vytvořeny směsné vzorky. To např. znamená, že se smísily rozmražené mikrosomální frakce 3 samců skupiny A a to v poměru 1:1:1.

4.3.2. Stanovení koncentrace bílkovin

Princip:

Proteiny obsažené ve vzorku reagují s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která pak v prostředí o pH kolem 10 vytváří modrofialový komplex s kyselinou bicinchonovou (BCA). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu se měří při 562 nm. Výsledná koncentrace bílkoviny ve vzorku se získá odečtením z kalibrační křivky (Smith a kol. 1985).

Postup:

Sestavení kalibrační křivky:

Pro sestavení kalibrační křivky byl jako standard použit 0,1% roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Podle tabulky (Tab. 1) bylo z toho základního roztoku připraveno šest roztoků s klesající koncentrací bílkoviny. Kalibrační křivka byla tvořena šesti body, pro každý bod bylo měřeno osm paralelních vzorků.

Tab. 1: Příprava roztoků BSA pro sestavení kalibrační křivky ke stanovení koncentrace bílkovin

Číslo vzorku	Koncentrace bílkoviny ve vzorku [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

Stanovení vzorků:

Mikrosomy i cytosol byly naředěny 20krát. Od každého vzorku byla vytvořena dvě ředění a z každého ředění byly připraveny 4 paralelní měření. Celkem tedy 2x4 měření pro každé mikrosomy a cytosol.

Stanovení bylo prováděno v mikrotitrační destičce. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 10 μl naředěných mikrosomů nebo cytosolu a 200 μl pracovního roztoku C. Pracovní roztok C byl získán smícháním roztoku A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH) s roztokem B (4% CuSO₄.6H₂O). Do první jamky destičky byla napipetována pouze redestitovaná voda. Zbytek prvního sloupce byl použit pro slepé vzorky, kdy bylo místo bílkoviny pipetováno 10 μl redestilované vody. Po promíchání byly vzorky inkubovány 30 min při 37°C.

Po inkubaci byla na čtečce Biorad změřena absorbance při 562 nm proti destilované vodě (první jamka destičky). Poté byl od hodnot absorbance odečten průměr hodnot absorbance slepých vzorků. Hodnoty koncentrace bílkovin ve vzorcích byly odečteny z kalibrační křivky.

4.3.3. Stanovení aktivity CYP 1A1, 1A2, 2B, 3A

Princip:

Metoda je založena na přidání relativně specifického substrátu pro určitou isoformu CYP k mikrosomální frakci. Substrát je enzymem metabolizován na fluoreskující produkt a je měřen přírůstek fluorescence na spektrofluorimetru (Perkin Elmer LS50B). Vyhodnocení se provádí metodou standardního přídávku (Burke a kol. 1994).

Tab. 2: Relativní specifčnost substrátů pro jednotlivé isoformy CYP

Název substrátu	CYP
Ethoxyresorufin	1A1, částečně 1A2
Methoxyresorufin	1A2, částečně 1A1
Pentoxyresorufin	2B
Benzyloxyresorufin	3A, částečně 2B

Reagencie:

Reakční směs v kyvetě: celkový objem 1 ml

Substrát:	5 μ l	0,5 mM roztok ethoxyresorufinu v DMSO nebo 0,5 mM roztok methoxyresorufinu v DMSO nebo 0,5 mM roztok pentoxyresorufinu 0,5 mM v DMSO či 0,5 mM roztok benzyloxyresorufinu 0,5 mM v DMSO
Vzorek:	25 μ l	mikrosomy
Pufř:	910 μ l	0,1 M Tris-HCl pH 7,4
Kofaktor:	50 μ l	0,1 M roztok MgCl ₂
	10 μ l	50mM roztok NADPH v Tris pufřu
<u>Standardní přídavek:</u>	10 μ l	0,5 μ M roztok resorufinu

Postup:

Před měřením byly na spektrofluorimetru nastaveny tyto parametry: vlnová délka excitační 530 nm, vlnová délka emisní 585 nm, excitační štěrba 10 nm, emisní štěrba 20 nm, teplota 37°C, délka inkubace 180 s a míchání pomalé „low“. Před každým měřením byla nastavena základní linie „baseline“ na nulu.

Mikrosomy, substráty a NADPH byly před napipetováním do kyvety skladovány v ledové tříšti. Pufř byl temperován na teplotu 37°C.

Do kyvety Hellma o objemu 1 ml byl za stálého míchání napipetován pufr, MgCl₂, mikrosomy a substrát. Po ustálení směsi (50 s) byl do kyvety přidán NADPH pro spuštění reakce. Na přístroji byl sledován přírůstek fluorescence. Po 150 s byl do kyvety připipetován standardní přídavek – 10 µl resorufinu. Před dalším měřením byl obsah kyvety odsán a kyveta byla propláchnuta destilovanou vodou. Pro každý vzorek byla provedena 3 paralelní měření.

Po změření byla na obrazovce přístroje odečtena směrnice přímky nárůstu intenzity fluorescence, intenzita na začátku a na konci přídávku resorufinu. Aktivita byla vypočtena podle vzorce :

$$a = \frac{k}{B - A} * n * D * 60 \quad [\text{pmol/ml/min}]$$

a aktivita

k směrnice

A intenzita fluorescence na začátku přídávku resorufinu

B intenzita fluorescence na konci přídávku resorufinu

n látkové množství standardního přídávku v 1 ml (3,4 pmol)

D zředění

60 přepočet na minuty

Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny ve vzorku a tím byla získána tzv. specifická aktivita enzymu [pmol/mg/min].

4.3.4. Stanovení aktivity CYP 2C9

Princip:

Metoda je založena na přidání relativně specifického substrátu k mikrosomální frakci. Substrát je enzymem metabolizován na fluoreskující produkt a je měřen přírůstek fluorescence na spektrofluorimetru. Vyhodnocení se provádí metodou standardního přídávku (Price a kol. 2000).

Reagencie:

Reakční směs v kyvetě: celkový objem 1 ml

Substrát:	10 µl	2 mM roztok 7-methoxy-4-trifluormethylkumarinu v DMSO (MFC)
Vzorek:	20 µl	mikrosomy

Pufr:	910 µl	0,1 M sodno-fosfátový pufr pH 7,4
Kofaktor:	50 µl	0,1 M roztok MgCl ₂
	10 µl	25 mM roztok NADPH ve fosfátovém pufru
<u>Standardní přídavek:</u>	10 µl	10 µM roztok 7-hydroxy-4-trifluormethylkumarinu v DMSO (HFC)

Postup:

Před měřením byly na spektrofluorimetru 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 180 s a míchání pomalé „low“. Před každým měřením byla nastavena základní linie „baseline“ na nulu.

Mikrosomy, substrát a NADPH byly před napipetováním do kyvety skladovány v ledové tříšti. Pufr byl temperován na teplotu 37°C.

Do kyvety Hellma o objemu 1 ml byl za stálého míchání napipetován pufr, MgCl₂, mikrosomy a substrát. Po ustálení směsi (50 s) byl do kyvety přidán NADPH pro spuštění reakce. Na přístroji byl sledován přírůstek fluorescence. Po 150 s bylo do kyvety připipetováno 10 µl HFC jako 1. standardní přídavek a po dalších 20 s opět 10 µl HFC jako 2. standardní přídavek. Před dalším měřením byl obsah kyvety odsán a kyveta byla propláchnuta destilovanou vodou. Pro každý vzorek byly provedeny 3 paralelní měření.

Po změření byla na obrazovce přístroje odečtena směrnice přímky nárůstu intenzity fluorescence a intenzita na začátku a na konci obou přídaveků HFC. Aktivita byla vypočtena podle vzorce :

$$a = \frac{k}{B - A} * n * D * 60 \quad [\text{pmol/ml/min}]$$

a aktivita

k směrnice

B – A přírůstek fluorescence do začátku do konce přídávku HFC
(počítán průměr ze šesti měření – 3 měření po 2 přídavecích)

n látkové množství standardního přídávku v 1 ml (100 pmol)

D zředění

60 přepočet na minuty

Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny ve vzorku a tím byla získána tzv. specifická aktivita enzymu [pmol/mg/min].

4.3.5. Stanovení aktivity CYP 2E1, částečně 1A1

Princip:

Metoda je založena na inkubaci mikrosomálních frakcí s chlorzoxazonem, následné extrakci a HPLC analýze metabolitu reakce – hydroxychlorzoxazonu (Peter 1990).

Reagencie:

Inkubační směs: celkový objem 300 μ l

Substrát:	6 μ l	50 mM roztok chlorzoxazonu v 60 mM KOH
Vzorek:	60 μ l	mikrosomy
Pufř:	60 μ l	0,1 M fosfátový pufř pH 7,4
Voda:	168 μ l	redestilovaná voda
Kofaktor:	6 μ l	100 mM roztok NADPH
<u>Stop roztok</u> :	150 μ l	90 μ M roztok 2-amino-5-chlorbenzoxazolu v methanolu
<u>Pro extrakci</u> :	1,8 ml	CH ₂ Cl ₂
	20 μ l	1,0 M fosfátový pufř pH 7,4

Mobilní fáze pro HPLC: 324 mmol/l fosfátový pufř pH 2,5 : voda : acetonitril = 10 :70:20

Postup:

Do označených mikrozkušavek byla napipetována uvedená množství pufřu, vody, chlorzoxazonu a mikrosomů. Tato směs byla inkubována 3 minuty při 37°C. Pak byl připipetován roztok NADPH, mikrozkušavky byly protřepány a v inkubaci bylo pokračováno 60 minut při stejné teplotě. Pro ukončení reakce byl přidán stop roztok a mikrozkušavky byly umístěny do ledu. Dále bylo přidáno 20 μ l 1,0 M fosfátového pufřu pH 7,4 a 1 ml CH₂Cl₂. Směs byla intenzivně protřepávána 2 minuty na třepačce. Pak byly mikrozkušavky centrifugovány 5 minut při 8000 ot./min. Následně bylo pipetou odebráno 800 μ l dolní vrstvy do připravené vialky. K vodné fázi bylo přidáno 800 μ l CH₂Cl₂ a extrakce byla zopakována. Spojené extrakty byly dány do koncentrátoru asi na 15 minut při 30°C. Suché vzorky byly uchovány v chladu a temnu. Poté byly podrobeny analýze na HPLC. Pro každý vzorek mikrosomů byly provedeny 3 paralelní měření.

HPLC analýza produktů biotransformace chlorzoxazonu byla provedena na chromatografické koloně Purospher RP18e o rozměrech 124 x 4 mm s předkolonou Hypersil BDS C18 4 x 4 mm. Mobilní fáze byla připravena smísením 324 mmol/l

fosfátového pufru pH 2,5, vody a acetonitrilu v poměru 10 : 70 : 20. Analýza byla provedena při teplotě 25°C, mobilní fáze protékala rychlostí 1,5 ml/min.

K předem připraveným odparkům látek bylo přidáno 100 µl methanolu, směs byla protřepána na vortexu po dobu 1 minuty a po 10 minutovém stání bylo přidáno 100 µl vody a znovu protřepáno. Rozpuštěný odparek byl přenesen do skleněného insertu a nastříkáváno bylo 50 µl. Detekce byla provedena při 287 nm.

Pro odečtení koncentrace hydroxychlorzoxazonu ve vzorcích bylo nutné připravit kalibrační vzorek. Obsahoval vše jako ostatní vzorky. Navíc ještě 30 µl hydroxychlorzoxazonu. Mikrozkušavka byla stále uložena v ledu a stop roztok byl přidán ihned po NADPH. Tzn. neproběhla žádná inkubace a ani reakce. Extrakce byla provedena shodně jako u ostatních vzorků. Při hodnocení chromatogramů byla odečtena plocha píku hydroxychlorzoxazonu a kalibračního vzorku. Podle jejich poměru byl vypočítán obsah hydroxychlorzoxazonu ve vzorku. Specifická aktivita byla pak vypočítána vztažením na minutu reakce a mg proteinů ve vzorku.

4.3.6. Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy (FMO)

Princip:

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-oxidu thiobenzamidu katalyzované flavinmonooxygenasou. Aktivita FMO se vyjádří pomocí vzrůstu absorbance za jednu minutu a molárního absorpčního koeficientu ϵ ($\epsilon = 8,300 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a následným vztažením na obsah bílkovin ve vzorku (Cashman a Hanzlik 1981).

Reagencie:

Reakční směs v kyvetě:

Substrát:	12,5 µl	98 mM roztok thiobenzamidu v acetonitrilu
Vzorek:	130 µl	mikrosomy
Pufř:	870 µl	0,1 M draselno-fosfátový pufř pH 8,0
Inhibitor CYP:	12,5 µl	0,42 M roztok n-oktylaminu a acetonitrilu
NADPH regenerační systém:	25 µl	složení regeneračního systému je uvedeno v následující tabulce (Tab. 3)

Tab. 3: Složení NADPH regeneračního systému

Složka NADPH regeneračního systému	Množství
Glukosa-6-fosfát	36 mg
NADP ⁺	12 mg
0,1 M fosfátový pufr pH 7,4	600 µl
0,1 M MgCl ₂	600 µl
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	30 µl

Postup:

Do kyvety bylo napipetováno 130 µl mikrosomů a doplněno pufrům do 1 ml (870 µl). Dále byl napipetován NADPH-regenerační systém a inhibitor. Kyveta se nechala chvíli temperovat. Pak bylo připipetováno 12,5 µl substrátu (u slepých vzorků 12,5 µl acetonitrilu). Směs byla protřepána a následně byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios β při 35°C.

Pro každý vzorek mikrosomů byly měřeny 3 paralelní vzorky. Příslušný slepý vzorek byl použit k vynulování přístroje před měřením. Hodnoty absorbance byly odečítány po jedné minutě po dobu 4 minut.

Pro výpočet aktivity byly vypočítány rozdíly absorbancí v jednotlivých minutách, byl určen průměr nárůstu absorbance za 1 minutu. Z této hodnoty byla vypočítána aktivita pomocí extinkčního koeficientu S-oxidu thiobenzamidu. Do výpočtu bylo dále zahrnuto zředění mikrosomů v reakční směsi a následně byla hodnota aktivity vztažena na 1 mg bílkovin a tím byla získána specifická aktivita FMO [nmol/min/mg].

4.3.7. Stanovení aktivity redukčních enzymů

Princip:

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP⁺ (nebo vzrůstu absorbance způsobeném přeměnou NADP⁺ na NADPH) ve vzorku. Měření probíhá při 340 nm za laboratorní teploty. Kvantitativní vyjádření aktivity reduktas je možné pomocí poklesu (vzrůstu) absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP⁺ $\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ohara a kol. 1995, Kawamura a kol. 1999, Palackal a kol. 2001, Maser a Oppermann 1997).

Reagencie: složení reakčních směsí v kyvetě se lišilo podle sledovaných reduktas:

Reduktasy 4-pyridinkarboxaldehydu:

Pufr:	970 µl	0,1 M draselno-fosfátový pufr pH 6,0
Substrát:	10 µl	0,1 M roztok 4-pyridinkarboxaldehydu v redest.vodě
Kofaktor:	10 µl	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek	10 µl	cytosol nebo mikrosomy (vzorky z jater byly 10 x zředěny)

Dehydrogenasy acenaftenolu:

Pufr:	930 µl	0,1 M TRIS-HCl pufr pH 8,9
Substrát:	10 µl	0,1 M roztok acenaftenolu v DMSO
Kofaktor:	10 µl	0,1 M roztok NADP ⁺ v redestilované vodě
Vzorek:	50 µl	cytosol

Reduktasy DL-glyceraldehydu:

Pufr:	930 µl	0,1 M draselno-fosfátový pufr pH 6,0
Substrát:	10 µl	1 M roztok DL-glyceraldehydu v DMSO
Kofaktor:	10 µl	30 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek:	50 µl	cytosol

Reduktasy daunorubicinu při pH 6,0:

Pufr:	930 µl	0,1 M draselno-fosfátový pufr pH 6,0
Substrát:	10 µl	1 mM roztok daunorubicinu v redestilované vodě
Kofaktor:	10 µl	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek:	50 µl	cytosol

Reduktasy daunorubicinu při pH 8,5:

Pufr:	930 µl	0,2 M TRIS-HCl pufr pH 8,5
Substrát:	10 µl	1 mM roztok daunorubicinu v redestilované vodě
Kofaktor:	10 µl	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek	50 µl	cytosol

Reduktasy ketoprofenu:

Pufr:	930 µl	0,1 M draselno-fosfátový pufr pH 6,0
Substrát:	10 µl	0,1 M roztok ketoprofenu v DMSO
Kofaktor:	10 µl	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek:	50 µl	cytosol

Reduktasy naloxonu:

Pufř:	930 μ l	0,1 M draselno-fosřátový pufř pH 6,0
Substrát:	10 μ l	0,1 M roztok naloxonu v redestilované vodě
Kofaktor:	10 μ l	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek	50 μ l	cytosol

Reduktasy metyraponu:

Pufř:	930 μ l	0,1 M draselno-fosřátový pufř pH 6,0
Substrát:	10 μ l	0,1 M roztok metyraponu v redestilované vodě
Kofaktor:	10 μ l	10 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek	50 μ l	cytosol nebo mikrosomy

Postup:

Měření bylo provedeno na spektrofotometru Helios β . Do kyvety byl vždy napipetován pufř, substrát a kofaktor podle jednotlivých určovaných reduktas. Směs byla promíchána. Na tento vzorek byl vynulován spektrofotometr. Reakce byla zahájena přidáním enzymu. Hodnoty absorbance při 340 nm byly odečítány v čase 0, v 1., 2., 3. a 4. minutě. Pro každý vzorek byla provedena 3 paralelní měření.

Enzymová aktivita [nmol/ml/min] byla spočítána pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$\Delta c = \Delta A / \epsilon d$$

Δc přírůstek koncentrace NADP⁺ nebo NADPH [mol/l]

ΔA změna absorbance

ϵ molární absorpční koeficient [l/mol/cm]

d délka optické dráhy [cm]

Hodnota Δc byla přepočítána na objem inkubační směsi a 1 minutu. Specifická aktivita byla získána vztahem enzymové aktivity na 1 mg proteinu ve vzorku [nmol/mg/min].

4.3.8. Stanovení aktivity reduktas oracinu

Princip:

Metoda je založena na inkubaci subcelulárních frakcí s oracinem, následné extrakci a HPLC analýze redukovaného metabolitu oracinu – 11-dihydrooracinu (Wsól a kol. 2000).

Reagencie:

Reakční směs:

Substrát:	100 µl	0,33 mM roztok oracinu v redestilované vodě
Kofaktor:	100 µl	1 mM roztok NADPH v redestilované vodě
Vzorek:	100 µl	mikrosomy nebo cytosol

Stop roztok: koncentrovaný amoniak

Roztok pro extrakci: destilovaný octan ethylnatý

Postup:

V mikrozkušavce bylo při 37°C po dobu 5 minut preinkubováno 100 µl roztoku oracinu a 100 µl roztoku NADPH. Pak bylo přidáno 100 µl mikrosomů resp. cytosolu (nebo pro slepé vzorky 0,1 M sodno-fosfátového pufru pH 7,4). Směs byla promíchána na třepačce. V inkubaci při 37°C bylo pokračováno dalších 30 minut. Inkubace byla ukončena ochlazením vzorků na 0°C v ledové lázni a přidáním 30 µl koncentrovaného amoniaku. Do zkumavky bylo přidáno 0,9 ml destilovaného octanu ethylnatého. Směs byla po dobu 2 minut intenzivně třepána na třepačce. Pak byly mikrozkušavky centrifugovány 3 minuty při 5000 ot./min. Následně byla pipetou odebrána horní vrstva do připravené vialky. Extrakty pak byly dány do koncentrátoru asi na 15 minut při 45°C. Suché vzorky byly uchovány v chladu a temnu. Poté byly podrobeny analýze na HPLC. Pro každý vzorek mikrosomů nebo cytosolu byla vytvořena 3 paralelní měření.

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 byla připravena smísením acetonitrilu a hexansulfonanového pufru v poměru 1:3. Hodnota pH 10 mM hexansulfonanového pufru s obsahem 0,1 M triethylaminu byla upravena kyselinou fosforečnou na 3,27.

Analýza byla provedena při teplotě 25 °C, pod tlakem 200 bar, mobilní fáze protékala rychlostí 1,5 ml/min.

Předem připravené odparky látek byly rozpuštěny v 250 µl mobilní fáze, k nástřiku na chromatografickou kolonu bylo použito 100 µl tohoto roztoku. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru Agilent 1100 Series (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 DHO ve vzorku. Naměřené množství bylo přepočítáno na látkové množství v inkubační směsi a byla zohledněna doba inkubace 30 minut. Hodnota aktivity byla dále vztažena na 1 mg bílkoviny a tím byla vypočítána specifická aktivita enzymu [nmol/mg/min].

4.3.9. Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Princip:

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu za použití 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a glutathionu (Habig a Jacoby 1981).

Reagencie:

Reakční směs:

Substrát:	10 µl	0,1 M roztok 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) v ethanolu
Vzorek:	10 µl	cytosol
Konjugační činidlo:	10 µl	0,1 M roztok redukovaného glutathionu (GSH) v redestilované vodě
Pufr:	970 µl	0,1 M fosfátový pufr pH 6,5

Postup:

Do UV-VIS transparentní kyvety byl napipetován fosfátový pufr, GSH a cytosol. Obsah byl protřepán na třepačce a jako aktivátor reakce byl přidán CDNB. Vše bylo důkladně protřepáno a ihned byl měřen nárůst absorbance při 340 nm na UV-VIS spektrofotometru HELIOS β.

Pro každý vzorek cytosolu bylo měřeno 5 paralelních vzorků. Vzorky z jater musely být 5x naředěny, protože absorbance přesahovala hodnotu 0,800 (nárůst absorbance již

nebyl lineární). Dále byly měřeny vždy 2 slepé vzorky bez cytosolu. Při měření byla sledována linearita měření a byla odčítána hodnota absorbance v minutě 0, 1, 2, 3.

Pro výpočet aktivity enzymu byly výsledné hodnoty absorbance v každé minutě zprůměrovány a byly od nich odečteny odpovídající hodnoty slepých vzorků. Pak byl použit rozdíl absorbancí naměřených v 3. a 1. minutě. Pro nárůst absorbance za 1 minutu byl výsledek vydělen 2. Dále byla absorbance pomocí extinkčního koeficientu S-2,4-dinitrofenylglutathionu $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ přepočítána na koncentraci produktu v reakční směsi. Pro získání specifické aktivity [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$] bylo nutné koncentraci přepočítat na látkové množství, vynásobit zředěním u jaterních vzorků a vztáhnout výsledek na 1 mg bílkovin ve vzorku.

4.3.10. Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)

Princip:

UGT katalyzuje reakci přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid. Tuto přeměnu lze kvantitativně stanovit spektrofotometricky (Mizuma a kol. 1982).

Reagencie:

Reakční směs:

Substrát:	30 μl	0,556 mM roztok p-nitrofenolu v redest.vodě
Vzorek:	10 μl	mikrosomy s detergentem (Slovasol)
Konjugační činidlo:	30 μl	UDP-glukuronová kyselina (1,05 g v 1,5 ml redestilované vody)
Puf:	30 μl	Tris puf pH 7,4

Stop roztok: 3% (w/v) kyselina trichloroctová

Neutralizační roztok: 1M roztok NaOH

Postup:

Pro měření byly použity vzorky mikrosomů. Ze známých hodnot koncentrace bílkovin bylo vypočteno množství detergentu, tak aby poměr proteiny:detergent (w/w) byl 2:1. Vypočítané množství detergentu bylo přidáno ke 100 μl mikrosomů a tato směs byla inkubována 20 min při 4°C.

Do mikrozkušavek uložených v ledové lázni byl napipetován Tris puf, p-nitrofenol a kyselina UDP-glukuronová. Reakce byla zahájena přidáním 10 μl směsi mikrosomů

s detergentem. Směs byla inkubována 20 min při 37°C. Reakce byla ukončena přenesením zkumavek do ledové lázně a přidáním 50 µl stop roztoku- TCA. Poté byl deproteinizovaný roztok centrifugován 3 min při 5 000 ot./min. 50 µl supernatantu bylo přidáno do jamek mikrodestičky k již připraveným 50 µl NaOH. Po zabarvení byla na čtečce BioRad změřena absorbance nezreagovaného p-nitrofenolu. Pro každý vzorek mikrosomů bylo připraveno 5 paralelních měření a 3 paralelní měření slepých vzorků.

Kvůli výpočtu aktivity bylo nutné stanovit absorbanci 100% p-nitrofenolu. K tomuto účelu bylo do mikrozkušavky napipetováno 30 µl p-nitrofenolu, 30 µl Tris pufru, 40 µl vody a 50 µl TCA. Směs byla promíchána a bylo odebráno 50 µl do mikrodestičky s již připravenými 50 µl NaOH. Byla změřena absorbance a ta byla považována za 100%. Aktivita UGT byla počítána jako úbytek substrátu. Výsledek byl přepočítán na jednu minutu reakce a na mg bílkovin v reakční směsi.

4.3.11. Statistické zpracování výsledků

Veškeré naměřené výsledky byly mezi sebou porovnávány z hlediska statistické významnosti rozdílů mezi jednotlivými skupinami (A, B, D) a mezi pohlavími (samci, samice). K tomuto statistickému zhodnocení byl použit Studentův nepárový T-test. Hladina spolehlivosti byla nastavena na 0,95.

5. VÝSLEDKY

5.1. Stanovení koncentrace bílkovin

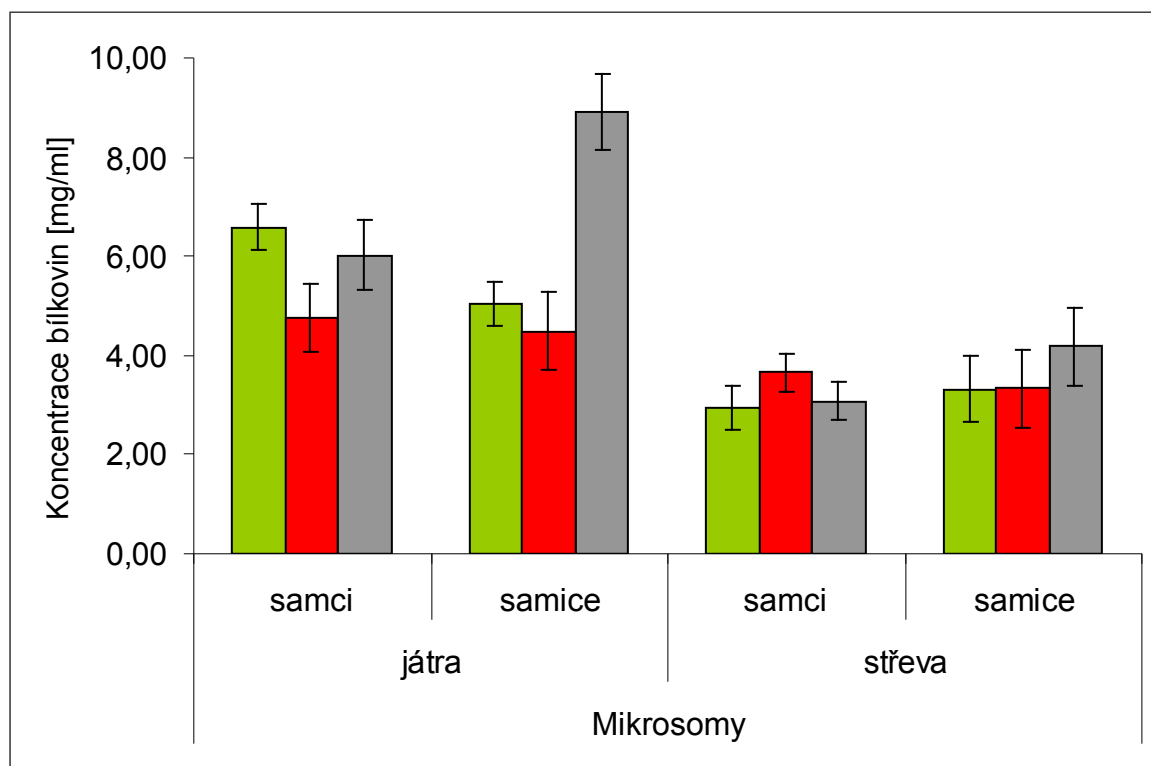
Koncentrace bílkovin ve vzorcích byla stanovena pomocí metody BCA (viz kapitola 4.3.2). Nejprve byla sestavena kalibrační křivka o šesti bodech. Pro každý bod křivky bylo provedeno osm paralelních měření. Následně byly změřeny absorbance vzorků mikrosomů nebo cytosolu a hodnoty koncentrace bílkovin byly odečteny z kalibrační křivky. Průměrné hodnoty a příslušné směrodatné odchylky zjištěných koncentrací bílkovin v jednotlivých vzorcích mikrosomálních a cytosolických frakcí jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 4 a Tab. 5), grafické znázornění je pak uvedeno na následujících obrázcích (Obr. 21 a Obr. 22).

Tab. 4: Koncentrace bílkovin ve vzorcích mikrosomů (rovnice kalibrační křivky: $y = 0,0006x + 0,0075$)

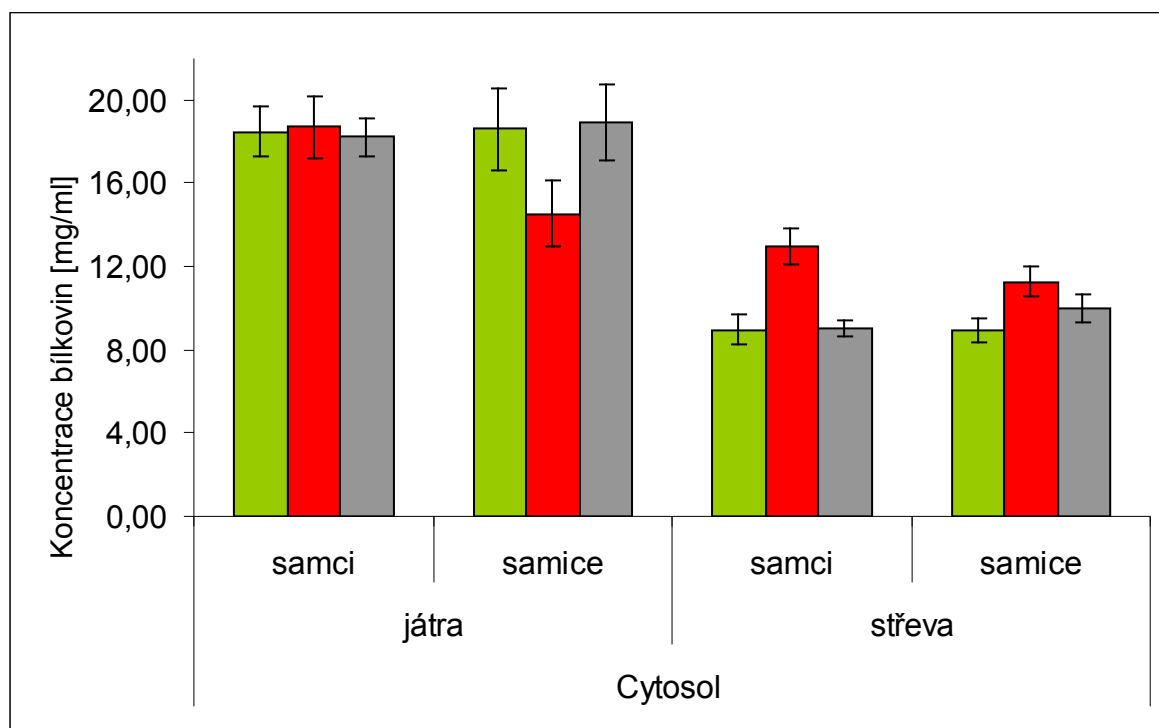
Mikrosomy		Koncentrace bílkovin [mg/ml]		
		A	B	D
játra	samci	6,59 ± 0,45	4,76 ± 0,67	6,02 ± 0,69
	samice	5,03 ± 0,44	4,49 ± 0,34	8,91 ± 0,78
střeva	samci	2,94 ± 0,44	3,65 ± 1,13	3,08 ± 0,40
	samice	3,33 ± 0,66	3,34 ± 0,59	4,18 ± 0,78

Tab. 5: Koncentrace bílkovin ve vzorcích cytosolu (rovnice kalibrační křivky: $y = 0,0006x + 0,0075$)

Cytosol		Koncentrace bílkovin [mg/ml]		
		A	B	D
játra	samci	18,47 ± 1,22	18,71 ± 1,48	18,22 ± 0,92
	samice	18,61 ± 1,98	14,53 ± 1,58	18,93 ± 1,84
střeva	samci	8,95 ± 0,71	12,98 ± 0,86	9,04 ± 0,40
	samice	8,93 ± 0,57	11,27 ± 0,71	9,98 ± 0,64



Obr. 21: Grafické porovnání koncentrací bílkovin u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.



Obr. 22: Grafické porovnání koncentrací bílkovin u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Koncentrace bílkovin v mikrosomálních vzorcích získaných ze střeva ovcí byla zhruba poloviční než ve vzorcích získaných z jater. Jaterní mikrosomální frakce dosahovaly hodnot od 4,49 do 8,91 mg/ml. Střevní frakce obsahovaly od 2,94 do 4,18 mg proteinů na ml vzorku. Nejvíce bílkovin obsahovaly frakce získané z jater samic skupiny D.

U cytosolu byl opět vidět rozdíl mezi jaterními a střevními vzorky. Hodnoty koncentrací u jaterních vzorků byly velmi podobné kolem 18 mg/ml. Obsah bílkovin u střev se pohyboval od 8,93 mg/ml do 12,98 mg/ml.

Mezi koncentracemi bílkovin v mikrosomálních a cytosolických frakcích byl pozorován zhruba trojnásobný rozdíl. A to jak u vzorků z jater, tak ze střev.

5.2. Stanovení aktivity CYP 1A1, 1A2, 2B, 3A

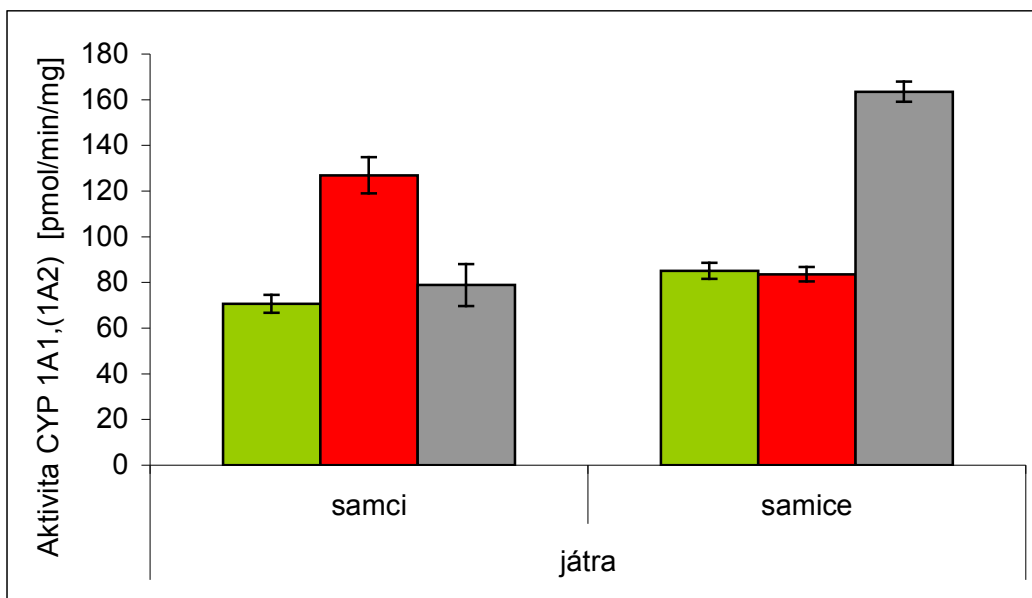
Aktivita cytochromů byla změřena pomocí metody měření přírůstku produktu, který vykazuje fluorescenci. Pro jednotlivé isoformy byly použity relativně specifické substráty (viz kapitola 4.3.3)

5.2.1. Stanovení aktivity CYP 1A1, částečně 1A2

Ke stanovení aktivity isoformy CYP 1A1 a částečně isoformy CYP 1A2 byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídatkem resorufinu. Jako specifický substrát byl použit ethoxyresorufin. V následující tabulce (Tab. 6) a na obrázku (Obr. 23) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity CYP 1A1 a částečně 1A2 z jaterních vzorků. Aktivita CYP 1A1 a částečně 1A2 ve vzorcích ze střev nebyla detekována.

Tab. 6: Aktivity CYP 1A1 a částečně 1A2

		Aktivita CYP 1A1,(1A2) [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	70,63 ± 3,88	126,92 ± 7,90	78,86 ± 9,16
	samice	85,08 ± 3,52	83,61 ± 3,18	163,49 ± 4,41



Obr. 23: Grafické porovnání aktivity CYP 1A1 a částečně CYP 1A2 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

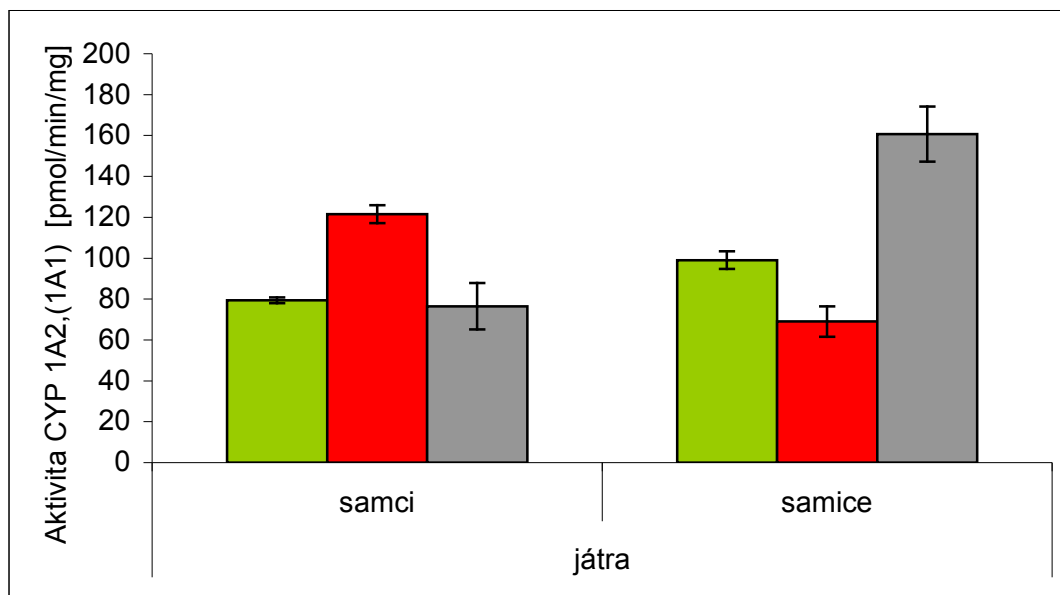
Specifická aktivita CYP 1A1 a částečně CYP 1A2 v mikrosomálních frakcích jaterních vzorků u samců skupiny A a D dosahovala hodnoty 70,63 a 78,86 pmol/min/mg. Statisticky významně se lišili samci skupiny B s aktivitou enzymu 126,92 pmol/min/mg. Mezi samicemi se naopak statisticky významně lišila skupina samic D (163,49 pmol/min/mg) od samic skupin A a B (85,08 a 83,61 pmol/min/mg).

5.2.2. Stanovení aktivity CYP 1A2, částečně 1A1

Ke stanovení aktivity isoformy CYP 1A2 a částečně isoformy CYP 1A1 byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídatkem resorufinu. Jako specifický substrát byl použit methoxyresorufin. V následující tabulce (Tab. 7) a na obrázku (Obr. 24) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity CYP 1A2 a částečně 1A1 z jaterních vzorků. Aktivita CYP 1A2 a částečně 1A1 ve vzorcích ze střev nebyla detekována.

Tab. 7: Aktivity CYP 1A1 a částečně 1A2

		Aktivita CYP 1A2,(1A1) [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	79,45 ± 1,44	121,52 ± 4,38	76,50 ± 11,41
	samice	99,06 ± 4,34	68,99 ± 7,48	160,69 ± 13,48



Obr. 24: Grafické porovnání aktivity CYP 1A2 a částečně CYP 1A1 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

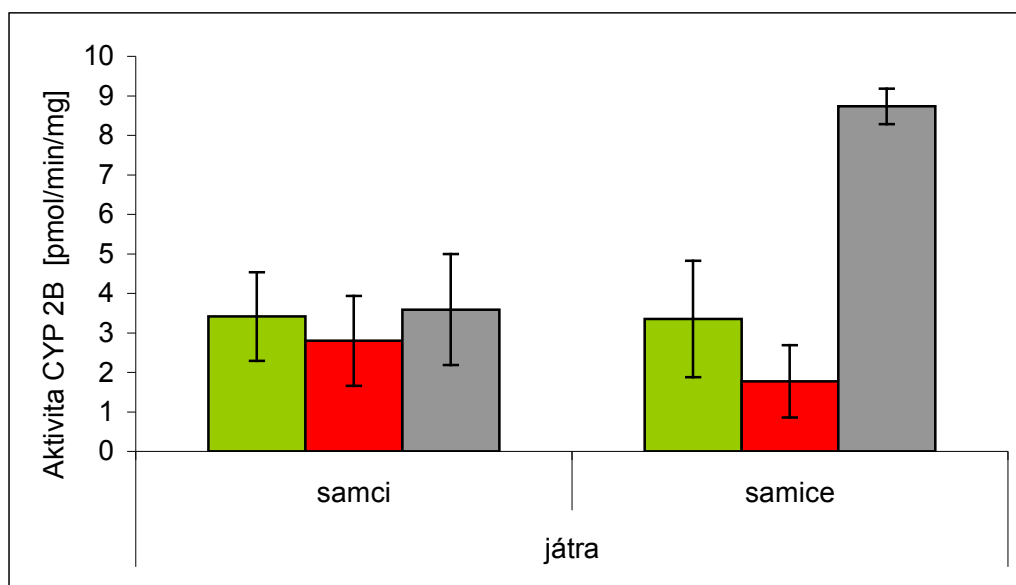
Specifická aktivita CYP 1A2 a částečně CYP 1A1 v mikrosomálních frakcích ze vzorků jater samců skupiny A je 79,45 pmol/min/mg a samců skupiny D je 76,50 pmol/min/mg. Samci skupiny B vykazovali statisticky významně vyšší aktivitu a to 121,52 pmol/min/mg. Naopak samice skupiny B vykazovaly nižší aktivitu enzymu (68,99 pmol/min/mg) oproti samicím skupiny A i D (99,06 a 160,69 pmol/min/mg).

5.2.3. Stanovení aktivity CYP 2B

Ke stanovení aktivity isoformy CYP 2B byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídatkem resorufinu. Jako specifický substrát byl použit pentoxyresorufin. V následující tabulce (Tab. 8) a na obrázku (Obr. 25) jsou zobrazeny naměřené aktivity CYP 2B z jaterních vzorků. Aktivita CYP 2B ve vzorcích ze střev nebyla detekována.

Tab. 8: Aktivity CYP 2B.

		Aktivita CYP 2B [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	3,41 ± 1,12	2,80 ± 1,14	3,59 ± 1,41
	samice	3,35 ± 1,47	1,78 ± 0,92	8,73 ± 0,45



Obr. 25: Grafické porovnání aktivity CYP 2B u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

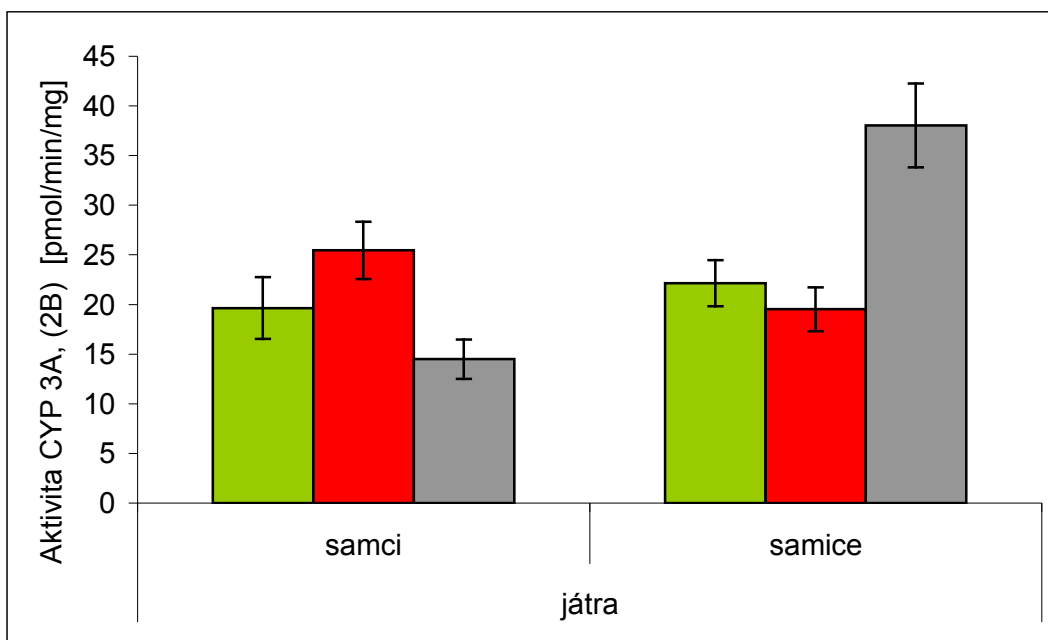
Hodnoty specifických aktivit CYP 2B se pohybovaly kolem 3 pmol/min/mg. Jediná statisticky významná odlišná hodnota byla zaznamenána u samic skupiny D (8,73 pmol/min/mg). Z výsledků lze tedy vyvozovat, že podávání léčiva neovlivňuje aktivitu tohoto enzymu. Odchylna samic může být způsobena přítomností parazita v organismu ovce.

5.2.4. Stanovení aktivity CYP 3A, částečně 2B

Ke stanovení aktivity isoformy CYP 3A a částečně 2B byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídatkem resorufinu. Jako specifický substrát byl použit benzyloxyresorufin. V následující tabulce (Tab. 9) a na obrázku (Obr. 26) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity CYP 3A a částečně 2B z jaterních vzorků. Aktivita enzymů ve vzorcích ze střev nebyla detekována.

Tab. 9: Aktivity CYP 3A a částečně CYP 2B.

		Aktivita CYP 3A, (2B) [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	19,63 ± 3,11	25,45 ± 2,88	14,49 ± 1,99
	samice	22,14 ± 2,33	19,53 ± 2,21	38,04 ± 4,21



Obr. 26: Grafické porovnání aktivity CYP 3A a částečně CYP 2B u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

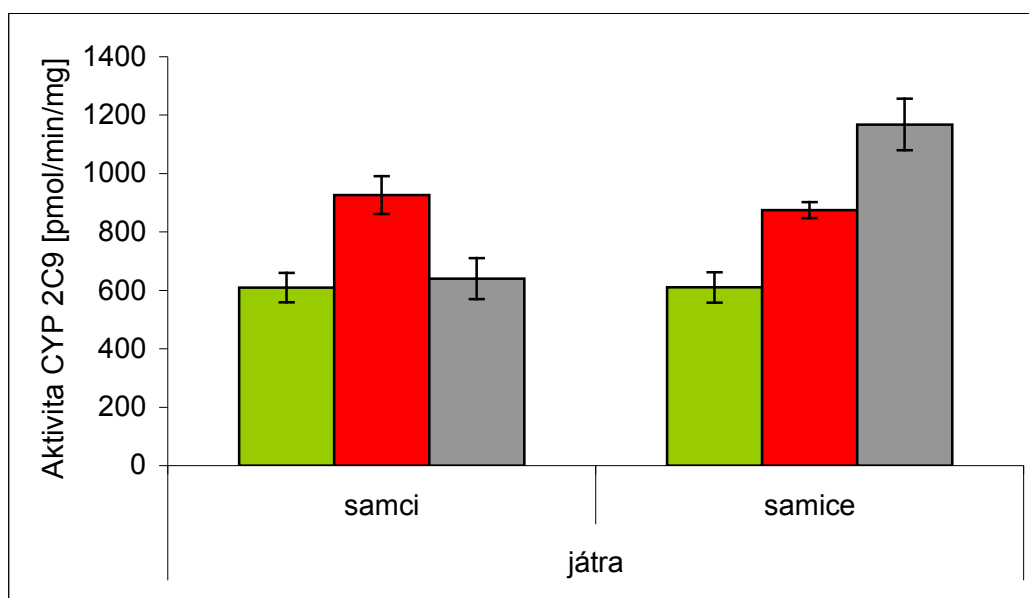
Specifické aktivity CYP 3A a částečně 2B u samců i samic skupin ovcí A i B se statisticky významně neliší. Pohybují se v rozmezí od 19,53 do 25,45 pmol/min/mg. Z toho rozmezí vybočuje skupina D, u které je specifická aktivita enzymů u samců nižší a u samic vyšší než uvedené rozmezí. Podávání flubendazolu tedy podle výsledků nemá vliv na biotransformační aktivitu CYP 3A a částečně 2B. Rozdíl v aktivitě enzymů je patrný mezi pohlavími u ovcí skupiny D.

5.3. Stanovení aktivity CYP 2C9

Ke stanovení aktivity cytochromu CYP 2C9 byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídatkem HFC (viz kapitola 4.3.4). V následující tabulce (Tab. 10) a na obrázku (Obr. 27) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity CYP 2C9 z jaterních vzorků. Aktivita CYP 2C9 ve vzorcích ze střev nebyla detekována.

Tab. 10: Aktivity CYP 2C9.

		Aktivita CYP 2C9 [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	609,43 ± 50,24	926,60 ± 64,72	640,32 ± 70,16
	samice	610,18 ± 52,07	875,16 ± 27,52	1168,05 ± 88,55



Obr. 27: Grafické porovnání aktivity CYP 2C9 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

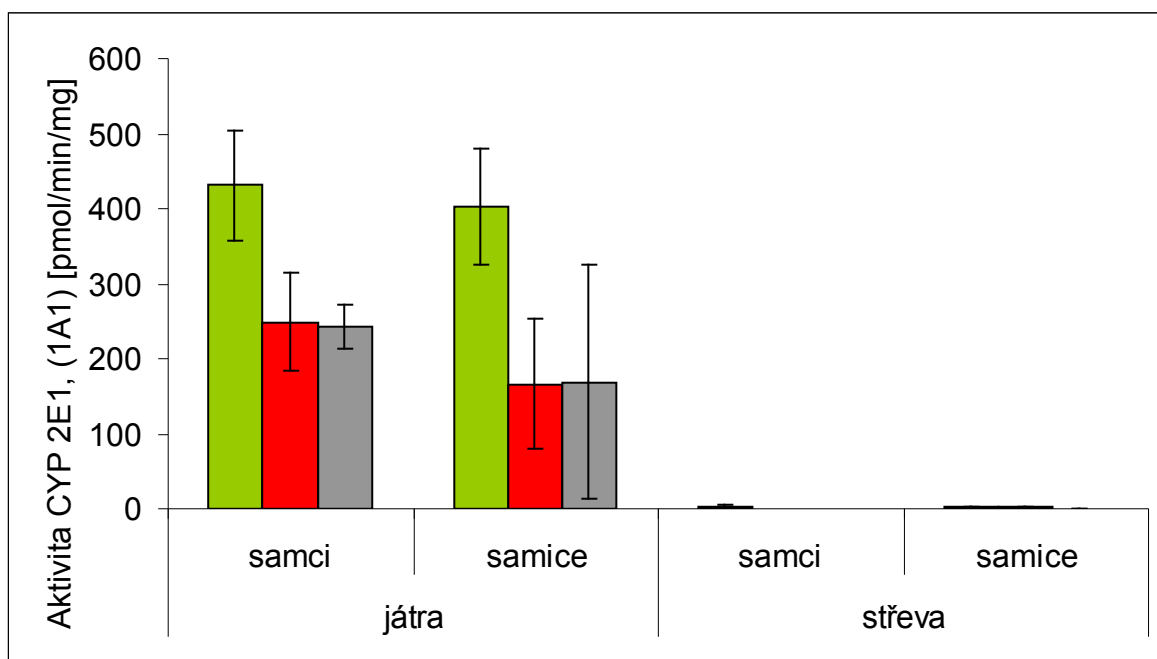
Z číselného i grafického vyjádření specifických aktivit CYP 2C9 je viditelné zvýšení aktivit u samců i u samic skupin B (926,60 a 875,16 pmol/min/mg) a u samic skupiny D (1168,05 pmol/min/mg) oproti skupině kontrolní (609,43 a 610,18 pmol/min/mg). Aktivita enzymu samců skupiny D se od kontrolní skupiny statisticky významně nelišila. Lze tedy usuzovat, že podání flubendazolu ovcím indukuje aktivitu CYP 2C9.

5.4. Stanovení aktivity CYP 2E1, částečně 1A1

Pro zjištění aktivity cytochromu P450 2E1, částečně 1A1 byla použita metoda HPLC analýzy metabolitů reakce enzymu s chlorzoxazonem (viz kapitola 4.3.5). V následující tabulce (Tab. 11) a na obrázku (Obr. 28) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity CYP 2E1, částečně 1A1.

Tab. 11: Aktivity CYP 2E1 a částečně 1A1

		Aktivita CYP 2E1, částečně 1A1 [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	431,21 ± 72,74	249,10 ± 66,19	241,69 ± 29,36
	samice	402,99 ± 77,88	166,63 ± 85,53	169,02 ± 155,19
střevo	samci	3,57 ± 2,22	0	0
	samice	2,40 ± 1,45	1,49 ± 0,93	0,72 ± 0,51



Obr. 28: Grafické porovnání aktivity CYP 2E1, částečně 1A1 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

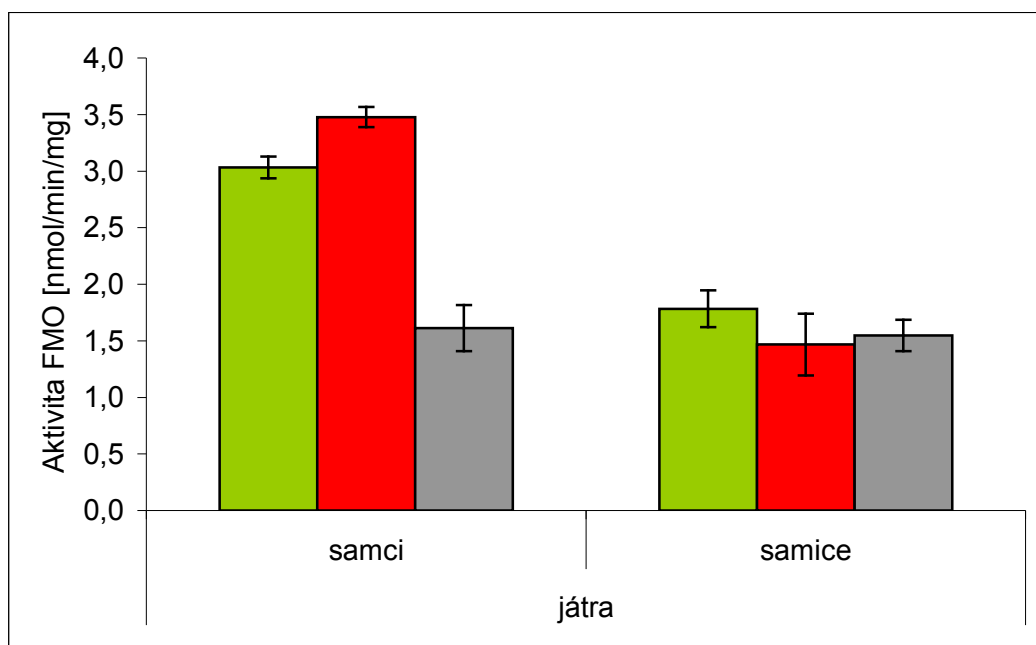
Dle grafického znázornění i výsledků v tabulce vyplývá, že nejvyšší specifická aktivita CYP 2E1 a částečně 1A1 z jaterních vzorků byla naměřena u kontrolní skupiny ovcí A (samci 431,21 a samice 402,99 pmol/min/mg). Výsledky u skupiny B i D jsou statisticky významně nižší. Aktivita enzymu získaného ze střev byla také nejvyšší u skupiny A (3,57 a samice 2,40 pmol/min/mg). U samců skupiny B a D nebyly dokonce detekovány žádné aktivity enzymu a u samic byly hodnoty nižší než u skupiny A. Aplikace flubendazolu má tedy za následek snížení aktivity tohoto cytochromu a to u obou pohlaví i u zvířat zdravých i nemocných.

5.5. Stanovení aktivity flavinmonooxygenasy (FMO)

Ke stanovení aktivity FMO byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-oxidu thiobenamidu (viz kapitola 4.3.6). V následující tabulce (Tab. 12) a na obrázku (Obr. 29) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity FMO z jaterních vzorků. Ve vzorcích ze střev nebyla detekována žádná aktivita FMO.

Tab. 12: Aktivita FMO

		Aktivita FMO [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	3,032 ± 0,096	3,478 ± 0,089	1,612 ± 0,204
	samice	1,783 ± 0,162	1,467 ± 0,274	1,547 ± 0,138



Obr. 29: Grafické porovnání aktivity FMO u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Nejvyšší aktivita byla naměřena u samců ze skupiny B 3,478 nmol/min/mg. Aktivita FMO samců skupiny A byla 3,032 nmol/min/mg. Výrazně nižší aktivitu vykazovala FMO samců skupiny D 1,612 nmol/min/mg. Aktivity FMO samic ze všech skupin se statisticky nelišily, pohybovaly se v rozmezí od 1,467 nmol/min/mg do 1,783 nmol/min/mg. Z hodnot naměřených specifických aktivit FMO tedy vyplývá, že podání flubendazolu u samců aktivitu enzymu zvyšuje a parazitóza snižuje. U samic podání flubendazolu nemá za následek výrazné ovlivnění aktivity enzymu. Statisticky významný je pak i rozdíl v aktivitách FMO u samců a samic. Zdá se, že samice mají aktivitu FMO nižší (u skupin ovcí A a B zhruba o polovinu).

5.6. Stanovení aktivity redukčních enzymů

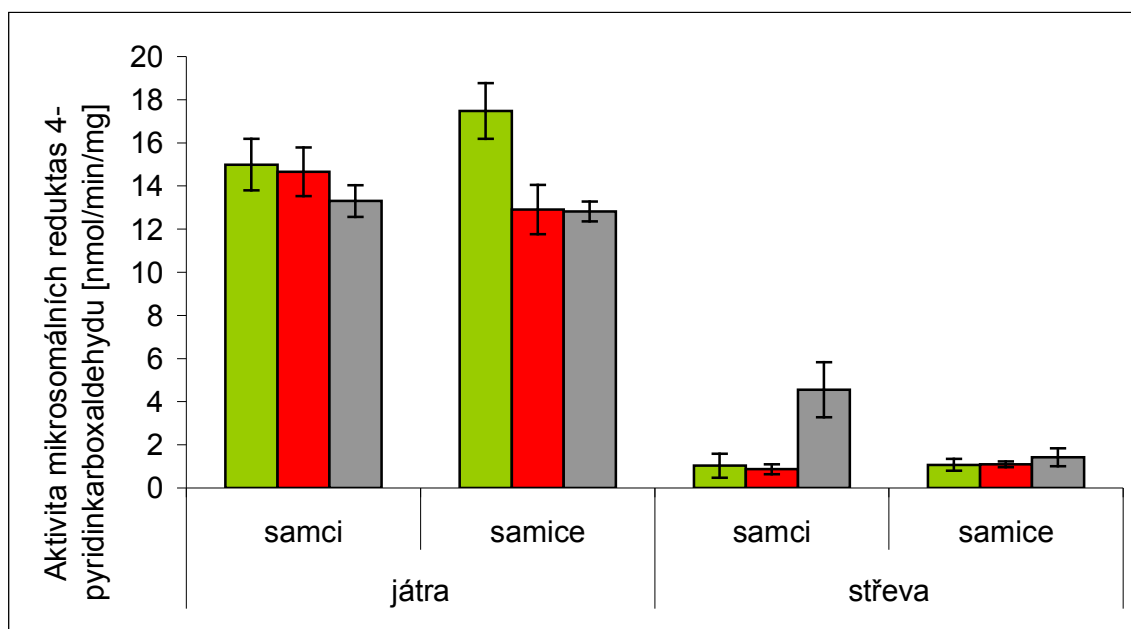
Aktivity redukčních enzymů byly stanoveny na základě proměření změny absorbance ve vzorku způsobeném vzájemnou přeměnou NADPH a NADP⁺ (viz kapitola 4.3.7).

5.6.1. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu

V mikrosomální frakci je 4-pyridinkarboxaldehyd redukován 3 α -HSD. V následující tabulce (Tab. 13) a na obrázku (Obr. 30) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity mikrosomálních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 13: Aktivity mikrosomálních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu

Mikrosomy		Aktivita reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	14,989 \pm 1,195	14,656 \pm 1,130	13,301 \pm 0,736
	samice	17,480 \pm 1,288	12,910 \pm 1,142	12,821 \pm 0,463
střevo	samci	1,032 \pm 0,551	0,869 \pm 0,234	4,555 \pm 1,275
	samice	1,071 \pm 0,273	1,096 \pm 0,138	1,425 \pm 0,421



Obr. 30: Grafické porovnání aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

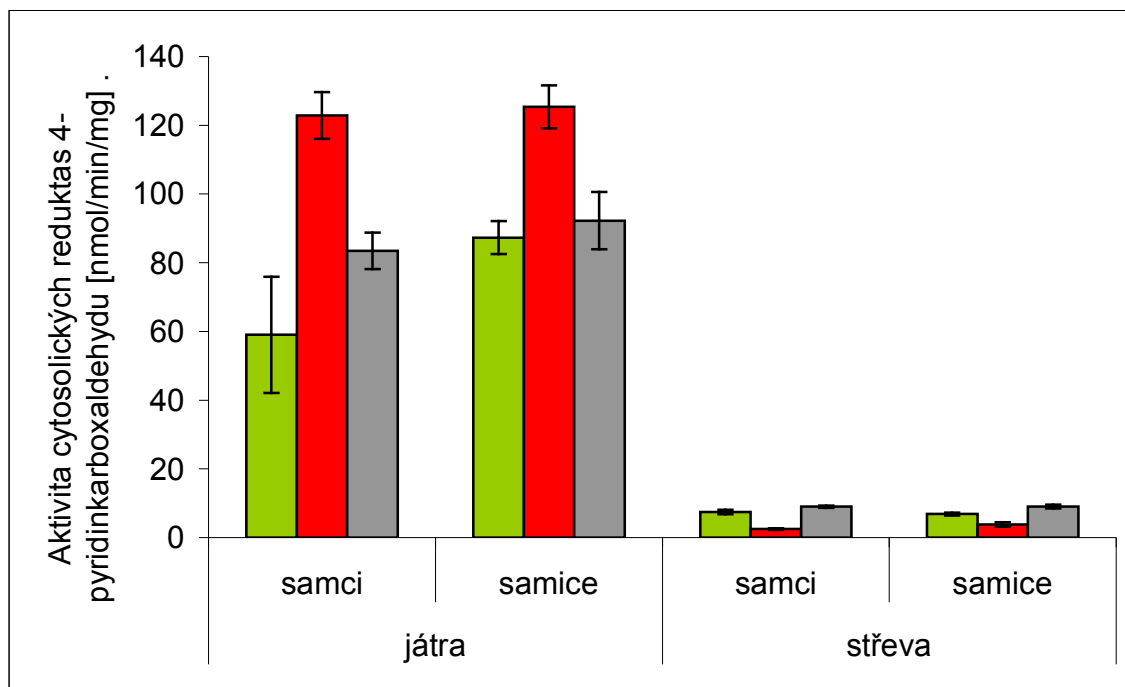
Hodnoty specifické aktivity mikrosomálních reductas 4-pyridinkarboxaldehydu se statisticky významně neliší s výjimkou samic skupiny A, kde aktivita dosahovala hodnoty 17,480 nmol/min/mg. V ostatních případech to bylo v rozmezí od 12,821 do 14,989 nmol/min/mg. Ve střevních vzorcích statisticky vybočovala také jen jedna hodnota a to samci skupiny D (4,555 nmol/min/mg). Ostatní aktivity se pohybovaly v rozmezí od 0,869 do 1,425 nmol/min/mg. Oproti kontrolní skupině tedy vykazuje 3 α -HSD získaná z jater inhibici u samic skupiny B a D a 3 α -HSD získaná ze střev indukci u samců skupiny D.

5.6.2. Stanovení aktivity cytosolických reductas 4-pyridinkarboxaldehydu

V cytosolické frakci je 4-pyridinkarboxaldehyd redukován aldehydreduktasou AKR 1A1. V dalších metabolických přeměnách mohou hrát roli i AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4. V následující tabulce (Tab. 14) a na obrázku (Obr. 31) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity cytosolických reductas 4-pyridinkarboxaldehydu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 14: Aktivity cytosolických reductas 4-pyridinkarboxaldehydu

Cytosol		Aktivita reductas 4-pyridinkarboxaldehydu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	59,028 \pm 16,924	122,864 \pm 6,823	83,444 \pm 5,328
	samice	87,307 \pm 4,789	125,385 \pm 6,233	92,254 \pm 8,301
střevo	samci	7,463 \pm 0,663	2,507 \pm 0,234	9,001 \pm 0,318
	samice	6,876 \pm 0,402	3,834 \pm 0,641	9,045 \pm 0,532



Obr. 31: Grafické porovnání aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

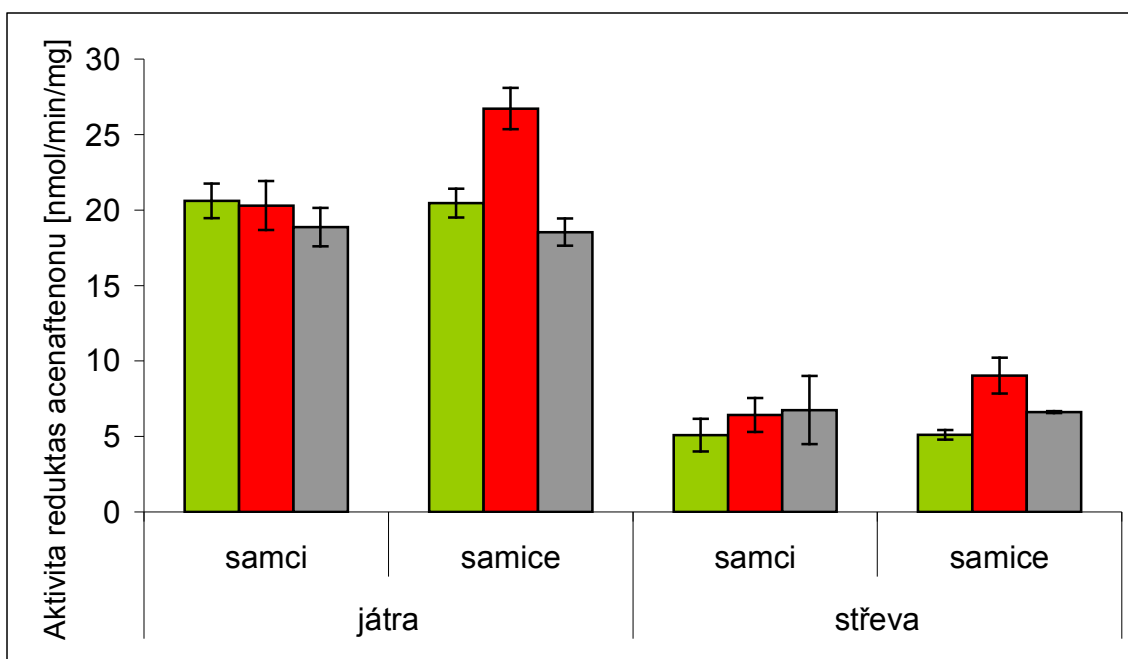
Specifické aktivity samců a samic skupin A a D z jaterních vzorků se statisticky významně nelišily. Pohybovaly se v rozmezí hodnot od 59,028 do 92,254 nmol/min/mg. Hodnoty specifické aktivity samců i samic skupiny B z jaterních vzorků byly shodně kolem 125 nmol/min/mg. Lze tedy vypořádat, že jak u samců, tak u samic došlo po podání flubendazolu ke zvýšení enzymové aktivity cytosolických reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v játrech. Naopak ve střevech je zřejmé, že po podání flubendazolu došlo ke snížení aktivity tohoto enzymu. Hodnoty specifické aktivity reduktasy se u skupin A a D pohybovaly od 6,876 do 9,001 nmol/min/mg, kdežto u skupiny B kolem 3 nmol/min/mg.

5.6.3. Stanovení aktivity reduktas acenaftenonu

Při stanovení aktivit reduktas acenaftenonu byl měřen přírůstek absorbance ve vzorku způsobený přeměnou NADP^+ na NADPH při oxidaci acenaftenolu na acenaftenon katalyzované cytosolickými aldoketoreduktasami AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C3, AKR 1C4. V následující tabulce (Tab. 15) a na obrázku (Obr. 32) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reduktas acenaftenonu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 15: Aktivity reduktas acenaftenonu

		Aktivita reduktas acenaftenonu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	20,604 ± 1,151	20,295 ± 1,627	18,869 ± 1,282
	samice	20,462 ± 0,953	26,716 ± 1,368	18,535 ± 0,902
střeva	samci	5,092 ± 1,075	6,420 ± 1,124	6,743 ± 2,258
	samice	5,120 ± 0,318	9,036 ± 1,188	6,621 ± 0,065



Obr. 32: Grafické porovnání aktivity reduktas acenaftenonu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

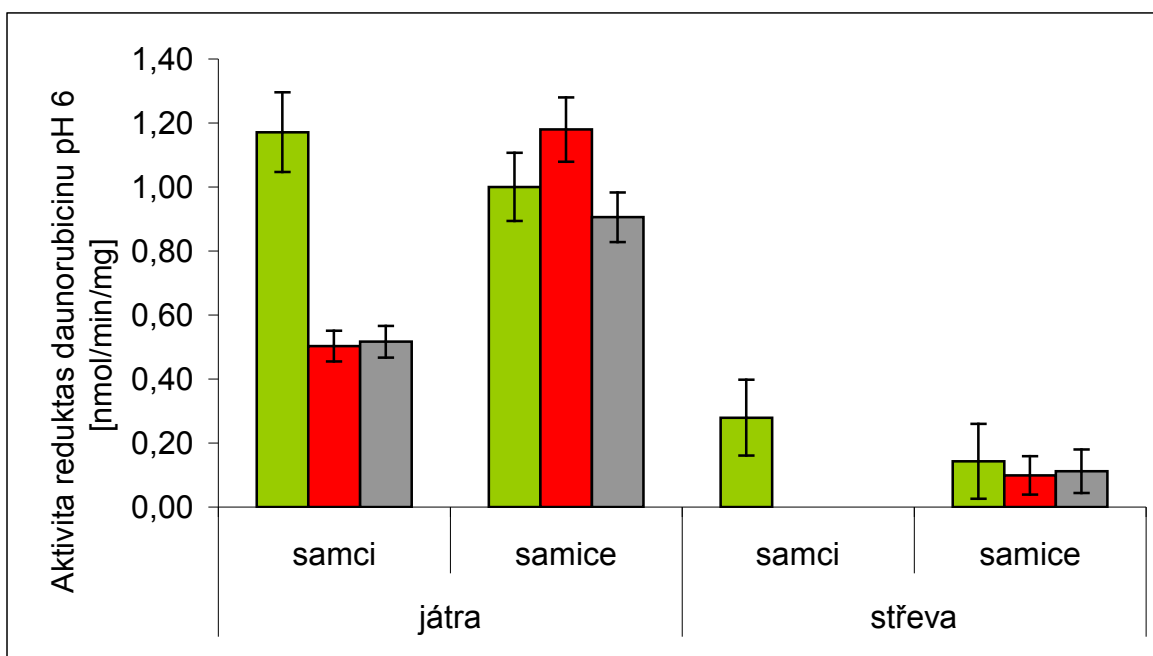
Specifická aktivita reduktas acenaftenonu v játrech u samic skupiny B je statisticky významně vyšší - 26,716 nmol/min/mg. Ostatní jaterní vzorky se v aktivitě tohoto enzymu statisticky významně neliší a dosahují hodnot od 18,535 do 20,604 nmol/min/mg. Ve střevních vzorcích se od ostatních statisticky významně odlišují také samice skupiny B s hodnotou aktivity 9,036 nmol/min/mg. Ostatní jaterní vzorky nabývají hodnot aktivity od 5,092 do 6,743 nmol/min/mg. Lze tedy usoudit, že podání flubendazolu zdravým zvířatům způsobuje indukci reduktas acenaftenonu a to pouze u samic.

5.6.4. Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0

Při pH 6,0 má nejvyšší aktivitu při redukci daunorubicinu v cytosolu buněk AKR 1C2 a karbonylreduktasa. V následující tabulce (Tab. 16) a na obrázku (Obr. 33) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0 z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 16: Aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0

		Aktivita reduktas daunorubicinu pH 6 [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	1,171 ± 0,125	0,503 ± 0,048	0,517 ± 0,050
	samice	1,000 ± 0,106	1,180 ± 0,101	0,906 ± 0,077
střeva	samci	0,279 ± 0,119	0	0
	samice	0,143 ± 0,117	0,099 ± 0,060	0,112 ± 0,068



Obr. 33: Grafické porovnání aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Statisticky významný pokles aktivity reduktas daunorubicinu při pH 6,0 ve vzorcích z jater samců je vidět u samců skupiny B a D (0,503 a 0,517 nmol/min/mg) proti kontrolní skupině (1,171 nmol/min/mg). Samice vykazují všechny podobnou aktivitu a to kolem 1,000 nmol/min/mg. Stejný trend lze pozorovat i u vzorků získaných ze střev. Aktivita

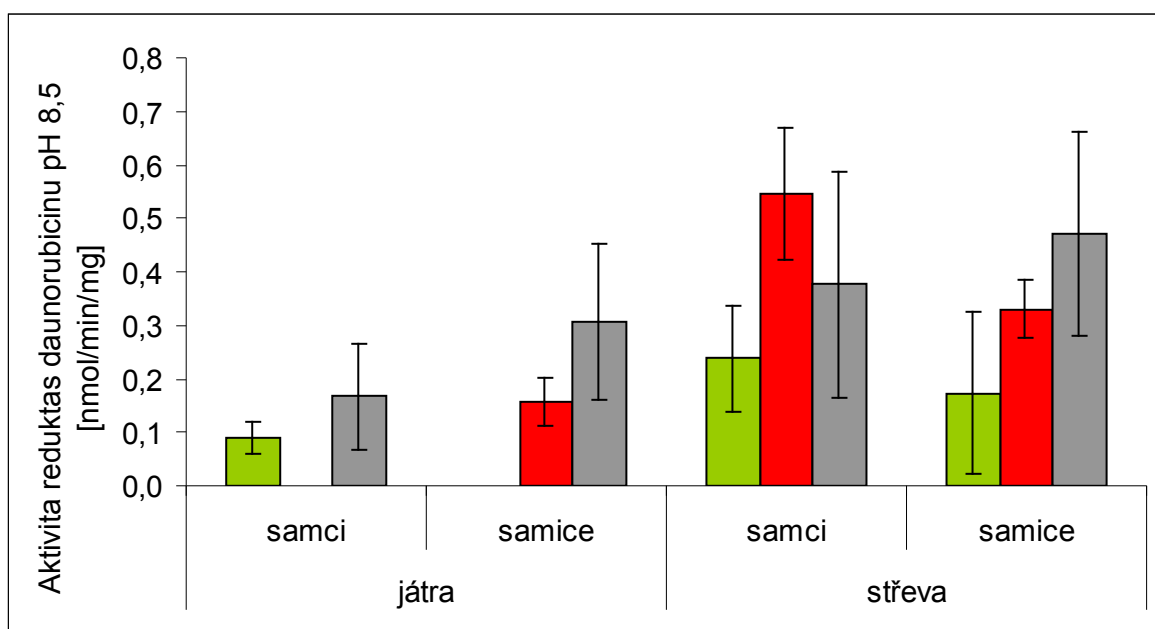
samců skupin B a D se oproti kontrolní skupině (0,279 nmol/min/mg) snížila a nebyla detekovatelná. Všechny samice vykazovaly podobnou aktivitu kolem 0,1 nmol/min/mg. Lze tedy říci, že podání flubendazolu snižuje aktivitu reductas daunorubicinu při pH 6,0 zdravých i nemocných u samců.

5.6.5. Stanovení aktivity reductas daunorubicinu při pH 8,5

Při pH 8,5 má nejvyšší aktivitu při redukcí daunorubicinu v cytosolu buněk aldehydreductasa. V následující tabulce (Tab. 17) a na obrázku (Obr. 34) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reductas daunorubicinu při pH 8,5 z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 17: Aktivity reductas daunorubicinu při pH 8,5

		Aktivita reductas daunorubicinu pH 8,5 [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	0,091 ± 0,031	0	0,166 ± 0,098
	samice	0	0,157 ± 0,046	0,306 ± 0,145
střeva	samci	0,238 ± 0,098	0,545 ± 0,123	0,376 ± 0,210
	samice	0,173 ± 0,152	0,330 ± 0,054	0,471 ± 0,192



Obr. 34: Grafické porovnání aktivity reductas daunorubicinu při pH 8,5 u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

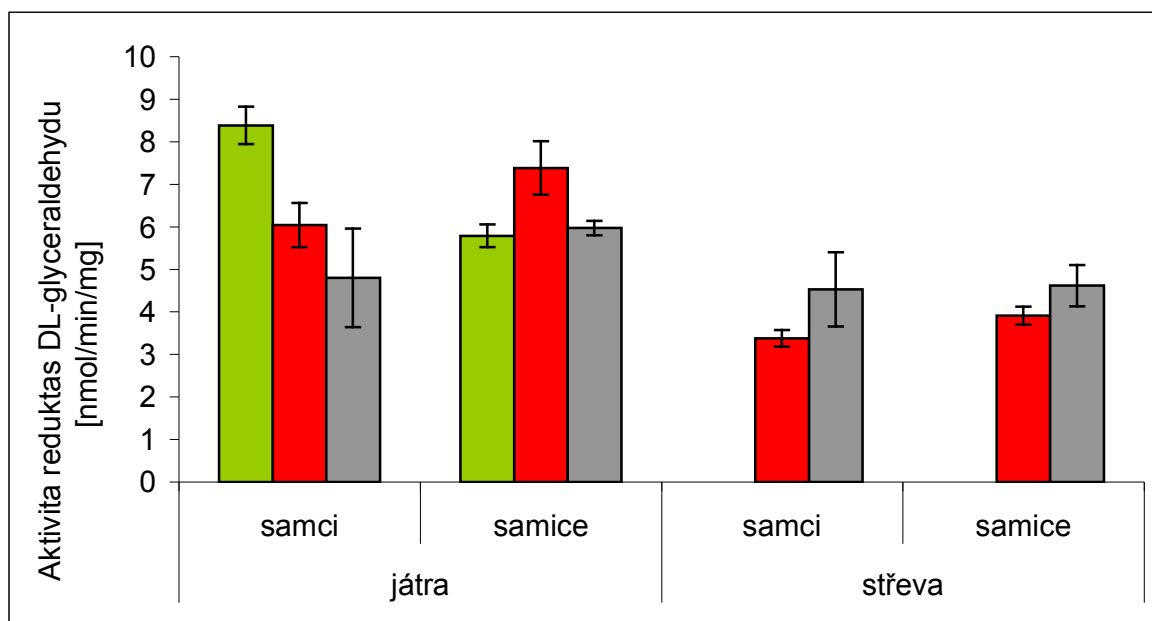
Vzhledem k velmi malým aktivitám a k velkým odchylkám naměřených výsledků nejsou statisticky významné žádné rozdíly v aktivitě reduktas daunorubicinu při pH 8,5 v cytosolické frakci buněk.

5.6.6. Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

DL-glyceraldehyd je v cytosolu redukován aldehydreduktasou AKR 1A1 na glycerol. V následující tabulce (Tab. 18) a na obrázku (Obr. 35) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reduktas DL-glyceraldehydu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 18: Aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

		Aktivita reduktas DL-glyceraldehydu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	8,384 ± 0,441	6,044 ± 0,519	4,801 ± 1,156
	samice	5,789 ± 0,266	7,385 ± 0,628	5,973 ± 0,169
střeva	samci	0	3,380 ± 0,198	4,533 ± 0,873
	samice	0	3,915 ± 0,212	4,618 ± 0,484



Obr. 35: Grafické porovnání aktivity reduktas DL-glyceraldehydu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Z jaterních vzorků se v aktivitě reduktas DL-glyceraldehydu od ostatních statisticky významně liší samci skupiny A (8,384 nmol/min/mg) a samice skupiny B (7,385 nmol/min/mg). Specifické aktivity enzymu ostatních skupin se pohybují od 4,801

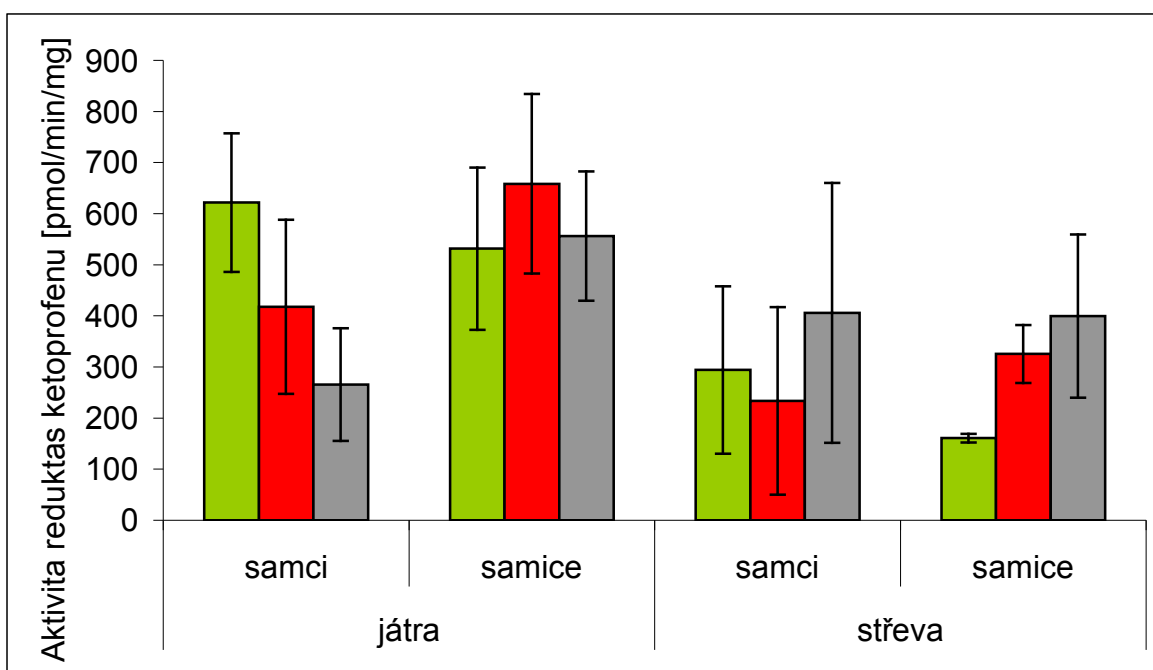
do 6,044 nmol/min/mg. U vzorků ze střev skupiny A nebyly detekovány žádné aktivity a u ostatních skupin se hodnoty aktivity enzymu pohybovaly kolem 4 nmol/min/mg. V játrech došlo u zdravých i nemocných samců ke snížení aktivity, u zdravých samic vedlo podání flubendazolu ke zvýšení aktivity. Ve střevní mukóze zřejmě došlo podáním flubendazolu k indukci reduktas DL-glyceraldehydu.

5.6.7. Stanovení aktivity reduktas ketoprofenu

Mezi reduktasy ketoprofenu patří cytosolické dihydrodioldehydrogenasy AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4. V následující tabulce (Tab. 19) a na obrázku (Obr. 36) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reduktas ketoprofenu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 19: Aktivity reduktas ketoprofenu

		Aktivita reduktas ketoprofenu [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	621,6 ± 135,7	417,8 ± 170,3	265,6 ± 110,2
	samice	531,5 ± 158,8	658,4 ± 175,6	556,0 ± 126,4
střeva	samci	294,1 ± 163,9	233,5 ± 183,5	405,6 ± 254,4
	samice	160,7 ± 8,4	325,4 ± 56,6	399,5 ± 159,8



Obr. 36: Grafické porovnání aktivity reduktas ketoprofenu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

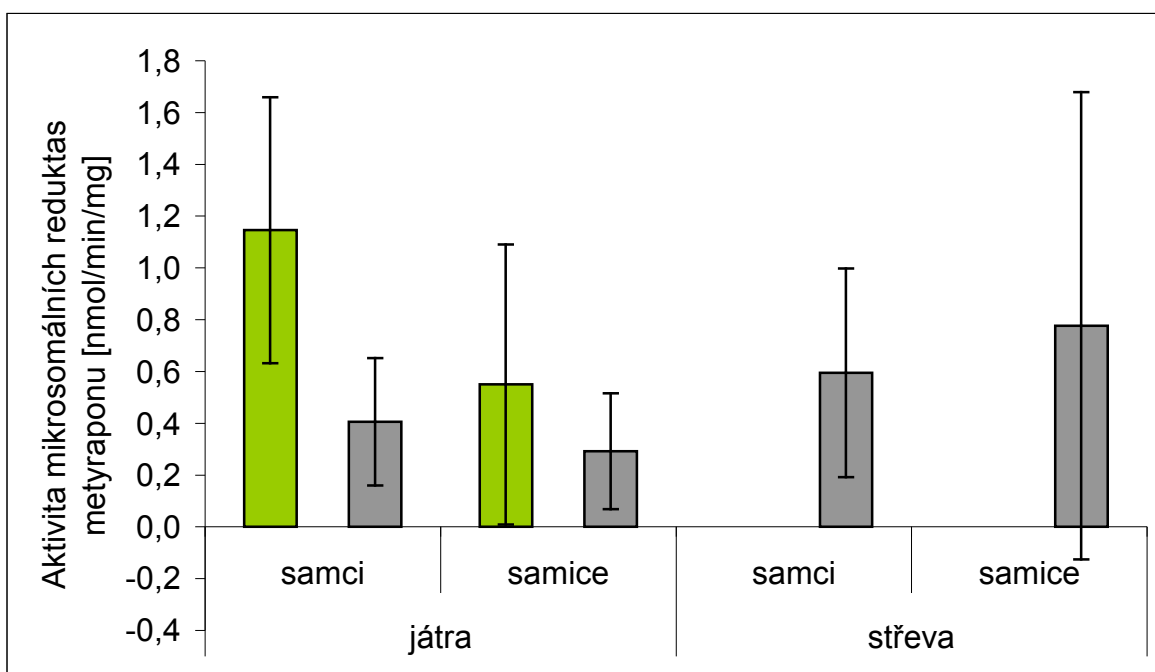
Průměrná specifická aktivita reduktas ketoprofenu se u vzorků z jatek pohybovala kolem 500 pmol/min/mg a u vzorků ze střev kolem 300 pmol/min/mg. Vzhledem k nízkým aktivitám a velkým odchylkám v případě tohoto enzymu podle naměřených výsledků nelze říci, jestli dochází nebo nedochází k ovlivnění jeho aktivity podáním flubendazolu ani zda se liší metabolismus u samců a samic.

5.6.8. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas metyraponu

V mikrosomálních frakcích redukuje metyrapon enzym z rodiny krátkořetězcových dehydrogenas/reduktas 11 β -HSD1. V následující tabulce (Tab. 20) a na obrázku (Obr. 37) jsou zobrazeny naměřené aktivity reduktas naloxonu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 20: Aktivity mikrosomálních reduktas metyraponu

Mikrosomy		Aktivita reduktas metyraponu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	1,146 \pm 0,513	0	0,406 \pm 0,246
	samice	0,550 \pm 0,541	0	0,292 \pm 0,224
střeva	samci	0	0	0,595 \pm 0,403
	samice	0	0	0,776 \pm 0,902



Obr. 37: Grafické porovnání aktivity reduktas metyraponu skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

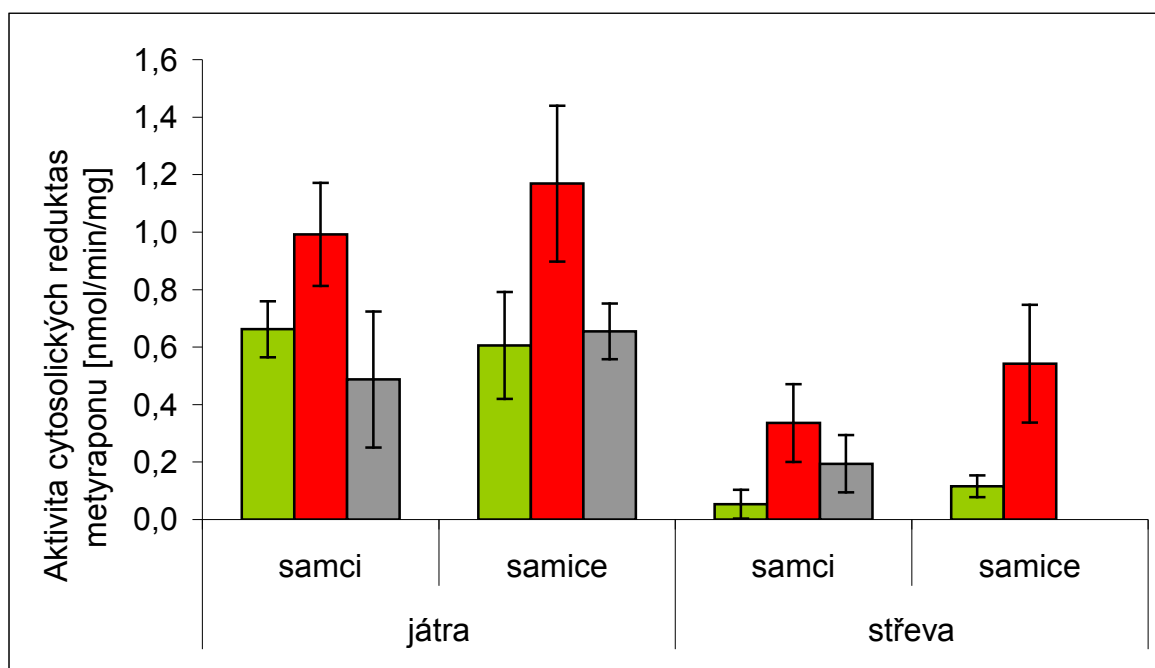
Aktivitu mikrosomálních reduktas metyraponu se podařilo detekovat jen u zvířat ze skupin A a D. Zdá se, že u jaterních enzymů podání flubendazolu jejich aktivitu snižuje. Jednotlivé výsledky měření jsou ale tak rozdílné, že je nelze spolehlivě hodnotit.

5.6.9. Stanovení aktivity cytosolických reduktas metyraponu

Metyrapon je redukován na alkoholický metabolit metyrapol cytosolickými enzymy náležejícími do nadrodiny aldoketoreduktas (dihydrodioldehydrogenasy a karbonylreduktasa). V následující tabulce (Tab. 21) a na obrázku (Obr. 38) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity cytosolických reduktas metyraponu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 21: Aktivity cytosolických reduktas metyraponu

Cytosol		Aktivita reduktas metyraponu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	0,662 ± 0,097	0,992 ± 0,179	0,487 ± 0,237
	samice	0,606 ± 0,186	1,169 ± 0,272	0,654 ± 0,097
střevo	samci	0,053 ± 0,050	0,336 ± 0,135	0,194 ± 0,100
	samice	0,116 ± 0,038	0,542 ± 0,205	0



Obr. 38: Grafické porovnání aktivity reduktas metyraponu skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

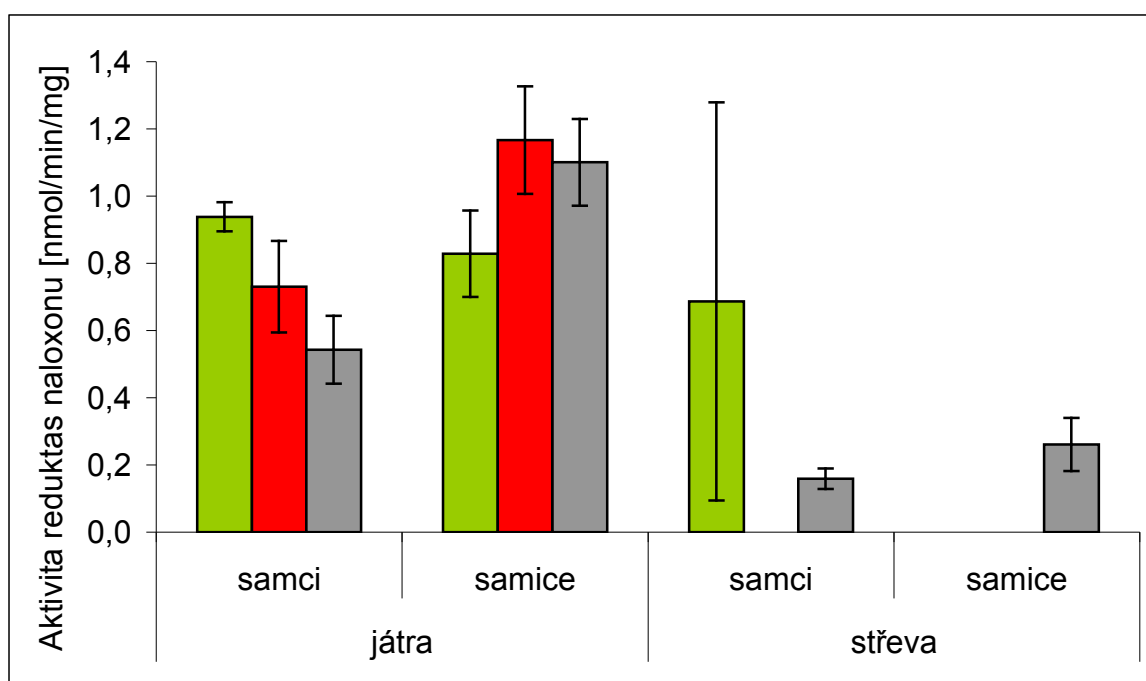
Naměřené hodnoty specifické aktivity cytosolických reduktas metyraponu samců a samic skupin A a D získaných z jater se pohybovaly v rozmezí od 0,487 do 0,662 nmol/min/mg. Jaterní vzorky samců i samic skupiny B vykazovaly aktivitu tohoto enzymu vyšší a to kolem 1, 000 nmol/min/mg . Stejně tak vykazovaly vyšší aktivitu střevní vzorky získané ze samců a samic skupiny B nad ostatními skupinami. Z výsledků tedy vyplývá, že podání flubendazolu statisticky významně zvýšilo aktivitu tohoto enzymu a to jak ve vzorcích jaterních, tak i střevních.

5.6.10. Stanovení aktivity reduktas naloxonu

Mezi reduktasy naloxonu patří cytosolické dihydrodioldehydrogenasy AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4. V následující tabulce (Tab. 22) a na obrázku (Obr. 39) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity reduktas naloxonu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 22: Aktivity reduktas naloxonu

		Aktivita reduktas naloxonu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	0,938 ± 0,043	0,730 ± 0,137	0,543 ± 0,101
	samice	0,829 ± 0,129	1,167 ± 0,160	1,101 ± 0,129
střeva	samci	0,686 ± 0,592	0	0,159 ± 0,031
	samice	0	0	0,261 ± 0,079



Obr. 39: Grafické porovnání aktivity reduktas naloxonu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Specifické aktivity reduktas naloxonu dosahovaly ve vzorcích z jater hodnot 0,543 až 1,167 nmol/min/mg. Oproti kontrolní skupině došlo u samců skupiny B i D k poklesu aktivit enzymu, u samic skupiny B i D naopak ke vzrůstu aktivit. U vzorků ze střev vykazovaly aktivitu pouze samci skupin A a D a samice skupiny D.

5.7. Stanovení aktivity reduktas oracinu

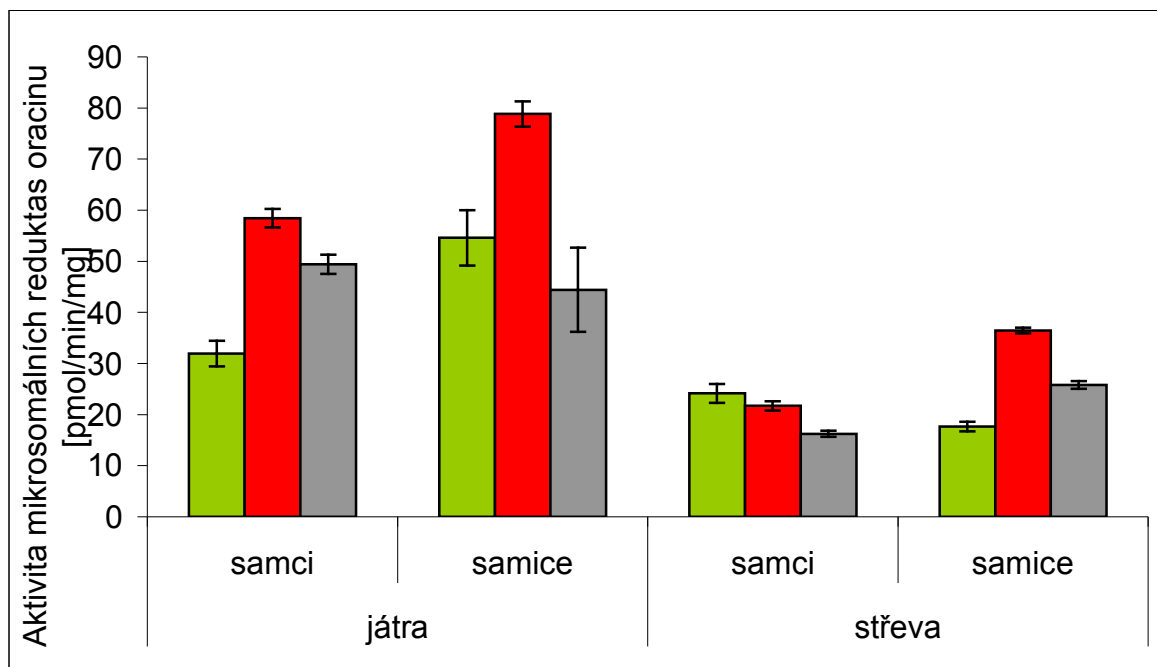
Pro zjištění aktivity reduktas oracinu v mikrosomálních a cytosolických frakcích jaterních a střevních vzorků byla použita metoda HPLC analýzy 11-dihydrooracinu, který vzniká při reakci enzymů s oracinem (viz kapitola 4.3.8).

5.7.1. Stanovení aktivity mikrosomálních reduktas oracinu

V mikrosomální frakci katalyzuje redukci oracinu 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1. V následující tabulce (Tab. 23) a na obrázku (Obr. 40) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity mikrosomálních reduktas oracinu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 23: Aktivity mikrosomálních reduktas oracinu

Mikrosomy		Aktivita reduktas oracinu [pmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	31,925 \pm 2,510	58,451 \pm 1,812	49,424 \pm 1,895
	samice	54,591 \pm 5,426	78,840 \pm 2,471	44,411 \pm 8,232
střeva	samci	24,158 \pm 1,836	21,703 \pm 0,927	16,246 \pm 0,580
	samice	17,649 \pm 0,944	36,446 \pm 0,556	25,787 \pm 0,757



Obr. 40: Grafické porovnání aktivity reduktas oracinu u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

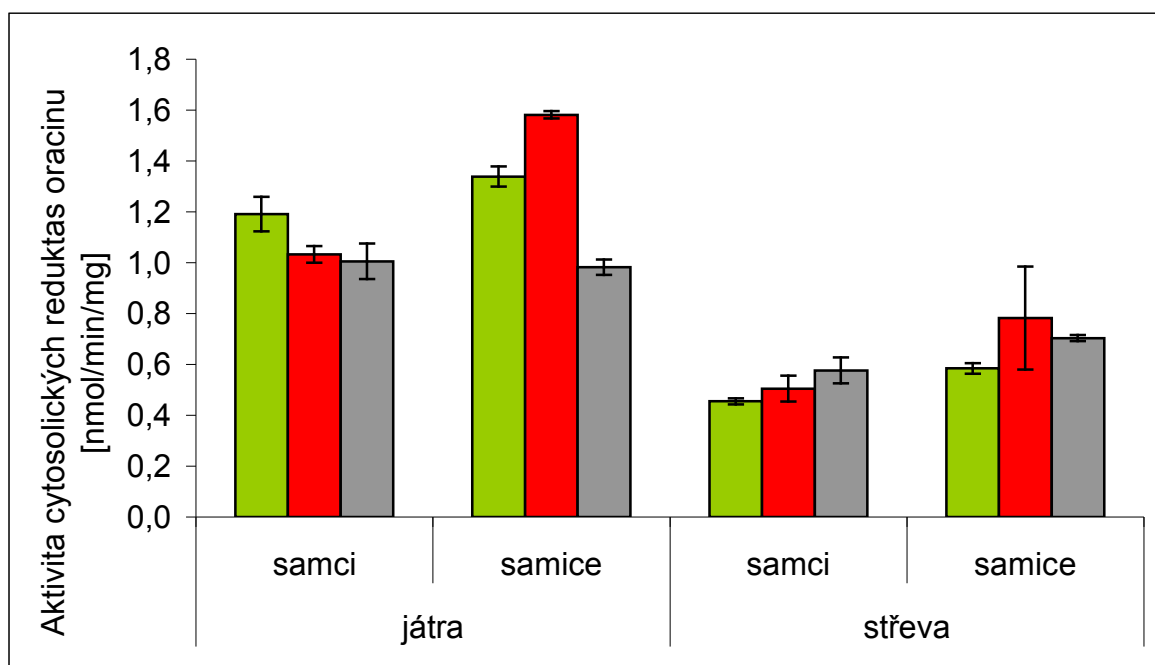
Aktivita mikrosomálních reduktas oracinu z jaterních vzorků byla vyšší u ovcí skupiny B (samci 58,451 a samice 78,840 pmol/min/mg) než u ovcí skupiny A (samci 31,925 a samice 54,591 pmol/min/mg) a skupiny D (samci 49,424 a samice 44,411 pmol/min/mg). Tomuto trendu odpovídají i výsledky aktivit enzymu ze střev samic. Samice skupiny B (36,446 pmol/min/mg) mají vyšší aktivitu než samice skupiny A a D (17,649 a 25,787 pmol/min/mg). Z aktivit enzymu ze střev samců je nejnižší hodnota u skupiny D (16,246 pmol/min/mg). Z výsledků v grafu je tedy zřejmé, že léčba flubendazolem vede ke zvýšení aktivity 11 β -HSD1.

5.7.2. Stanovení aktivity cytosolických reduktas oracinu

V cytosolu dochází k redukcí oracinu karbonylreduktasou a aldoketoreduktasami AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C4. V následující tabulce (Tab. 24) a na obrázku (Obr. 41) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity cytosolických reduktas oracinu z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 24: Aktivita cytosolických reduktas oracinu

Cytosol		Aktivita reduktas oracinu [nmol/min/mg]		
		A	B	D
játra	samci	1,191 ± 0,068	1,032 ± 0,033	1,005 ± 0,070
	samice	1,339 ± 0,040	1,582 ± 0,015	0,983 ± 0,030
střeva	samci	0,455 ± 0,012	0,505 ± 0,051	0,577 ± 0,051
	samice	0,584 ± 0,021	0,782 ± 0,203	0,704 ± 0,012



Obr. 41: Grafické porovnání aktivity reduktas oracinu u skupin ovčí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

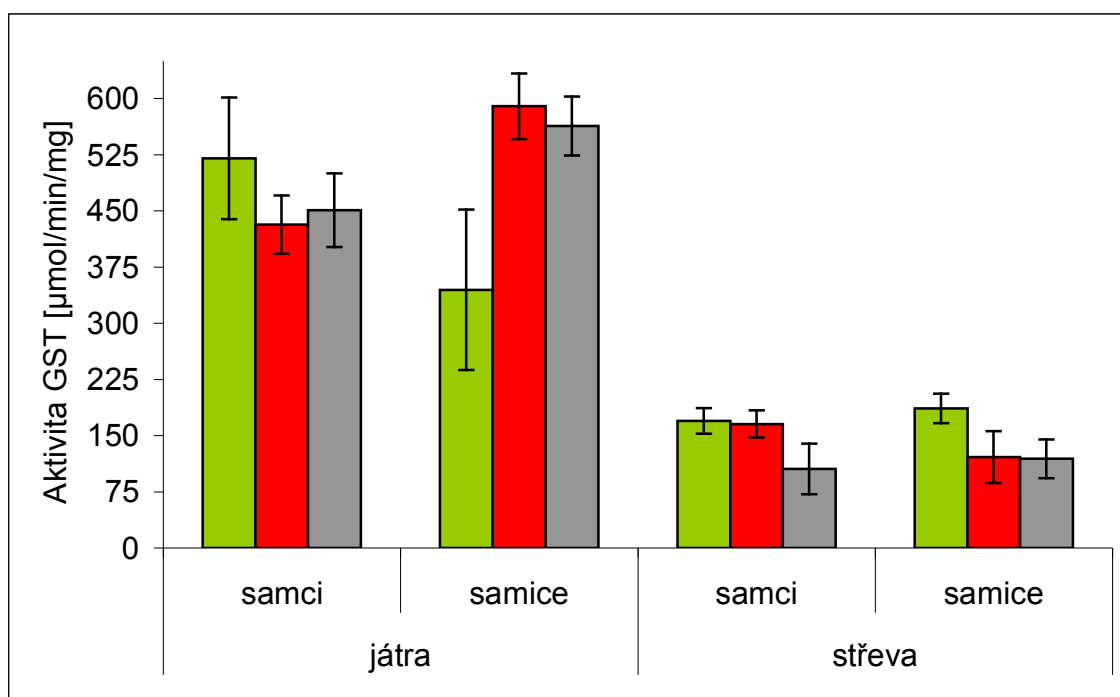
Specifická aktivita cytosolických reduktas oracinu z jater samců skupiny A byla 1,191 mol/min/mg. Statisticky významně se od ní lišily aktivity samců skupiny B i D, u kterých se hodnoty aktivity snížily na 1,032 a 1,005 mol/min/mg. U samic došlo oproti kontrolní skupině A (1,339 nmol/min/mg) u skupiny B k nárůstu aktivity (1,582 nmol/min/mg) a u skupiny D k poklesu aktivity (0,983 nmol/min/mg). Ve střevech je u samců i samic výsledek shodný. Skupiny A a B se statisticky významně neliší, vzrůst aktivity je viditelný u skupiny D.

5.8. Stanovení aktivity glutathiontransferasy (GST)

Aktivita GST byla stanovena v cytosolických frakcích jater a střev ovcí skupin A, B a D. Stanovení bylo provedeno spektrofotometrickým měřením přírůstku produktu reakce mezi 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem a glutathionem katalyzované GST (viz kapitola 4.3.9). V následující tabulce (Tab. 25) a na obrázku (Obr. 42) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity GST z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 25: Aktivity GST

		Aktivita GST [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]		
		A	B	D
játra	samci	520,09 \pm 81,03	431,56 \pm 38,86	450,86 \pm 49,30
	samice	344,66 \pm 106,95	589,70 \pm 43,82	563,33 \pm 39,24
střevo	samci	169,59 \pm 17,13	165,59 \pm 18,12	105,69 \pm 33,73
	samice	186,26 \pm 19,68	121,24 \pm 34,57	119,15 \pm 25,88



Obr. 42: Grafické porovnání aktivity GST u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v cytosolických frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

Hodnoty specifické aktivity GST získané z jater samců se statisticky významně nelišily a pohybovaly se v rozmezí od 520,09 do 431,56 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. U samic byl výsledek u skupiny A nižší (344,66 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) než u skupin B a D (589,70 a 563,33

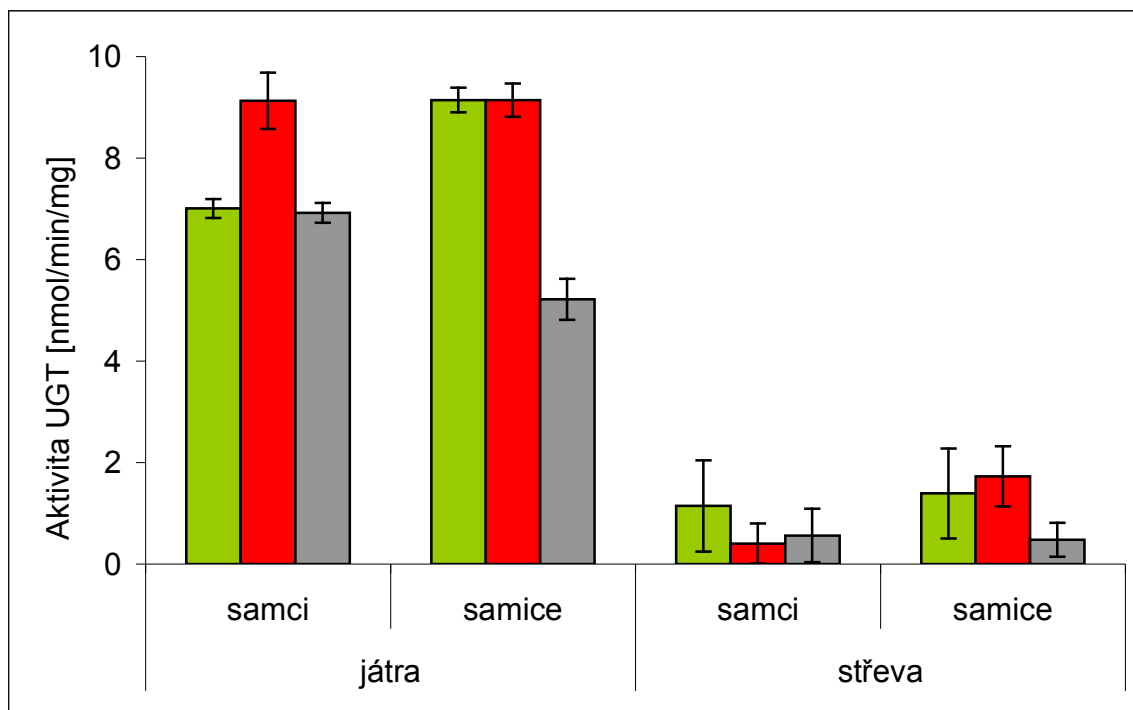
$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Střevní vzorky samců skupin A a B vykazovaly podobnou aktivitu (169,59 a 165,59 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Nižší hodnota pak byla naměřena u samců skupiny D (105,69 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). U střevních vzorků získaných ze samic byla hodnota aktivity u skupiny A vyšší (186,26 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) než u skupin B a D (121,24 a 119,15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Vzhledem k poměrně velkým odchylkám u aktivit kontrolních skupin jaterních vzorků a samic skupiny B ve střevních vzorcích by se dalo předpokládat, že flubendazol neovlivňuje aktivitu GST. Při přítomnosti parazita je pak viditelné snížení aktivity u vzorků ze střev.

5.9. Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)

Aktivita UGT byla stanovena spektrofotometrickou metodou kvantifikování přeměny p-nirofenolu na p-nitrofenolglukuronid v mikrosomální frakci jater a střev (viz kapitola 4.3.10). V následující tabulce (Tab. 26) a na obrázku (Obr. 43) jsou popsány a graficky zobrazeny naměřené aktivity UGT z jaterních a střevních vzorků.

Tab. 26: Aktivita UGT

		Aktivita UGT n mol/min/mg		
		A	B	D
játra	samci	7,007 \pm 0,187	9,132 \pm 0,556	6,923 \pm 0,196
	samice	9,144 \pm 0,241	9,142 \pm 0,329	5,219 \pm 0,403
střevo	samci	1,148 \pm 0,899	0,406 \pm 0,395	0,564 \pm 0,527
	samice	1,392 \pm 0,886	1,727 \pm 0,593	0,479 \pm 0,334



Obr. 43: Grafické porovnání aktivity UGT u skupin ovcí A (zeleně), B (červeně), D (šedě) v mikrosomálních frakcích vzorků z jater a střev s ohledem na pohlaví testovaných zvířat.

UGT získaná z jater samců skupin A a D vykazovala téměř shodnou aktivitu kolem 7 nmol/min/mg. Statisticky významně se lišila aktivita UGT samců skupiny B (9,132 nmol/min/mg). U samic skupiny A a B byly shodné aktivity tohoto enzymu s hodnotou 9,14 nmol/min/mg. Výrazně nižší aktivitu prokázala UGT samic ze skupiny D (5,219 nmol/min/mg). Ve vzorcích střev nebyly žádné statisticky významné rozdíly v aktivitě UGT. Podle výsledků lze tedy předpokládat, že u UGT v játrech samců dochází po podání flubendazolu ke zvýšení aktivity a při přítomnosti parazita zůstává aktivita shodná s kontrolní skupinou, u samic naopak flubendazol enzym neovlivňuje a parazit způsobuje pokles aktivity.

6. DISKUSE

Cílem práce bylo zjistit, zda a jak ovlivňuje opakované podávání flubendazolu biotransformační enzymy ovce domácí. Do pokusu byly zahrnuty ovce ze tří skupin. Skupina A byla kontrolní, ničím neovlivněná. Skupině ovcí B byl ve třech dávkách podán flubendazol a skupina D zahrnovala ovce infikované parazitickým červem *Haemonchus contortus* a následně léčené podáním třech dávek flubendazolu. Z biotransformačních enzymů byly sledovány enzymy oxidační, redukční i konjugační.

Nejdříve byly z jater a střev testovaných zvířat připraveny subcelulární frakce (mikrosomální a cytosolické) metodou frakční ultracentrifugace. Poté bylo nutné určit koncentraci bílkovin ve vzorcích. Následovalo proměření aktivit jednotlivých enzymů a jejich přepočtení na specifickou aktivitu vztaženou právě na 1mg proteinu ve vzorku a na 1 minutu reakce. Po získání všech výsledků byly jednotlivé aktivity statisticky porovnány pomocí Studentova nepárového T-testu s nastavenou hladinou spolehlivosti na 0,95.

Výsledky aktivit jednotlivých enzymů kontrolních skupin ovcí byly porovnány s hodnotami, které uvádí Szotáková a kol. (2004). U všech enzymů došlo k řádové shodě výsledných aktivit.

Koncentrace bílkovin v mikrosomálních frakcích získaných ze vzorků jater ovcí dosahovaly hodnot od 4,49 do 8,91 mg/ml. Střevní vzorky obsahovaly od 2,94 do 4,18 mg proteinů na ml vzorku. Nejvíce bílkovin obsahovaly vzorky získané z jater samic skupiny D. Hodnoty koncentrací bílkovin v cytosolických frakcích získaných ze vzorků jater si byly všechny velmi podobné a to kolem 18 mg/ml. Obsah bílkovin u střev se pohyboval od 8,93 mg/ml do 12,98 mg/ml. Mezi koncentracemi bílkovin v mikrosomálních a cytosolických frakcích byl pozorován rozdíl zhruba trojnásobný a to jak u vzorků z jater, tak ze střev.

Zajímavé bylo porovnání výsledků specifických aktivit cytochromů P450. U většiny pozorovaných isoformů došlo ke zvýšení aktivity enzymů u samců skupiny B a u samic skupiny D. U CYP 1A1, 1A2 a 2C9 bylo toto zvýšení 1,5 až 2násobné. Lze tedy usoudit, že indukce CYP po podání flubendazolu je u těchto isoformů závislá na pohlaví. U samců indukuje tyto enzymy podání flubendazolu a u samic přítomnost parazita. Toto zjištění nekoresponduje s výsledky Šavlíka a kol. (2006), který uvádí, že u prasat nemá podání flubendazolu žádný vliv na aktivitu CYP 1A. Rozdílný vliv flubendazolu na CYP může být dán mezidruhovými rozdíly (Boobis a kol. 1990). Navíc u prasete jako monogastričního zvířete setrvává flubendazol v organismu kratší dobu než u přežvýkavců – v našem případě

ovce – takže se může projevit i vliv delšího kontaktu organismu ovce s tímto léčivem. Tuto teorii potvrzuje i Lamka a kol. (2006), který popisuje, že i jednorázové podání albendazolu indukuje CYP 1A jiného přežvýkavce - muflona.

U CYP 2B a 3A došlo k významnému zvýšení aktivity pouze u samic skupiny D. Skupina B nebyla nijak ovlivněna, tudíž flubendazol nemá na aktivitu těchto enzymů vliv. U samic nakažených vlasovkou se projevil vliv onemocnění.

U CYP 2E1 došlo ke snížení aktivity u samců i samic skupin B a D. To znamená, že podání flubendazolu aktivitu CYP 2E1 inhibuje u zdravých i nemocných zvířat.

Aktivity flavinmonooxygenas se po podání flubendazolu u samců zvýšily, u samic se nezměnily. Statisticky významný byl rozdíl v aktivitách FMO u samců a samic. Zdá se, že samice mají aktivitu FMO nižší (u skupin ovcí A a B zhruba o polovinu). V literatuře se uvádí, že u myši mají samice aktivitu FMO 1 vyšší než samci, u potkana naopak nižší a u člověka je aktivita těchto enzymů na pohlaví nezávislá (Cherrington a kol. 1998). Jsou zde tedy viditelné rozdíly v aktivitě FMO mezi pohlavími.

Ovlivnění redukčních enzymů se liší podle jednotlivých substrátů. U mikrosomálních reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v aktivitě. Cytosolické reduktasy 4-pyridinkarboxaldehydu z jaterních vzorků vykazovaly po podání flubendazolu indukci. Výsledky aktivit skupiny B byly statisticky významně vyšší než u skupin A a D. Ale u vzorků ze střev byly naopak aktivity skupiny B statisticky významně nižší než u skupin A a D. Z aktivit reduktas acenaftenonu se od ostatních hodnot lišily aktivity samic B a to jak v játrech, tak ve střevech. Podání flubendazolu u samic tedy způsobuje indukci reduktas acenaftenonu, mezi které patří enzymy z podrodiny AKR 1C. K inhibici reduktas daunorubicinu při pH 6,0 dochází u samců. Samice u těchto reduktas nevykazují statisticky významné rozdíly v aktivitě. Vzhledem k velkým odchylkám naměřených výsledků v aktivitě reduktas daunorubicinu při pH 8,5 nejsou statisticky významné žádné rozdíly. Aktivita reduktas DL-glyceraldehydu u samců ve skupině B klesala a u samic stoupala. Reduktasy ketoprofenu se ve své aktivitě nelišily a tak podání flubendazolu ani pohlaví nemají vliv na aktivitu těchto reduktas. Pro rozhodnutí o ovlivnění mikrosomálních reduktas metyraponu bylo detekováno málo výsledků. Naproti tomu výsledky aktivit cytosolických reduktas metyraponu jednoznačně ukazují, že v játrech i ve střevech dochází po podání flubendazolu k indukci tohoto enzymu. Tento výsledek se shoduje s výsledky u bažantů, které uvádí Šavlík a kol. (2007). Reduktasy naloxonu lze hodnotit pouze v jaterních vzorcích a zde u samců nedochází ke statisticky významnému ovlivnění enzymu, u samic

je zřetelná indukce. Aktivita mikrosomální 11 β -HSD1 byla stanovena díky specifickému substrátu oracinu a výsledky prokázaly, že podání flubendazolu je induktorem tohoto enzymu. Cytosolické reductasy oracinu získané z jater vykazovaly po podání flubendazolu u samců pokles a u samic nárůst aktivity, u skupiny D pak u samců i samic pokles aktivity. Ve střevních vzorcích došlo k nárůstu aktivity pouze u skupiny D.

Podle jednotlivých skupin zvířat lze ovlivnění redukčních enzymů shrnout následovně. U samců skupiny B byla v játrech indukována 11 β -HSD1 a ve střevech karbonylreduktasa. Samice skupiny B vykazovaly v játrech indukci 11 β -HSD1, AKR 1A, 1C i karbonylreduktasy, ve střevech pak indukci 11 β -HSD1 a karbonylreduktasy. U samců skupiny D v játrech nebylo výrazné ovlivnění žádného enzymu, ve střevech indukce 3 α -HSD a inhibice 11 β -HSD1. Samice skupiny D vykazovaly v játrech inhibici 3 α -HSD a ve střevech indukci 11 β -HSD1 a karbonylreduktasy.

Aktivity GST z jaterních vzorků byly zhruba trojnásobně vyšší než aktivity GST ve střevech. Výsledky jednotlivých skupin se od sebe sice statisticky lišily, ale vzhledem k poměrně velkým odchylkám u kontrolních skupin nelze předpokládat ovlivnění aktivity enzymu podáváním flubendazolu. Parazitóza měla vliv na zvýšení aktivity GST ve střevních vzorcích.

UGT získaná ze střevních vzorků vykazovala podobnou aktivitu u všech porovnávaných skupin. Rozdíl byl zaznamenán u jaterních vzorků u skupiny A, kde samci vykazovali nižší aktivitu než samice. Dle naměřených výsledků lze pak předpokládat, že u UGT v játrech samců dochází po podání flubendazolu ke zvýšení aktivity a při přítomnosti parazita zůstává aktivita shodná s kontrolní skupinou. Naopak u samic podání flubendazolu enzym neovlivňuje a parazit způsobuje pokles aktivity. Lamka a kol. (2007) popisuje, že podání albendazolu nemělo vliv na aktivitu UGT získaných z jater a střev mufloních samic nakažených dikroceliózou.

Pokud se po podání léčiva projeví indukce některého z biotransformačních enzymů, může to znamenat zásah do vnitřního prostředí organismu. Enzymy jsou indukovány a přeměňují tedy rychleji své substráty, kterými jsou jak xenobiotika, tak eobiotika. Pokud léčivo indukuje enzymy, kterými je samo biotransformováno, znamená to, že je rychleji vylučováno a v organismu není dosaženo terapeutických hladin. V případě anthelmintik pak parazitující červ může přežít aplikaci léčiva, aktivovat svoje obranné mechanismy a vytvářet si rezistenci. Je-li zvíře léčeno současně jinými léčivy, je zároveň ohrožen i léčebný efekt těchto látek. V případě inhibice biotransformačních enzymů je léčivo z organismu vylučováno pomaleji, jeho hladiny jsou vyšší a působí více toxicky.

V této práci bylo prokázáno, že opakovaným podáváním flubendazolu ovci domácí se aktivita některých jejích biotransformačních enzymů mění. To znamená, že by na tuto skutečnost měl být brán zřetel při léčení a prevenci helmintóz i při další současné terapii jiného onemocnění.

7. ZÁVĚR

Z jater a střevní mukózy ovcí zdravých kontrolních, zdravých léčených flubendazolem a experimentálně infikovaných vlasovkou slézovou a následně léčených flubendazolem byly získány subcelulární frakce. V těchto frakcích byly stanoveny specifické aktivity vybraných biotransformačních enzymů. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že:

- podávání flubendazolu neovlivňuje aktivitu: CYP 2B, CYP 3A, GST
- podávání flubendazolu ovlivňuje, inhibuje aktivitu: CYP 2E1
- podávání flubendazolu ovlivňuje aktivitu v závislosti na pohlaví zvířete a na přítomnosti parazitózy: CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2C9, FMO, UGT
- podávání flubendazolu ovlivňuje aktivitu redukčních enzymů:
 - u zdravých, léčených ovcí vykazovala v játrech indukci 11β -HSD1, u samic pak i AKR 1A, AKR 1C a karbonylreduktasa, ve střevní mukóze došlo k indukci karbonylreduktasy, u samic i 11β -HSD1
 - u nemocných, léčených ovcí v játrech došlo pouze k inhibici 3α -HSD u samic, ve střevní mukóze u samců k indukci 3α -HSD a inhibici 11β -HSD1 a u samic k indukci 11β -HSD1 a karbonylreduktasy
- výrazné rozdíly v aktivitě mezi pohlavími vykazuje: FMO

Opakované podávání flubendazolu ovcí domácí mění aktivitu některých jejích biotransformačních enzymů. Na tuto skutečnost by měl být brán zřetel při léčení a prevenci helmintóz i při další současné terapii jiného onemocnění. Jistý vliv má ovlivnění biotransformačních enzymů hostitele i na stále rozšířenější helmintorezistenci.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Allan D., Lohnes D. (2000): Cloning and developmental expression of mouse aldehyde reductase (AKR1A4), *Mech Dev.* 94(1-2), 271-5
- Boobis A. R., Sesardic D., Murray B. P., Edwards R. J., Singleton A. M., Rich K. J., Murray S., De La Torres R., Segura J., Pelkonen O., Pasanen M., Kobayashi S., Zhi-Guang T., Davies D. S. (1990): Species variation in the response of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors, *Xenobiotika*, 20, 1139-1161
- 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
- Cashman J. R., Hanzlik R. P. (1981): Microsomal oxidation of thiobenzamid. A photometric assay for the flavine-containing monooxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98 (1), 147-153
- Cherrington N.J., Cao Y., Cherrington J.W., Rose R.L., Hodgson E. (1998): Physiological factors affecting protein expression of flavin-containing monooxygenases 1, 3 and 5, *Xenobiotica* 28(7), 673-82
- Gibson G. G., Skett P. (2001): Introduction to Drug Metabolism, 3rd Edition, Nelson Thornes Publishers, Cheltenham
- Habig H. W., Jacoby B. W. (1981): Glutathion S-transferases (rat and human), *Methods enzymol.* 77, 218-404
- Jíra J. (1998): Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci, Galén, Praha
- Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I. J., Kador P. F., Lee Y. S., Tsai J. Y., Fujisawa S., Lizak M. J., Sinz A., Sato S. (1999): Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats, *Biochem. Pharmacol.* 58, 517-524

- Keppler D. (2005): Uptake and efflux transporters for conjugates in human hepatocytes. *Methods Enzymol.* 400, 531-42.
- Kvasničková E. (1995): Xenobiochemie, Karolinum, Praha
- Lamka J., Ducháček L. (2006): Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum
- Lamka J., Křížová V., Cvilink V., Šavlík M., Velík J., Ducháček L., Szotáková B., Skálová L. (2007): A single adulticide dose of albendazole induces cytochromes P4501A in mouflon (*Ovis musimon*) with dicrocoeliosis, *Veterinari Medicina*, 52, (8): 343–352
- Maser E., Oppermann U. C. T. (1997): The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action, *Eur. J. Biochem.* 249, 365-369
- Masopust J. (2003): Patobiochemie buňky, Karolinum, Praha
- Ministerstvo zdravotnictví ČR (2005): Český lékopis 2005, Grada, Praha
- Mizuma T., Mashida M., Hayashi M., Awazu S. (1982): Correlation of drug conjugative metabolism rates between in vivo and iv vitro: glucuronidation and sulfatation of p-nitrophenol as a model compound in rat, *J.Pharmacobiodyn.* 5, 811-817
- Nečas O. a kolektiv (2000): Obecná biologie pro lékařské fakulty, 3.vydání, Nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o, Jinočany
- Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A.(1995):Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochem. Pharmacol.* 50, 815-824
- 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
- Šavlík M., Fimanová K., Szotáková B., Lamka J., Skálová L. (2006): Modulation of porcine biotransformation enzymes by anthelmintic therapy with fenbendazole and flubendazole, *Res Vet Sci.* 80(3): 267-74
- Šavlík M., Poláčková I., Szotáková B., Lamka J., Velík J., Skálová L. (2007): Activities of biotransformation enzymes in pheasant (*Phasianus colchicus*) and their modulation by in vivo administration of mebendazole and flubendazole., *Res Vet Sci.* 83(1), 20-6
- 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 bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76-85
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999): Význam cytochromů P 450 pro lidské zdraví, *Chemické Listy* 93, 229 - 237
- 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 vivo activities of biotransformation enzymes in pig, catte, goat and sheep, *Res. Vet. Sci.* 76, 43-51
- Ústav vědeckotechnických informací (1972): Naučný slovník zemědělský 4, M, Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- Ústav vědeckotechnických informací (1972): Naučný slovník zemědělský 5, N-O, Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- Všeobecná encyklopedie v osmi svazcích (1999), Encyklopedie Diderot, Praha

- Vernerová E., Svobodová V. (2002): Terapie endoparazitóz psů a koček, *Veterinářství* 52, 16-20
- 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 Reoxydation of the Principal Metabolite 11-Dihydrooracin to Oracin, *Enantiomer* 5, 263-270
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Motolice>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450_oxidase#Nomenclature
- http://en.wikipedia.org/wiki/Domestic_sheep
- <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/nemas/haemonchuscontortus>
- http://www.attra.org/downloads/goat_barber_pole.pdf
- http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=1.1.1.184
- http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/animal/meatgoat/MGWormer.htm
- <http://www.crnet.cz/kollar/nemociovci.htm>
- <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=843&fr=1&sts=>
- <http://www.merino-landschaf.schok.cz/standard.html>
- <http://www.natur.cuni.cz/fyziol/pdf/PK.pdf>
- <http://www.wormboss.com.au/LivePage.aspx?pageId=437>
- <http://www.zootechnika.estranky.cz/stranka/plodnost-ovci>