

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

OBRANNÉ MECHANISMY MOTOLICE
KOPINATÉ PŘED ÚČINKY ANTHELMINTIK

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Anna Ballóková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za vedení při zpracování diplomové práce, ochotnou pomoc a cenné rady při řešení problémů, Mgr. Hance Bártíkové za poučení a zasvěcení do metodiky práce a všem pracovníkům katedry biochemických věd za ochotu a pomoc.

Také děkuji Grantové agentuře České republiky za financování projektu (GAČR 524/07/0611), jehož součástí je i tato práce.

PROHLÁŠENÍ

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

OBSAH

1	ÚVOD	- 8 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1	DIKROCELIÓZA	- 9 -
2.2	MOŽNOSTI PREVENCE A LÉČBY DIKROCELIÓZY	- 11 -
2.3	ENZYMATICKÝ SYSTÉM HELMINTŮ	- 13 -
2.3.1	<i>Antioxidační enzymy helmintů</i>	- 13 -
2.3.1.1	Superoxid dismutasa	- 14 -
2.3.1.2	Katalasa.....	- 15 -
2.3.1.3	Peroxidasy.....	- 16 -
2.3.1.4	Glutathionperoxidasa	- 18 -
2.3.1.5	Glutathion S-transferasa	- 19 -
2.3.1.6	Peroxiredoxin.....	- 20 -
2.3.1.7	Antioxidační enzymy motolice jaterní.....	- 21 -
2.4	METABOLIZMUS ALBENDAZOLU	- 22 -
2.5	ENZYMY ÚČASTNÍCÍ SE METABOLIZMU ALBENDAZOLU.....	- 23 -
2.5.1	<i>Flavinmonooxygenasy</i>	- 24 -
2.5.2	<i>Cytochrom P 450</i>	- 26 -
3	CÍL PRÁCE	- 30 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 31 -
4.1	MATERIÁL	- 31 -
4.1.1	<i>Chemikálie</i>	- 31 -
4.1.2	<i>Pomůcky a přístroje</i>	- 31 -
4.1.3	<i>Biologický materiál</i>	- 32 -
4.2	METODIKA PRÁCE.....	- 33 -
4.2.1	<i>Příprava subcelulárních frakcí z motolice kopinaté</i>	- 33 -
4.2.2	<i>Stanovení koncentrace bílkovin metodou redukce BCA</i>	- 34 -
4.2.3	<i>Inkubace subcelulárních frakcí se substrátem a inhibitory enzymů</i>	- 35 -
4.2.3.1	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s albendazolem</i>	- 35 -
4.2.3.2	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory enzymů</i>	- 37 -
4.2.4	<i>HPLC analýza</i>	- 40 -
4.2.5	<i>Statistická analýza</i>	- 41 -
5	VÝSLEDKY	- 42 -
5.1.1	<i>Stanovení obsahu bílkovin</i>	- 42 -
5.1.2	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory methimazolem, α-nathylthioureou a indol-3-karbinolem</i>	- 43 -
5.1.3	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory 3-amino-1,2,4-triazolem</i>	- 47 -
5.1.4	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory diethyldithiokarbamátem a oktylaminem</i>	- 48 -
5.1.5	<i>Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory kyselinou salicylhydroxamovou a merkaptosukcinátem</i>	- 51 -
5.1.6	<i>Stanovení IC 50 pro inhibitor α-nafthylthiourea a methimazol</i>	- 53 -

6	DISKUSE	- 64 -
7	ZÁVĚR	- 68 -
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 69 -
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 70 -

ABSTRAKT

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

Kandidát: Anna Ballóková
Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.
Název diplomové práce: Obranné mechanismy motolice kopinaté před účinky anthelmintik

Dikrocelióza, helmintóza způsobená motolicí kopinatou (*Dicrocoelium dendriticum*), je celosvětově významné onemocnění postihující zejména hospodářské ale i volně žijící přežvýkavce. V současnosti jediným možným prostředkem v boji s touto parazitózou je podávání anthelmintik. Benzimidazolové anthelmintikum albendazol je motolicí kopinatou metabolizováno na albendazolsulfoxid, ale dosud není známo, které enzymy jsou za tuto oxidaci zodpovědné.

Tato práce se zaměřila na identifikaci enzymů účastnících se metabolismu albendazolu u motolice kopinaté izolované z jater přirozeně infikovaných muflonek (*Ovis Musimon*). K určení účasti enzymů na sulfoxidaci albendazolu bylo použito specifických inhibitorů jednotlivých enzymů. Jako jediné účinné inhibitory použité v této práci byly α -nafthylthiourea a methimazol, specifické inhibitory pro flavinmonooxygenasy. Indol-3-karbinol, který byl použit také jako specifický inhibitor tohoto enzymového systému, se jevil jako neúčinný. Dále byly použity inhibitory 3-amino-1,2,4-triazol pro katalasu, diethyldithiokarbamát a oktylamin pro cytochrom P450 a kyselina salicylohydroxamová a merkaptosukcinát pro peroxidasu a glutathion peroxidasu. Inhibice těmito sloučeninami nebyla prokázána. Na základě naměřených výsledků změny specifické enzymové aktivity enzymů v mikrosomální i mitochondriální frakci tato práce potvrdila roli enzymatického systému flavinmonooxygenas v sulfoxidaci albendazolu.

ABSTRACT

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

Candidate: Anna Ballóková
Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.
Title of diploma thesis: Defence mechanisms of lancet fluke
against effects of anthelmintics

Dicrocoeliosis, helminthosis caused by *Dicrocoelium dendriticum* (lancet fluke), is worldwide spread infection of small ruminants. The only way of effective control of this parasitosis is in administration of anthelmintics. In lancet fluke, benzimidazole anthelmintic albendazole metabolism via enzymatic sulfoxidation was found but no information about albendazole oxidases is available.

The aim of this work was to identify enzymes involved in the metabolism of albendazole in *Dicrocoelium dendriticum* isolated from naturally infected mouflons (*Ovis musimon*). To determinate the involved enzymes some of the specific inhibitors were used. The only effective inhibitors used in this work were α -naphthylthiourea and methimazole, specific inhibitors of flavin-containing monooxygenases. Indole-3-carbinole, used as the specific inhibitor of the same enzymatic system, was without any effect. Other inhibitors were used: 3-amino-1,2,4-triazole for catalase, diethyldithiocarbamate and octylamine for cytochrome P450 and salicylohydroxamic acid and mercaptosuccinate for peroxidase and glutathion peroxidase. These inhibitors had no effect on enzyme activities tested. We concluded that the sulfoxidation of albendazole is mediated via flavin-containing monooxygenases.

1 ÚVOD

Biochemické pochody zabezpečující život organismu jako takového jsou bezpochyby přítomny u každého živočišného druhu, ať už je to jediná buňka bakterie nebo lidský organizmus. Biochemickým pochodům podléhají látky, které můžeme jednoduše rozdělit na eobiotika (látky tělu vlastní) a xenobiotika (látky tělu cizí).

Metabolické přeměny xenobiotika jsou pro organismy velice významné zejména z hlediska obrany proti toxickým vlastnostem a působení xenobiotika. Pokud se však jedná o parazity, kteří tímto způsobem deaktivují látky používané v terapii proti dané parazitóze, je tento jev nežádoucí.

Dikrocelióza - helmintóza způsobená motolicí kopinatou (*Dicrocoelium dendriticum*) - je v současnosti považována za celosvětově významné, avšak dosud relativně málo prozkoumané onemocnění domácích a volně žijících zvířat (Otranto a Traversa 2003) i člověka. Jedná se o jednu z šesti nejčastěji se vyskytujících helmintóz hospodářských přežvýkavců (Hiepe 1994), dikrocelióza ale také v nemalé míře postihuje volně žijící zvířata.

Jediným zatím všeobecně přijatelným prostředkem v boji s motolicí kopinatou je farmakoterapie a farmakoprophylaxe prováděná v ohrožených či napadených chovech s využitím vhodných anthelmintik (antitrematod). Velmi často jsou podávána právě benzimidazolová anthelmintika (např. albendazol). Tato léčiva podléhají po podání velmi rychle biotransformaci.

Benzimidazolové anthelmintikum albendazol je motolicí kopinatou metabolizováno na anthelminticky účinný albendazolsulfoxid, ale dosud není známo, které enzymy jsou za tuto oxidaci zodpovědné. Proto náplní této práce bylo potvrdit resp. vyloučit účast jednotlivých enzymatických systémů motolice kopinaté na sulfoxidaci jednoho z nejpoužívanějších anthelmintik albendazolu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dikrocelióza

Dikrocelióza je onemocnění způsobené motolicí kopinatou. Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum* synonymum *D. lanceolatum*, *Dicrocoelidae*, *Platyhelminthes*, *Scolecida*) je plochý červ s průhledným tělem dosahujícím délky 5 až 15 mm a šířky 1,5 až 3 mm. Je parazitem savců včetně člověka, s výskytem především u přežvýkavců. Areál rozšíření je rozsáhlý, zahrnuje Evropu, Severní Afriku, Severní Ameriku, Asii (Eckert a Hertzberg 1994).

Motolice kopinatá patří mezi distomní motolice s tříhostitelským cyklem vázaným na suchozemské plže. Její tmavě hnědá vajíčka mají oválný tvar a jsou velmi malá (36-45×20-30 μm). Dokáží přežít i nepříznivé podmínky jako například velké sucho nebo zimu, a to až jeden rok při současném zachování infekčnosti. Obsahují první vývojové stádium - miracidium, obrvenou larvu. Biologický cyklus motolice trvá přibližně 6 měsíců a je nepřímý. Zahrnuje dva mezihostitele a jednoho definitivního hostitele.

Prvními mezihostiteli, kteří pozřou ve vajíčku se vyvíjející miracidium, jsou plži rodů *Zeberina*, *Helicella* a *Theba* vyskytující se hlavně v sušších vápencových oblastech. V jejich útrebách se vyvíjejí sporocyty a cercárie, které plži posléze vyloučí v podobě slizových koulí. V druhém mezihostiteli, kterým je mravenec rodu *Formica* nebo *Tetramorium*, dochází k vývoji encystovaných metacercárií. U tohoto mezihostitele je možné pozorovat ukázkové ovlivnění chování hostitele parazitem. Obvykle jedna nebo dvě cercárie migrují, namísto k zadečku, k podjícnovému gangliu mravence, odkud potom ovládají jeho chování. Infikovaní jedinci vylézají na stébla trav, kde se zakousnou, a tak se zvyšuje pravděpodobnost jejich pozření definitivním hostitelem při pastvě. Pokud hrozí přehřátí a vyschnutí mravence, motolice umožní povolit stisk kusadel a mravenec se může skrýt. Vývoje v definitivním hostiteli, mezi které patří hlavně přežvýkavci, dále pak králíci, prasata, psi, koně a ve výjimečných případech i člověk, jsou schopny pouze metacercárie, které se encystovaly. Po excystaci ve střevě migrují do žlučodů, alternativně i přes portální věnu a jaterní parenchym (Volf a Horák 2007).

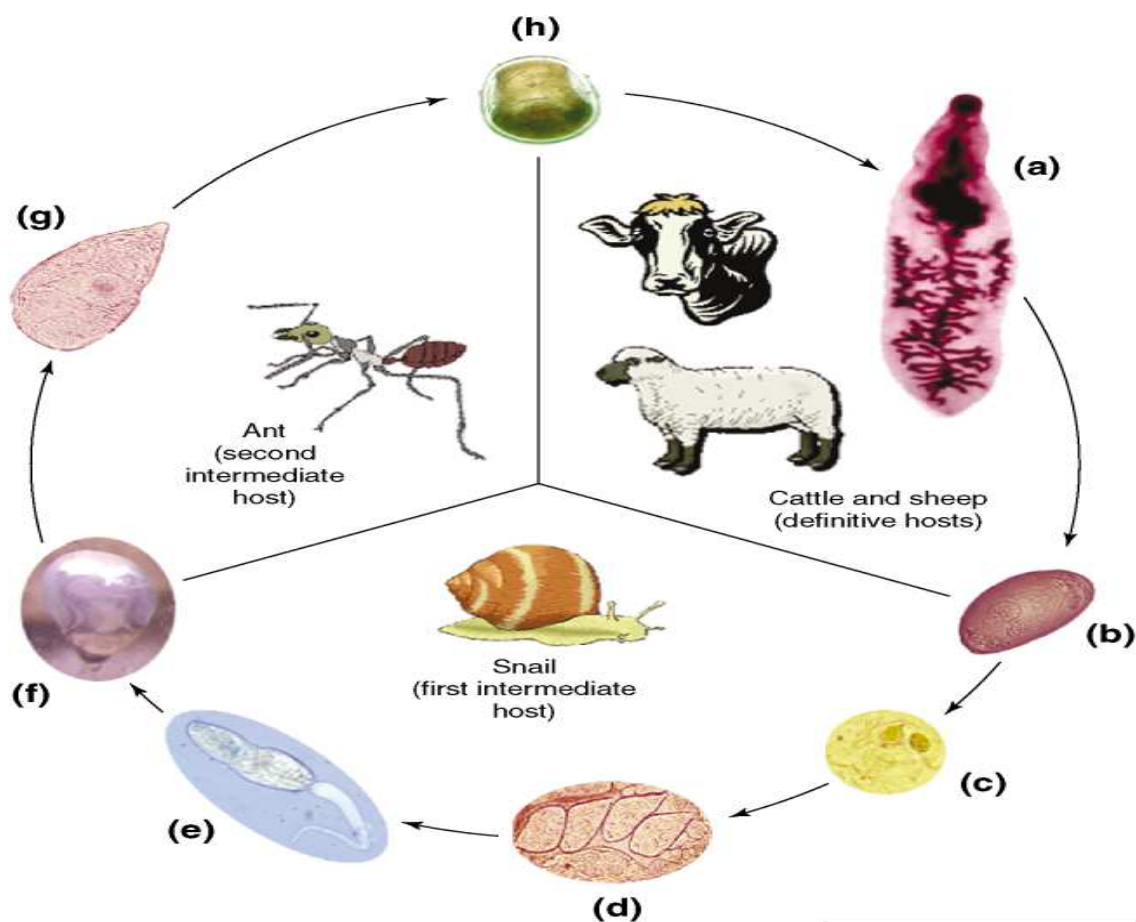
Dikrocelióza je zoonózou. K infekci lidí (zvláště dětí) může dojít po náhodném pozření druhého mezihostitele tj. infikovaného mravence. Klinická manifestace

dikroceliózy u člověka se projevuje zažívacími problémy, flatulencí, zvracením, průjmem, zácpou a žlučníkovou kolikou (Jíra 1998, Karadag et al. 2005).

Klinické symptomy dikroceliózy u zvířat nejsou specifické a infekce probíhá většinou inaparentně. U silných infekcí (více než několik tisíc dospělých dikrocelií v napadeném jedinci) se choroba projevuje anémií, ikterem, úbytkem hmotnosti a narušením reprodukčních ukazatelů chovu (Jurášek a Dubinsky 1993).

Dikrocelióza má negativní vliv zvláště na růst a vývoj mladých zvířat. V játrech definitivního hostitele působí motolice akutní zánět intrahepatálních biliárních duktů, který postupně přechází na chronickou formu s typickými znaky jako rozšíření duktů, jejich glandulární hyperplazie, proliferace a deskvamace mukózy (Rahko 1972). Patologické změny vznikají nejen působením toxických produktů, které uvolňuje parazit, ale i mechanickým drážděním stěny duktů těly parazitů (Hillyer a Hopla 1998).

Diagnostika dikroceliózy je stále převážně založena na detekci vajíček v exkrementech hostitele a *post-mortem* vyšetření jaterní tkáně. V posledních letech je v popředí zájmu vývoj vhodné imunodiagnostické metody (Otranto a Traversa 2002, Sanchez-Antrade et al. 2003, Manga- Gonzalez et al. 2004, Revilla-Nuin et al. 2005). Výsledky zatím nejsou optimální a spolehlivé, k čemuž může přispívat relativně vysoká variabilita genomu motolic kopinatých (Sandoval et al. 1999).



Obr. 1 – Vývojová stádia motolice kopinaté, (a) dospělá motolice, (b) vajíčka obsahující obrvenou larvu, (c) miracidium, (d) dceřiné sporocyty vyrůstající z mateřského sporocytu, (e) cercárie, (f) slizové koule produkované plžem, (g), (h) metacerkárie (Otrando a Traversa 2003).

2.2 Možnosti prevence a léčby dikroceliózy

Kontrola dikroceliózy způsobené motolicí kopinatou není dodnes zcela uspokojivá. Zahrnuje zejména striktní zásady chovu a adekvátní farmakoterapii (Otrando a Traversa 2003).

Nefarmakologických metod, které se dají v prevenci této nákazy použít, je několik. Jsou to opatření chovatelů z hlediska doby pastvy, jako je restrikce pasení zvířat v brzkých ranních hodinách, nebo naopak v pozdních večerních hodinách, kdy je vyšší pravděpodobnost výskytu mravenců na vrcholcích trav. Dále je možné se zaměřit

proti mezihostitelům parazita, například použitím kyanidu vápenatého (látka zabíjející měkkýše) nebo jiných chemických prostředků. Tato metoda však není příliš vhodná jak z hlediska vysokých nákladů, tak i z ekologického hlediska. Alternativní metodou prevence by mohl být chov drůbeže v místě výskytu nákazy. Došlo by tak k vyhubení měkkýšů a mravenců (Badie a Rodeland 1988).

Strategie terapie dikroceliózy je u všech druhů napadených zvířat převážně totožná. Je možné použít několik látek. Jedná se o benzimidazolová anthelmintika (albendazol), anthelmintika z řady prazinoisochinolinových derivátů (prazikvantel), z řady halogenovaných salicylanilidů (klosantel) a jiné látky (diamfenetid). V současnosti jsou upřednostňována benzimidazolová anthelmintika (Plumb 1999). Benzimidazoly (albendazol, fenbendazol, mebendazol, cambendazol, thiobendazol) a probenzimidazoly (thiaphanat, netobimin) jsou používány proti motolici kopinaté ve vyšších dávkách než u oblych červů a tasemnic, a to s úspěšností 63,2 až 100 % v závislosti na látce, dávce a způsobu podání (Otrando a Traversa 2002). Na základě epidemiologie motolice kopinaté a jejích mezihostitelů, je vhodné podrobit zvířata léčbě dva až třikrát ročně, nejlépe před začátkem jara a před zazimováním na podzim (Otrando a Traversa 2003).

Převážná část populace dospělých dikrocélií se však nachází v užších a chronickým procesem změněných biliárních dukttech, a tak jednorázové podání léčiv většinou nedosáhne žádané účinnosti, a je nutné tato léčiva podávat opakovaně a ve vyšších dávkách. Následným problémem se tak může stát skutečnost, že anthelmintika opakovaným podáním zvířatům ztrácí svoji účinnost, neboli dochází k vývoji helmintorezistence (Köhler 2001, Coles a Stafford 2001). Situaci všeobecně komplikuje omezené množství vhodných léčiv a omezená znalost schopností parazita biotransformovat používaná anthelmintika.

2.3 Enzymatický systém helmintů

V I. fázi biotransformace podstupuje xenobiotikum v organismu oxidativní, redukční nebo hydrolytickou transformaci.

Po mnoho let byly za nejdůležitější enzymy účastníci se metabolismu xenobiotika u helmintů považovány reduktasy a hydrolasy (Precious a Barrett 1989, Barrett 1997). U mnoha helmintů byla potvrzena jak redukční (Cvilink et al. 2009a), tak hydrolytická (Barrett 1997) biotransformace.

Naopak až do nedávna se předpokládalo, že u helmintů chybí systém cytochromu P450 (CYP), který zabezpečuje biotransformaci xenobiotik i eobiotik téměř u všech živočišných druhů (Precious a Barrett 1989, Barrett 1997). V současnosti však existuje mnoho dokladů nejen o přítomnosti genů kódujících CYP, ale také o aktivitě některých enzymů z této rodiny u několika helmintů (Cvilink et al. 2009a).

Účast na metabolismu některých xenobiotik byla popsána také pro peroxidasy (Barrett 1997) a bylo zjištěno, že oxidace může být zprostředkována také flavinmonooxygenasami (Cvilink et al. 2009a).

Z konjugačních enzymů byla nalezena u mnoha helmintů aktivita glutathion S-transferasy (Cvilink et al. 2009a). U jednotlivých druhů helmintů se tento enzym liší jak svou substrátovou specifitou, tak katalytickou aktivitou, a je také možné najít rozdíly přímo v samotné struktuře enzymu (Sheehan et al. 2001). Kromě GST byla u některých helmintů nalezena také aktivita dalších konjugačních enzymů, jako jsou například N-acetyltransferasa (Isaac et al. 1991) a sulfotransferasa (Pica-Mattoccia et al. 2006).

2.3.1 Antioxidační enzymy helmintů

Zvířecí říše poskytuje po dobu téměř celé své existence vhodné prostředí pro parazitické helminty. Je zřejmé, že u těchto parazitů musí existovat určitý mechanismus, pomocí kterého se lépe adaptují na obranné mechanismy svého hostitele (Bruschi a Lucchi 2001).

Z různých adaptačních mechanismů parazitických helmintů se zdají být nejdůležitějšími následující: (1) helminti interferují s komponenty imunitního systému

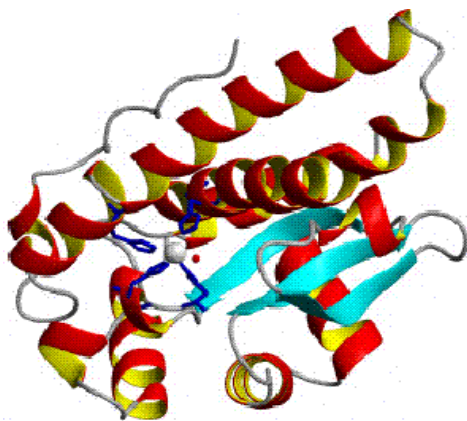
hostitele, které jsou pro ně škodlivé, nebo tyto komponenty neutralizují. Příkladem je inhibice fagocytujících buněk parazitem *Trichinella spiralis* (Bruschi et al. 2000) nebo parazitem *Echinococcus granulosus* (Riganó et al. 2001). (2) u helmintů dochází k expresi antioxidantních enzymů, které slouží k obraně před oxidanty produkoványými imunitním systémem hostitelského organismu (Bruschi a Lucchi 2001).

Za předpokladu, že antioxidantní enzymy produkované helminty hrají důležitou roli v deaktivaci obranných mechanismů hostitele parazitem, inhibice těchto enzymů pomocí imuno- nebo chemoterapie by mohla být cestou k eliminaci helmintů (Bruschi a Lucchi 2001).

2.3.1.1 Superoxid dismutasa

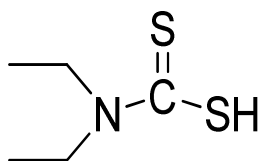
Superoxid dismutasa (SOD) je jedním ze základních a důležitých enzymů identifikovaných u většiny helmintů (Rhoads 1983, Batra et al. 1992, Hong et al. 1992, Mei et al. 1995). Katalyzuje dismutaci superoxidového anionu (O_2^-) na peroxid (H_2O_2) a kyslík (O_2). Superoxidový anion vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku, při autooxidaci flavinů, hydrochinolonů, katecholaminů, thiolů, tetrahydropterinů a hematoproteinů. Mohou z něho vznikat další reaktivní formy kyslíku jako je například hydroxylový radikál, peroxynitrit a kyselina chlorná. SOD urychluje dismutaci superoxidu o čtyři řády a tím chrání organismus před oxidačním stresem.

SOD existuje ve třech základních formách navzájem se lišících atomem kovu, který se nachází v aktivním místě enzymu. SOD obsahující atom železa (FeSOD) byla nalezena u protozoí, řas a některých vyšších organismů. SOD obsahující atom manganu (MnSOD) byla ve vysokých koncentracích identifikována v mitochondriích (Wiesiger a Fridovich 1973), stejně jako SOD obsahující měď/zinek (Cu/ZnSOD), u většiny zvířat včetně helmintů (McCord a Fridovich 1969).



Obr. 2 – Lidská mitochondriální MnSOD (Superoxide dismutase - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

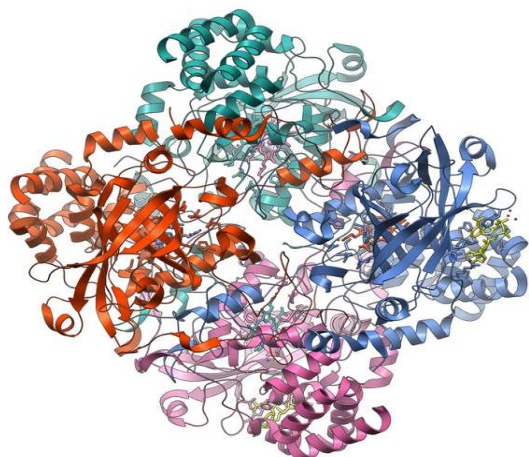
Inhibitorem tohoto enzymu je diethyldithiokarbamát (DDC) (Bumay et al. 2005, Matsumura et al. 2001).



Obr. 3 – Chemická struktura diethyldithiokarbamát

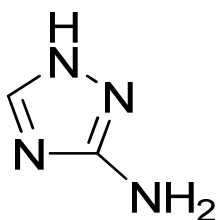
2.3.1.2 Katalasa

Katalasa je tetramerní protein z třídy oxidoreduktas. Každá její podjednotka obsahuje hematin jako prostetickou skupinu, a díky tomu je tento enzym schopen přenášet elektrony. Katalyzuje dismutaci peroxidu vodíku (ve vyšších koncentracích je toxický) na vodu a kyslík, slouží tedy jako antioxidant. Navazuje spolu s peroxidasami na činnost SOD. Je přítomna ve většině organismů a tkání, avšak nenachází se v anaerobech. Její aktivita byla nalezena také u některých hlístic (Bruschi a Lucchi 2001).



Obr. 4 – Struktura enzymu katalasy (Catalase - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

Mezi inhibitory katalasy patří 3-amino-1,2,4- triazol (AT) (Bayliak et al. 2008, Halliwell a Gutteridge 1999a).



Obr. 5 – Chemická struktura 3-amino-1,2,4,- triazolu

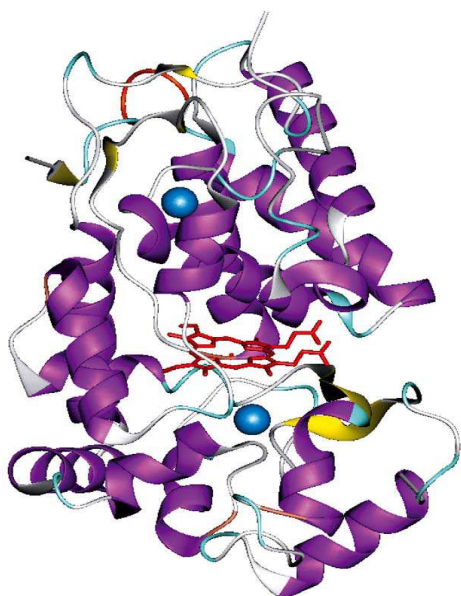
2.3.1.3 Peroxidasy

Peroxidasy reprezentují významnou skupinu enzymů, které jsou efektivní v biotransformaci fenolů, azobarviv, redukčních metabolitů nitro-aromátů a aromatických aminů. Peroxidasy redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní látky nebo xenobiotika).

Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat H_2O_2 , zatímco spektrum oxidovaných sloučenin je velmi široké. Peroxidasy jsou bohatě zastoupeny především v rostlinné říši a v nižších houbách, méně pak v tkáních živočichů a mikrobiálních buňkách. Typickou vlastností peroxidasy je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí (klasické peroxidasové redoxní reakce

vedoucí k dehydrogenaci, halogenace a dehalogenace, oxidace halogenidů, oxidační kondenzace aromatických aminů, oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů, degradace ligninů, dekarboxylační reakce, oxidační štěpení azoskupiny).

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny (Stiborová et al. 2000), jejich prostetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Existují peroxidasy s pozměněným porfyrinovým skeletem, v jiných porfyrinový skelet dokonce chybí. Takové peroxidasy obsahují např. ionty manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+}) (Stiborová et al. 2000). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové a ostatní peroxidasy.



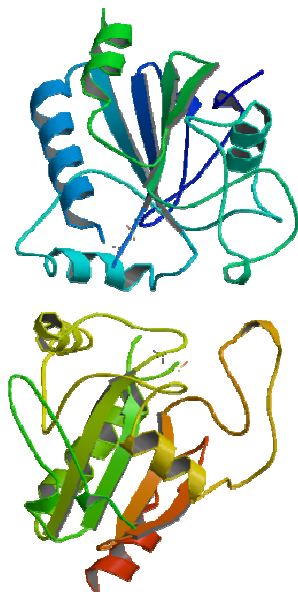
Obr. 20 – Struktura peroxidasy izolované z křenu selského (Veitch 2004)

Katalytický cyklus peroxidasy je zahájen vazbou H_2O_2 nebo jiného peroxidu ($ROOH$) na nativní peroxidasu, přičemž se enzym aktivuje. Vzniklá sloučenina I nese aktivovaný kyslík. Přítomnost reaktivního radikálu je pravděpodobně příčinou nestability sloučeniny a její krátké doby života (v řádech sekund a minut) v závislosti na druhu peroxidasy a na koncentraci H_2O_2 . Reakcí sloučeniny I se substrátem (donorem elektronů) vzniká sloučenina II (Smulevich et al. 1994) a radikál substrátu. Elektronem vytrženým z molekuly substrátu se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku peroxidasy. Cyklus se uzavírá reakcí sloučeniny II s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním, nativním stavu.

Mezi inhibitory peroxidas patří merkaptosukcinát (MS) (Baud et al. 2004, Sokolova et al. 2001) a kyselina salicylhydroxamová (SHK) (Allan a Walker 1988, Ikeda-Saito et al. 1999, Weis et al. 1996).

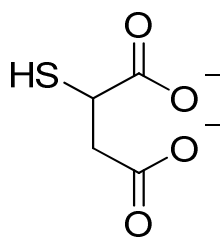
2.3.1.4 Glutathionperoxidasa

Glutathionperoxidasa (GPx) je tetramer patřící do třídy oxidoreduktas. Skládá se z identických podjednotek, z nichž každá obsahuje ve svém aktivním místě selen kovalentně vázaný na molekulu cysteinu. Existuje několik jejích forem, GPx1 až GPx5. Jejím hlavním úkolem je eliminace peroxidu vodíku. Je lokalizovaná v cytosolu a mitochondriích a její aktivita byla nalezena ve všech savčích tkáních. Byla také identifikována, i když v nízkých koncentracích, u většiny helmintů (Bruschi a Lucchi 2001).

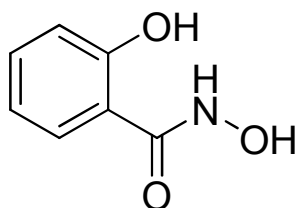


Obr. 6 – Chemická struktura GPx1 (Glutathione peroxidase - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

Mezi inhibitory glutathionperoxidasy patří merkaptosukcinát (MS) (Baud et al. 2004, Sokolova et al. 2001) a kyselina salicylhydroxamová (SHK) (Allan a Walker 1988, Ikeda-Saito et al. 1999, Weis et al. 1996).



Obr. 7 – Chemická struktura merkaptosukcinátu, ionizovaná forma

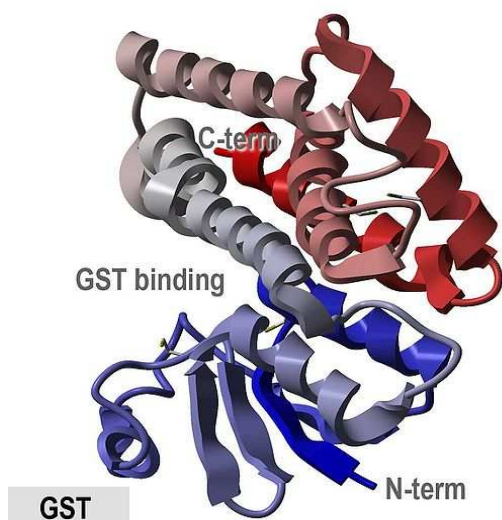


Obr. 8 – Chemická struktura kyseliny salicylhydroxamové

2.3.1.5 *Glutathion S-transferasa*

Glutathion S-transferasa (GST) je enzym druhé fáze biotransformace katalyzující konjugaci substrátů s glutathionem (GSH). Tento fyziologicky významný tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin) má kromě účasti na biotransformaci xenobiotik i další funkce. Je silným nukleofilním konjugačním činidlem, které reaguje s látkami obsahujícími elektrofilní atom uhlíku nebo jiný elektrofilní heteroatom (O, N, S). GST se v organismu nacházejí ve většině tkání, na subcelulární úrovni jsou lokalizovány převážně v cytosolu (Parkinson 2001).

Tento enzym patří do rodiny dimerických izoenzymů asociovaných k membráně a k cytosolu. Jednou z jeho úloh je odstraňování hydroperoxidů lipidů (ale ne peroxidu vodíku), funguje tedy jako antioxidant (Brophy a Barret 1990, Roche et al. 1996). Tato její role byla popsána u některých helmintů (Bruschi a Lucchi 2001).

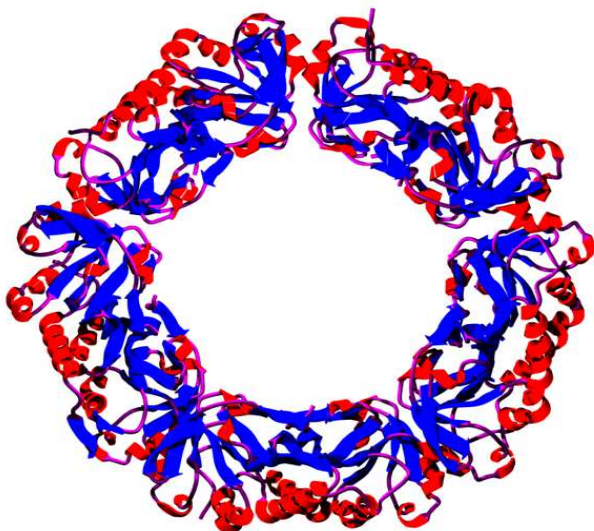


Obr. 9 – Chemická struktura GST (Glutathione S-transferase - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

2.3.1.6 Peroxiredoxin

Peroxiredoxiny jsou novou rodinou antioxidačních enzymů, která je charakteristická přítomností -SH skupin ve své molekule. Role peroxiredoxinu spočívá v redukci peroxidu vodíku za současné vlastní oxidace. Následně je regenerován thioredoxinem a ten zase thioredoxinreduktasou využívající NADPH. Dle experimentálních genetických modifikací se systém peroxiredoxin/thioredoxin jeví důležitější než glutathionperoxidasa (Halliwell a Gutteridge 1997b, Lane 2002). Peroxiredoxiny jsou rozděleny do tří rodin na základě sekvence aminokyselin. Jsou to typický 2-Cys peroxiredoxin, 2-Cys atypický peroxiredoxin a 1-Cys peroxiredoxin (Claiborne et al. 1999).

Předpokládá se, že u těch helmintů, u kterých byla nalezena vysoká aktivita SOD a zároveň chybí aktivita GPx, jsou právě peroxiredoxiny navazujícím detoxifikačním enzymem (McGonigle et al. 1998).



Obr. 10 – Struktura bakteriálního peroxidoxinu (Peroxiredoxin - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

2.3.1.7 Antioxidační enzymy motolice jaterní

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) je jedním z několika helmintů, u nichž byly zkoumány a popsány enzymatické systémy. Vzhledem k tomu, že tento helmint sdílí s motolicí kopinatou jak třídu (Trematoda), tak podtřídu (Digenea), jsou tedy nejbližšími příbuznými druhy, je možné usuzovat o jejich podobnosti i ve spektru enzymů.

Co se týče SOD, byla u tohoto druhu nalezena extracelulární forma Cu/ZnSOD (Piacenza et al. 1998) a také její cytosolická forma (Kim et al. 2000). Také pro enzym GST byla naměřena vysoká aktivita, zejména pro izoenzym GST -7, -47, -51, lokalizovaná v parenchymu a intestinálních lamelách dospělých helmintů (Creaney et al. 1995).

U motolice jaterní byla jako vůbec první identifikována kompletní sekvence peroxidoxinu (McGonigle et al. 1997). Byl identifikován jako 2-cys enzym aktivně sekretovaný v médiu, kde vystupoval proti oxidantům produkovaným hostitelským organismem (McGonigle et al. 1997). Předpokládá se, že tento enzym představuje hlavní strategii detoxikace peroxidu vodíku (McGonigle et al. 1997). Zatím žádné studie neprokázaly přítomnost katalasy v motolici jaterní a pouze malou aktivitu GPx (Bruschi a Lucchi 2001).

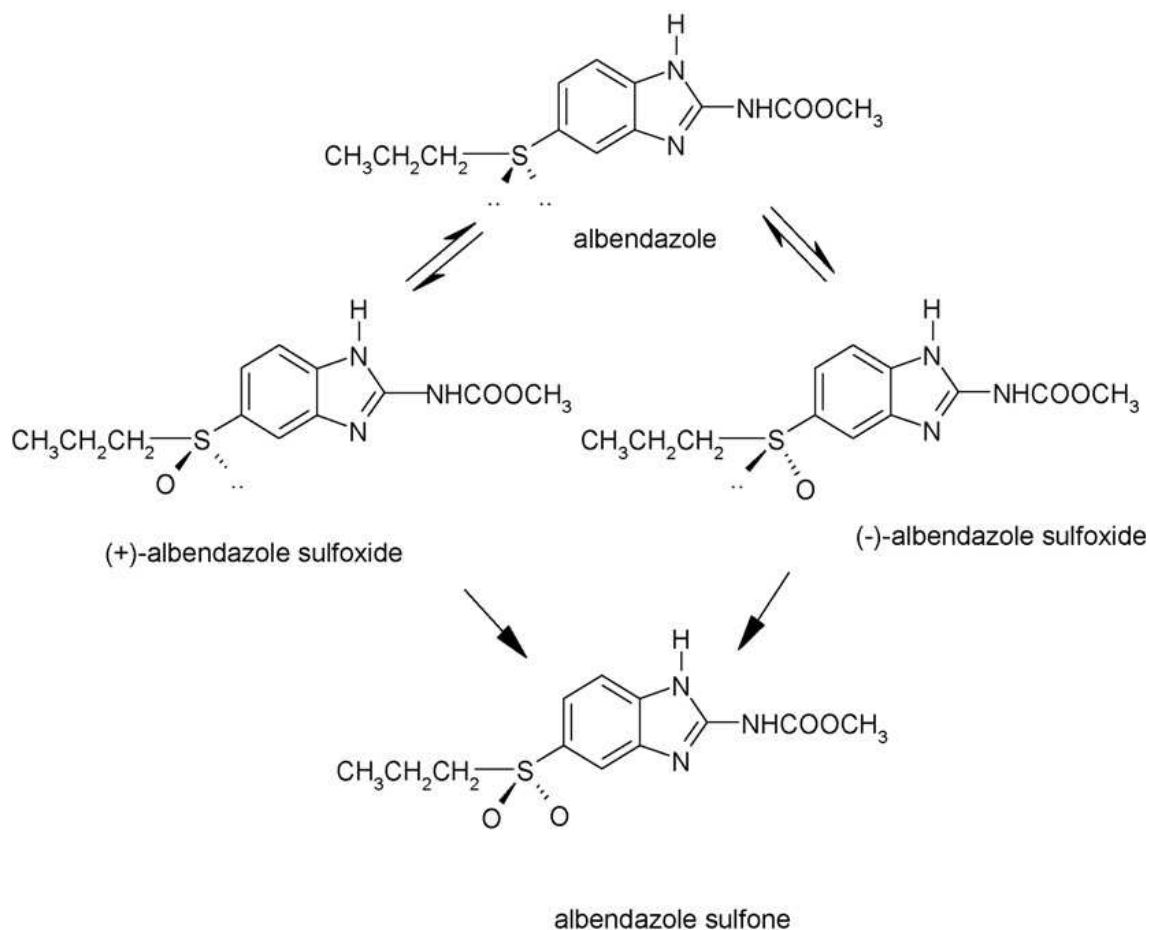
2.4 Metabolismus albendazolu

Albendazol (ABZ) je širokospektré anthelmintikum ze skupiny benzimidazolů používané v terapii různých parazitóz způsobených helminty. Široce se uplatňuje jak ve veterinární, tak v humánní medicíně (Marques et al., 1999). Působí na všechna stádia helmintů, to znamená na larvy i na dospělé jedince. Jeho mechanismus účinku spočívá v bloádě energetického metabolismu parazita prostřednictvím degenerace mikrotubulů střevních buněk parazita, v důsledku čehož dochází ke snížení tvorby ATP.

Jeho metabolismus lze sledovat v několika krocích. V organismu po orálním, parenterálním nebo intraruminálním podání je ABZ rychle oxidován na albendazolsulfoxid (ABSZO) (Marriner a Bogan 1980, Alvarez et al. 1999, Hennessy et al. 1989). ABZSO je zodpovědný za anthelmintickou aktivitu a také za potenciální embryonální toxicitu u některých druhů zvířat (Camphel 1990, Gottschal et al. 1990, Mantovani et al. 1995, Cristofol et al. 2001). ABZSO dále podléhá biokonverzi na albendazolsulfon (ABZSOO), který je farmakologicky neaktivní (Lacey 1990, Lubega et al. 1991).

Flavinmonooxygenasa (FMO) a cytochrom P4503A (CYP3A) jsou mediátory konverze ABZ na ABZSO, přeměna ABZSO na ABZSOO je katalyzována pouze cytochromem P4501A (el Amri et al. 1987, Moroni et al. 1995).

ABZ je metabolizován na dvě enantiomerní formy: (-)-ABZSO a (+)-ABZSO. Je známo, že systém CYP3A generuje zejména (-)-ABZSO, zatímco FMO systém produkuje selektivně (+)-ABZSO (Moroni et al. 1995). ABZSO je považován za aktivní metabolit (Camphel 1990, Gottschall et al. 1990), ale farmakodynamika obou enantiomerů není zatím dostatečně objasněna. Na základě rozdílů enantiomerů v jejich difuzi do parazita, navázání na tubulinový protein a metabolismus v organismu parazita (Alvarez et al. 1999, Solana et al. 2001), je (+)-ABZSO považován za hlavní komponentu zodpovědnou za anthelmintickou aktivitu (Solana et al. 2002).



Obr. 11 – Metabolická dráha albendazolu (Cristofol et al. 2001)

2.5 Enzymy účastníci se metabolismu albendazolu

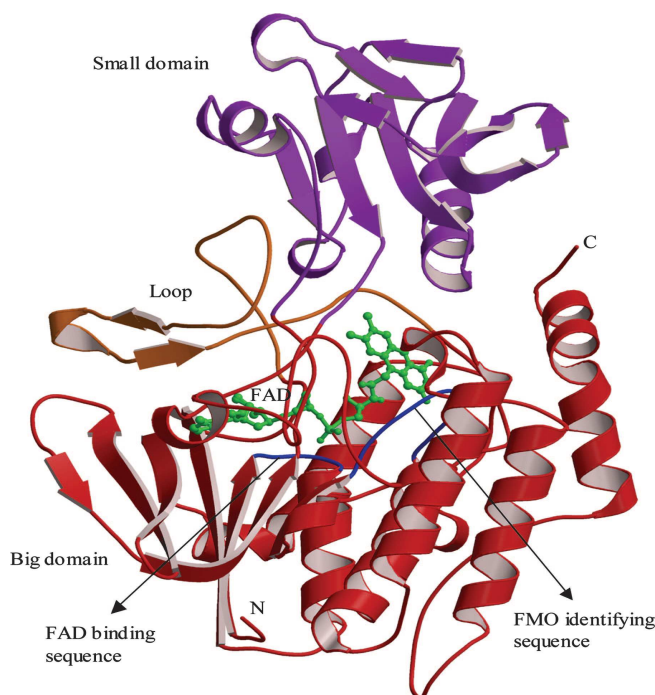
Vzhledem k výše uvedeným dosud známým znalostem o metabolismu albendazolu se tato diplomová práce zaměřila na potvrzení respektive vyloučení účasti některých enzymů na sulfoxidaci ABZ na ABZSO. Jednalo se o tyto enzymy: flavinmonooxygenasy, cytochrom P450, peroxidasy (viz kap. 2.3.1.3 a kap. 2.3.1.4), katalasy (viz kap. 2.3.1.2) a superoxidodismutasu (viz kap. 2.3.1.1).

2.5.1 Flavinmonooxygenasy

Flavinmonooxygenasy (FMO) patří do skupiny monooxygenas. Tyto enzymové systémy katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly hydrofobního substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu.

Mezi substráty FMO patří xenobiotika obsahující nukleofilní atomy (kyslík, síra, dusík, selen) jako jsou acyklické, cyklické a aromatické aminy, amidy, thioly a sulfidy.

FMO se skládá z dvou strukturálních domén spojených polypeptidem. V kanálku mezi doménami se nachází prostetická skupina enzymu, flavinadeninukleotid (FAD) (Eswaramoorthy et al. 2006).

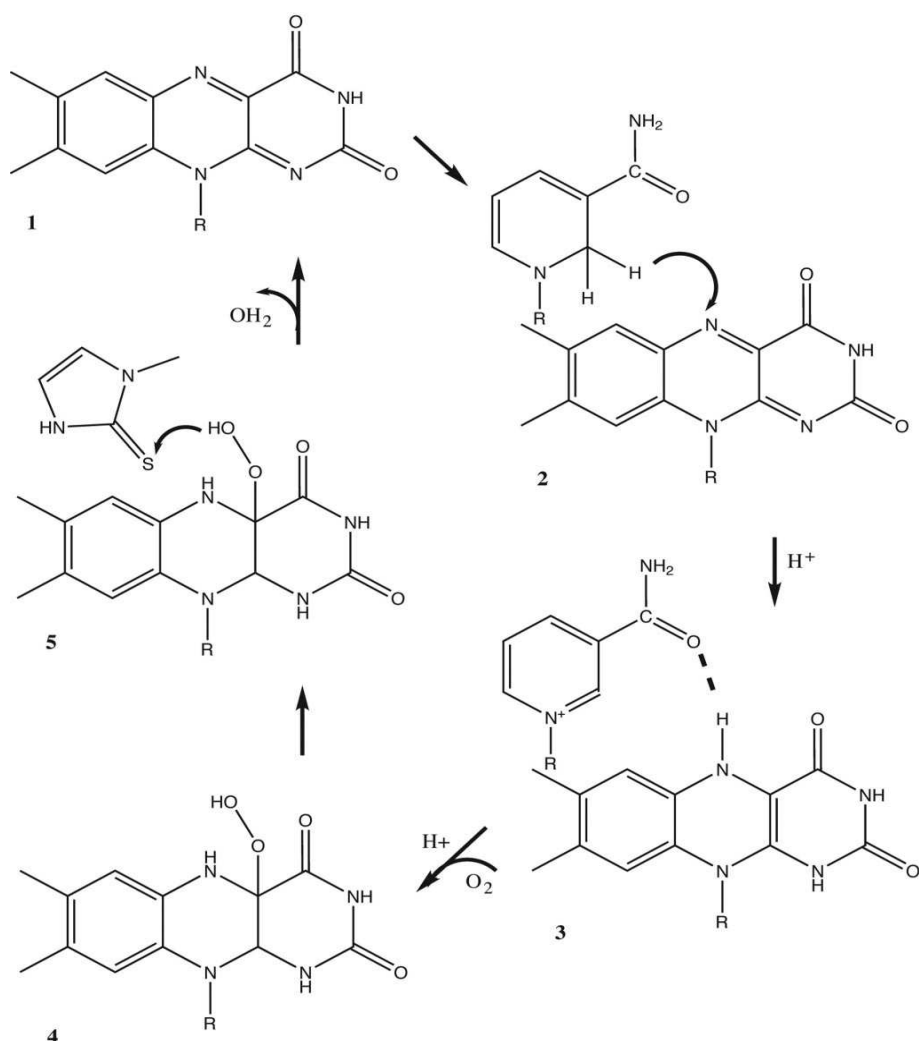


Obr. 12 – Molekulová struktura FMO (Eswaramoorthy et al. 2006)

Katalytická aktivita FMO je závislá na prostetické skupině FAD a kofaktoru NADPH (redukováný nikotinamidadeninukleotidfosfát). Elektronovým nosičem v oxidačně-redukčním procesu je FAD a donorem elektronů je NADPH.

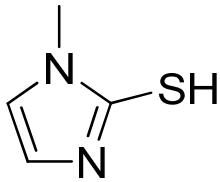
FAD je nejdříve redukován na FADH₂, tak je schopný akceptovat molekulu kyslíku za vzniku FAD-OOH (hydroperoxyflavin). Vhodný substrát s nukleofilním

atomem se naváže na komplex enzym/FAD-OOH a je oxidovaný za současného vzniku molekuly vody (Obr. 13) (Eswaramoorthy et al. 2006).

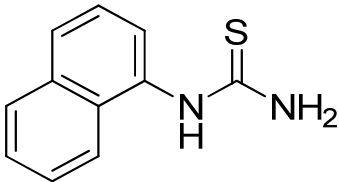


Obr. 13 – Schematické znázornění funkčního mechanismu FMO. Na obrázku jsou znázorněny pouze relevantní části molekul FAD, NADPH a methimazolu jako substrátu (Eswaramoorthy et al. 2006).

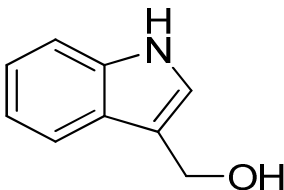
Mezi inhibitory enzymu FMO patří methimazol (MET) (Störmer et al. 2000, Nace et al. 1997, Zieger 1993, Grothusen et al. 1996, Genter et al. 2005), α -nafthylthiourea (ANTU) (Itoh et al. 1993, Chibak et al. 1995) a indol-3-karbinol (I3C) (Ramaian et al. 2001, Larsen a Williams 1996, Katchmart et al. 2000).



Obr. 14 – Chemická struktura methimazolu



Obr. 15 – Chemická struktura α -nafthylthiourey



Obr. 16 – Chemická struktura indol-3-karbinolu

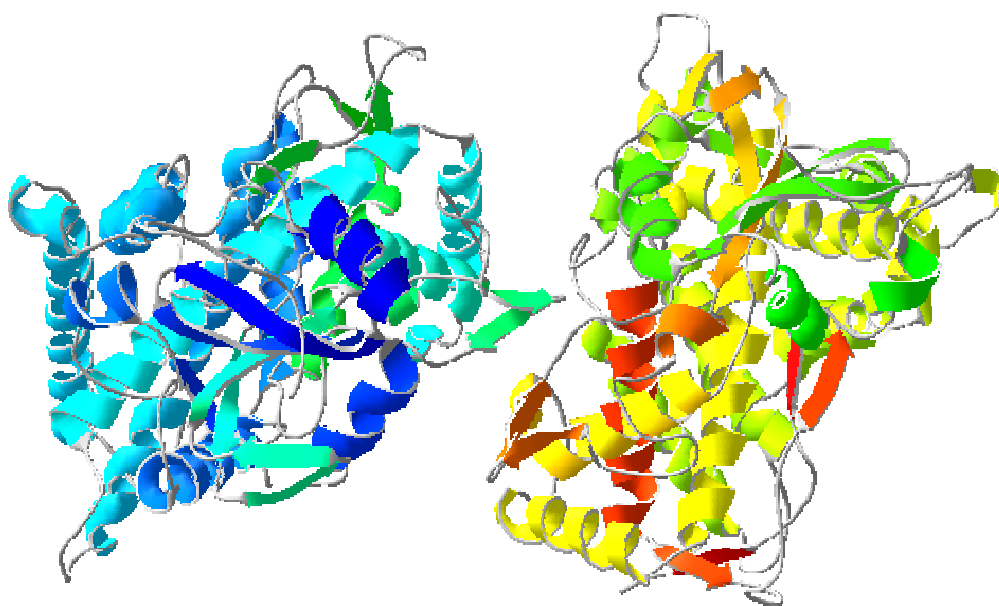
2.5.2 Cytochrom P450

Cytochromy P450 patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek (xenobiotik). Cytochromy P450 jsou v organismu především zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, vedoucí ke změně jejich struktury. Po reakcích II. fáze biotransformace dochází k eliminaci těchto chemických látek z buněk a k jejich exkreci z organismu. Cytochromy P450 katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv, environmentálních chemikálií, ale i látek přírodních či endogenních (Spatzenegger a Jaeger 1995; Guengerich a Shimada 1993; Souček a Gut 1992).

V lidském těle se vyskytují především v játrech, nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách

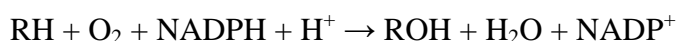
jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií.

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, v nichž je porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních (odlišné spektrální a katalytické vlastnosti) (Anzenbacher et al. 1989; Hudeček et al. 1997). Šestáým ligandem je atom kyslíku molekuly vody.



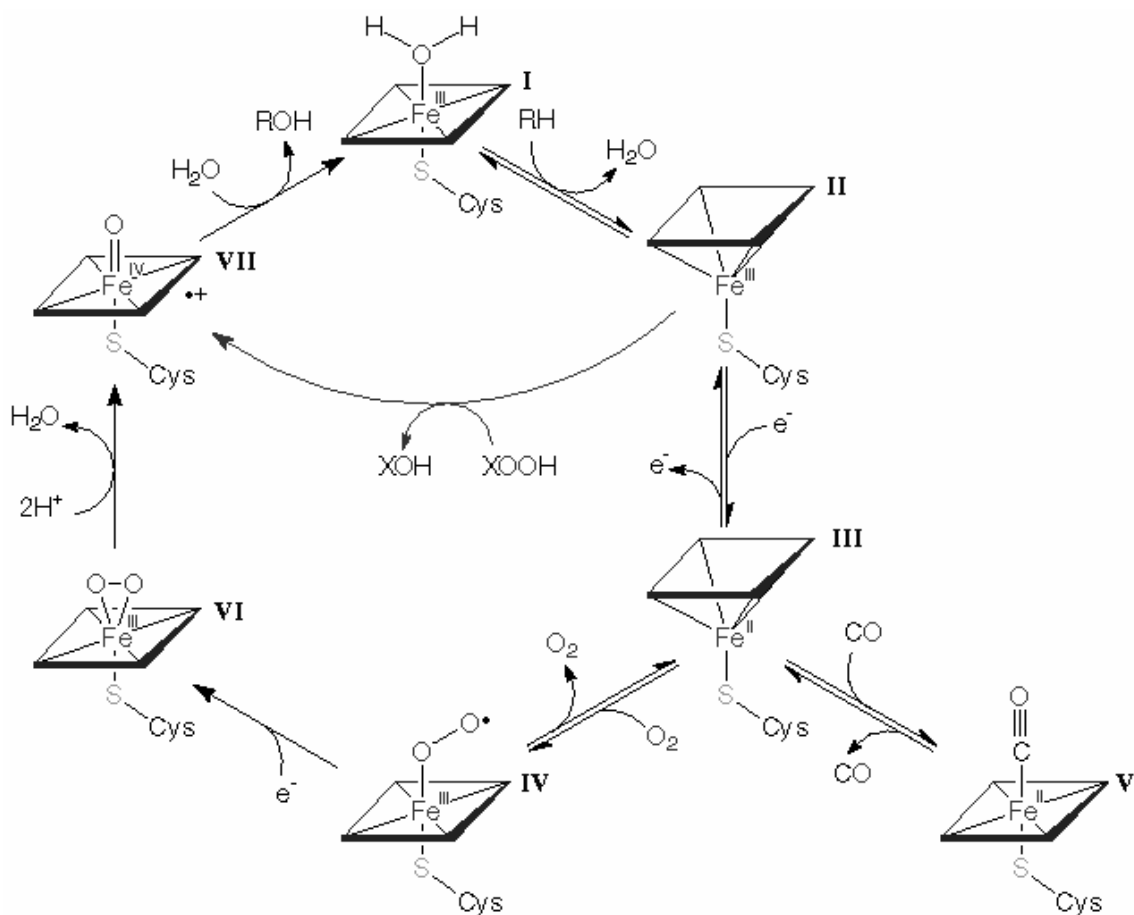
Obr. 17 – Molekulární struktura cytochromu P450 (CYP2C9) (Cytochrome P450 - Wikipedia, the free encyclopedia [online])

Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v endoplazmatickém retikulu – NADPH-cytochrom P450 reduktasou - nebo dalšími enzymy mitochondrií. Reakci lze sumárně vyjádřit jako:



Reakce začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu, nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450. Redukovaný CYP pak aktivuje

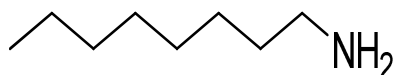
molekulu kyslíku, z níž jeden atom je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody. Vedle kyslíku může CYP pro oxidativní reakce využívat peroxidy a peroxykyseliny. Ty se tak stávají donorem atomu kyslíku (Stiborová et al. 1999).



Obr. 18 – Obecné schéma mechanismu reakce katalyzované cytochromem P450, R – substrát (Stiborová et al. 2004).

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry (stupně) homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul.

V této práci byly jako inhibitory cytochromu P-450 použity diethyldithiokarbamát (DDC) (Saadeddin et al. 2004, Komen a Wanders 2006, Eagling et al. 1998) a oktylamin (OA) (Pathak a Roy 1992, Ubaeud et al. 1999).



Obr. 19 – Chemická struktura oktylaminu

3 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce je součástí projektu „Dikrocelióza hospodářských zvířat – obranné mechanismy motolice před účinky anthelmintik“ podporovaného Grantovou agenturou České republiky (GAČR 524/07/0611).

Hlavním cílem této práce je identifikovat enzymy účastnící se sulfoxidace anthelmintika albendazolu v mikrosomální a mitochondriální frakci motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*), a to pomocí inhibitorů specifických pro jednotlivé enzymy.

Dílními cíli jsou následující:

- Stanovit změnu specifické enzymové aktivity při inhibici jednotlivými inhibitory specifickými pro dané enzymy při inkubaci mikrosomální a mitochondriální frakce s albendazolem a inhibitorem.
- Určit IC₅₀ těch inhibitorů enzymů, které se v průběhu výzkumu jeví jako účinné inhibitory metabolismu albendazolu u motolice kopinaté.
- Získané výsledky porovnat s doposud známými informacemi o metabolismu anthelmintik u motolice kopinaté a jiných helmintů a určit, které z enzymů hrají pravděpodobnou roli v sulfoxidaci albendazolu na albendazolsulfoxid.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Albendazol (ABZ), Sigma

Albendazolsulfoxid (ABZSO), Toronto Research Chemicals.

Albendazolsulfon (ABZSOO), Toronto Research Chemicals.

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný, čtyřsodná sůl, Merck

Dimethylsulfoxid (DMSO), p. a. Sigma

α -Nafthylthiourea (ANTU), Sigma

Methimazol – 2-mercapto-1-methylimidazol (MET), Sigma

Indol-3-karbinol (I3C), Acros Organics

Diethyldithiokarbamát (DDC), Sigma

Kyselina salicylohydroxamová (SHK), Sigma

Merkaptosukcinát (MS), Sigma

Oktylamin (OA), Sigma

3-Amino-1,2,4-triazol (AT), Sigma

4.1.2 Pomůcky a přístroje

Centrifugační kyvety

Skleněný homogenizátor podle Pottera a Elvehjema s teflonovým pístem

Mikrozkumavky

Termomixer Eppendorf

Třepačka Biosan

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5451 D

Vakuová odparka Eppendorf Concentrator 5301

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Centrifuga Beckman Coulter Avanti J-30I

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu 10 AVP

Čtečka Biorad, Microplate Reader, model 550

4.1.3 Biologický materiál

Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*, Obr. 21) byla izolována z jater muflonek (*Ovis musimon*, 7 samic, věk 5-7let) postižených dikroceliózou z oborního chovu ve Vlkově pod Oškobrhem. Muflonky nebyly ovlivněny anthelmintiky.

Po usmrcení muflonek byla játra vyjmuta a vložena do PE sáčku, ponořena do 38°C teplého fyziologického roztoku a transportována do laboratoře, kde byla nařezána na pláty a byly z nich opatrně vymačkány motolice do fyziologického roztoku. Motolice byly vyčištěny od nežádoucích zbytků jaterní tkáně a krve, pak několikrát promyty ve fyziologickém roztoku (38°C) a slity do kádinky. Motolice v kádince byly dále třikrát promyty ve fosfátovém pufru s NaCl (PBS) a zmrazeny v hlubokomrazicím boxu (-80°C).



Obr. 21 – Izolované motolice kopinaté v inkubačním médiu

4.2 Metodika práce

4.2.1 Příprava subcelulárních frakcí z motolice kopinaté

Ze zmražených dikrocelií byl navážen sudý počet směsných vzorků o maximální váze 5 g. Všechny vzorky byly jednotlivě homogenizovány v 30 ml homogenizátoru s 15 ml 0,1 M Na-fosfátovým pufrem pH 7,4 a poté přelity do centrifugačních kyvet.

Subcelulární frakce byly připraveny frakční centrifugací:

Prvním točením, které probíhalo v centrifuze Heraeus (5000 g, 20 min., 4°C), byla odstraněna peleta. Supernatant z prvního točení byl přelit do čistých kyvet a stočen v centrifuze Heraeus (20000 g, 60 min., 4°C). Byla tak získána peleta s mitochondriemi, která byla po odlití supernatantu a slití kalů resuspendována v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru a podrobena třetímu točení v centrifuze Heraeus (20000g, 60 min., 4°C). Supernatant z třetího točení byl slit a peleta resuspendována v 0,1 M Na-fosfátovém pufru s 20% (v/v) glycerolu, opět homogenizována a za stálého míchání rozpipetována (po 0,33 ml) do mikrozkušavek jako frakce mitochondrií.

Supernatant z druhého točení byl přelit do čistých kyvet a stočen v ultracentrifuze Beckman (105000g, 65 min., 4°C). Toto čtvrté točení probíhalo současně s třetím a jeho výsledkem byl supernatant - cytosol, který byl za stálého míchání rozpipetován (po 1,1 ml) do mikrozkušavek.

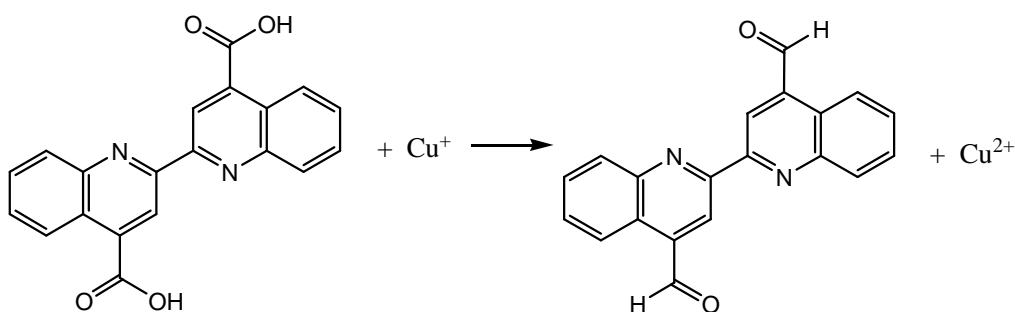
Peleta ze čtvrtého točení byla homogenizována v 0,1 M Na-fosfátovém pufru a opět stočena v ultracentrifuze (program: 105000g, 60 min., 4 °C). Po slití supernatantu z tohoto pátého točení byla peleta obsahující mikrosomální frakci zhomogenizována s 0,1 M Na-fosfátovým pufrem s 20 % glycerolem a z ultrazvukové lázně za stálého míchání rozpipetována (po 0,33 ml) do mikrozkušavek.

Takto připravené vzorky cytosolu, mikrosomů a mitochondrií byly poté zmrazeny v hlubokomrazicím boxu (-80°C).

4.2.2 Stanovení koncentrace bílkovin metodou redukce BCA

Princip:

Principem je reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^+ kationy, které v prostředí pH kolem 10 redukují BCA (bicinchoninovou kyselinu) za vzniku stabilního modrofialového komplexu (Obr. 22). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny a měří se spektrofotometricky. K výpočtu koncentrace bílkoviny ve vzorku se využije rovnice kalibrační přímky (Smith et al., 1985).



Obr. 22 - Schematické znázornění redukce BCA měďnými ionty (Nožinová, 2003)

Pro reakci byly použity roztoky:

- Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Roztok C: Vznikne smícháním roztoků A a B v čas potřeby v poměru 50:1

Z naměřených hodnot absorbancí jednotlivých koncentrací standardu - roztok BSA (hovězí sérový albumin), připravených dle Tab. 1, byla sestavena kalibrační přímka. Pomocí rovnice této přímky byla dále určována koncentrace bílkoviny ve vzorcích. Kalibrační přímka byla tvořena šesti body, pro každý bod bylo měřeno osm paralelních vzorků.

Tab. 1 - Způsob přípravy šesti koncentrací standardu BSA

	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]	Roztok 0,1% BSA [μl]	Redestilovaná 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

Postup:

Subcelulární frakce byly naředěny 20 krát redestilovanou vodou ve dvou paralelkách po čtyřech vzorcích. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 μl vzorku bílkoviny (roztok BSA pro kalibrační přímku, naředěné subcelulární frakce pro vlastní měření) a 200 μl pracovního roztoku C. Současně byly připraveny také slepé vzorky, které místo bílkoviny obsahovaly 10 μl redestilované vody.

Mikrotitrační destička se vzorky byla po intenzivním třepání inkubována 30 minut při 37°C. Poté byla na čtečce Biorad změřena absorbance při 562 nm proti redestilované vodě. Od hodnot absorbance vzorků byl odečten průměr hodnot absorbance slepých vzorků.

4.2.3 Inkubace subcelulárních frakcí se substrátem a inhibitory enzymů**4.2.3.1 Inkubace subcelulárních frakcí s albendazolem****Princip:**

Při inkubaci substrátu – albendazolu – s biologickým materiálem obsahujícím enzymy dochází k přeměně substrátu na jeho metabolity. Zbýlý substrát a metabolity jsou pak následně pomocí intenzivního třepání a centrifugace extrahovány do organické fáze (octan ethylnatý). Organická fáze je odpařena a v odparu stanovena koncentrace parentní látky a metabolitů pomocí HPLC.

Zásobní roztoky:

- 1 mM albendazol v DMSO
- 3 mM NADPH v redestilované vodě
- 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4
- Koncentrovaný amoniak
- Octan ethylnatý

Inkubační směs v celkovém objemu 0,3 ml obsahovala:

- Albendazol 10 μ M
- NADPH 1 mM
- Na-fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4
- Mikrosomy (MIK) nebo mitochondrie (MIT) (neředěné)

Vzorky byly připraveny dle Tab. 2 vždy ve třech paralelkách.

Tab. 2 - Obsah jednotlivých komponent v inkubační směsi s albendazolem.

	ABZ	DMSO	pufr	NADPH	MIT	MIK
SLCH ¹	3 μ l	----	197 μ l	100 μ l	----	----
SLB a ²	----	3 μ l	97 μ l	100 μ l	100 μ l	----
SLB b	----	3 μ l	97 μ l	100 μ l	----	100 μ l
VZ MIT ³	3 μ l	----	97 μ l	100 μ l	100 μ l	----
VZ MIK ⁴	3 μ l	----	97 μ l	100 μ l	----	100 μ l

Postup:

Do mikrozkušavek byly napipetovány jednotlivé komponenty dle Tab. 2 v daném pořadí, přičemž pipetování biologického materiálu probíhalo za teploty 0 °C.

Vzorky byly důkladně promíchány na třepačce a poté inkubovány v termostatu (37 °C, třepání 500 RPM, 30 min.).

Inkubace byla skončena po 30 minutách ochlazením inkubační směsi na 0 °C v ledové lázni a přidáním 30 μ l koncentrovaného amoniaku a 0,7 ml octanu ethylnatého.

¹ SLCH – Slepý chemický vzorek obsahuje místo biologického materiálu 0,1 M Na-fosfátový pufr. Zjišťuje spontánnost chemické reakce se substrátem bez přispění biologického materiálu.

² SLB – Slepý biologický vzorek obsahuje DMSO (rozpuštědlo substrátu) místo substrátu. Zjišťuje potenciální přítomnost látek podobných substrátu v samotném biologickém materiálu.

³ MIT - mitochondrie

⁴ MIK - mikrosomy

Po intenzivním třepání na třepačce (2 min.) byly vzorky stočeny na centrifuze (5000 otáček/min., 3 min.). Vrchní vrstva byla přenesena do nových označených mikrozkušavek a odpařena v koncentrátoru (45 °C, cca 20 min.).

Suché vzorky byly poté uschovány v chladu a temnu.

4.2.3.2 Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory enzymů

Při inkubacích byly použité následující inhibitory:

Inhibitory FMO:

- α -Nafthylthiourea (ANTU)
- Indol-3-karbinol (I3C)
- Methimazol (MET)

Inhibitory katalasy:

- 3-Amino-1,2,4-triazol (AT)

Inhibitory CYP:

- Diethyldithiokarbamat (DDC) (také inhibitor SOD)
- Oktylamin (OA)

Inhibitory peroxidasy a glutathionperoxidasy:

- Kyselina salicylohydroxamová (SHK)
- Merkaptosukcinát (MS)

Použité zásobní roztoky, složení inkubační směsi a postup byly u jednotlivých inkubací identické. Princip metody se shoduje s principem inkubace subcelulárních frakcí s albendazolem s rozdílem v případné inhibici enzymů.

Zásobní roztoky:

- 10 mM inhibitor v DMSO nebo redestilované vodě⁵
- 1 mM albendazol v DMSO
- 3 mM NADPH v redestilované vodě
- 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4

⁵ Z použitých inhibitorů byl jako jediný ve vodě rozpustný merkaptosukcinát

- Koncentrovaný amoniak
- Octan ethylnatý

Inkubační směs v celkovém objemu 0,3 ml obsahovala:

- Inhibitor 100 μ M
- Albendazol 10 μ M
- NADPH 1 mM
- Na-fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4
- Mikrosomy nebo mitochondrie (neředěné)

Vzorky byly připraveny dle Tab. 3 vždy ve třech paralelkách.

Tab. 3 – Obsah jednotlivých komponent v inkubační směsi s inhibitory.

	ABZ	pufr	NADPH	Inhibitor	MIT	MIK
SLCH	3 μ l	197 μ l	100 μ l	----	----	----
SLCH-I ⁶	3 μ l	194 μ l	100 μ l	3 μ l	----	----
MIT	3 μ l	94 μ l	100 μ l	3 μ l	100 μ l	----
MIK	3 μ l	94 μ l	100 μ l	3 μ l	----	100 μ l

Postup:

Do mikroskopavek byly napipetovány jednotlivé komponenty dle Tab. 3, přičemž pipetování biologického materiálu probíhalo za teploty 0 °C.

Vzorky byly důkladně promíchány na třepačce a poté inkubovány v termostatu (37 °C, třepání 500 RPM, 30 min.).

Inkubace byla skončena po 30 minutách ochlazením inkubační směsi na 0 °C v ledové lázni a přidáním 30 μ l koncentrovaného amoniaku a 0,7 ml octanu ethylnatého.

Po intenzivním třepání na třepačce (2 min.) byly vzorky stočeny na centrifuze (5000 otáček/min., 3 min.). Vrchní vrstva byla přenesena do nových označených mikroskopavek a odpařena v koncentrátoru (45 °C, cca 20 min.).

Suché vzorky byly poté uschovány v chladu a temnu.

⁶ SLCH – I – Slepý chemický vzorek s inhibítorem obsahuje místo biologického materiálu 0,1 M Na-fosfátový pufr. Zjišťuje spontánnost chemické reakce se substrátem a inhibítorem bez přispění biologického materiálu.

U dvou nejefektivnějších inhibitorů, methimazolu a ANTU, byly provedeny inkubace v koncentrační řadě (Tab. 4) za účelem zjištění hodnoty IC 50. Vzorky byly připraveny podle Tab. 3.

Tab. 4 – Koncentrace inhibitorů v koncentrační řadě

Zásobní roztok inhibitoru (mM)	Koncentrace inhibitoru v inkubační směsi (μM)
0,2	2
0,5	5
1	10
5	50
10	100

Pro inhibitor ANTU byla provedena také inkubace s nižšími koncentracemi uvedenými v Tab 5.

Tab. 5 – Nižší koncentrace ANTU v koncentrační řadě

Zásobní roztok inhibitoru (mM)	Koncentrace inhibitoru v inkubační směsi (μM)
0,01	0,1
0,025	0,25
0,050	0,5
0,1	1
0,15	1,5
0,2	2

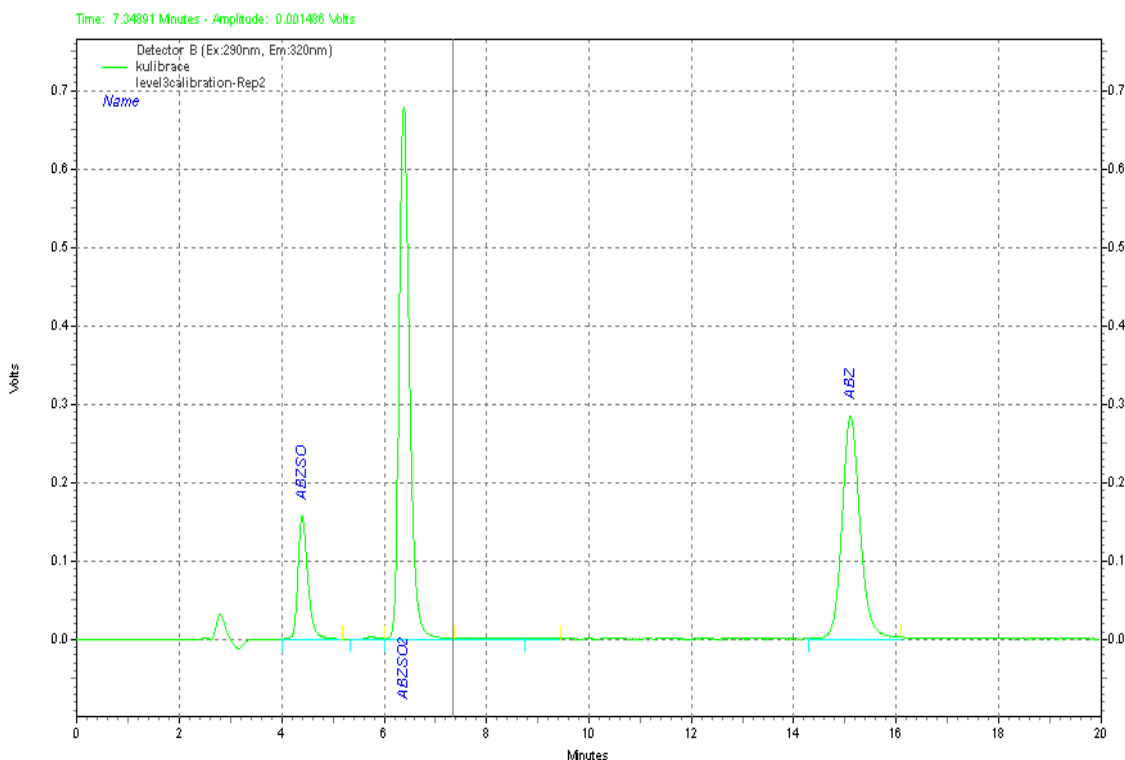
4.2.4 HPLC analýza

Před vlastním provedením HPLC byly odparky rozpuštěny v 500 μ l mobilní fáze, kterou tvořila směs acetonitrilu (ACN) a fosfátového pufru (0,025 M KH_2PO_4 ; pH 3) v poměru 1:2 v/v. Nástřik na kolonu byl 50 μ l.

HPLC analýza byla provedena na přístroji Shimadzu 10 AVP. Byla použita kolona LiChroCART® (250x3 mm) s náplní LiChrospher® 60 RP-select B (5 μ m) a předkolonka LiChroCART® (4x4 mm) se stejnou stacionární fází. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,5 ml/min. Analýza probíhala za tlaku 14,3 MPa a při teplotě 25°C. Jednotlivé složky vzorku separované v koloně byly detekovány fluorescenčním detektorem Shimadzu RF 10 AXL ($\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 320$ nm).

K detekci ABZ, ABZSO, ABZSOO byly použity standardy zakoupené u firem Sigma a Toronto Research Chemicals.

Totožnost se ověřuje na základě shody retenčních časů a spekter standardů a zkušeneho léčiva – v našem případě: ABZ a jeho metabolitů ABZSO, ABSZOO.



Obr. 23 - Ukázkový chromatogram dělení standardů albendazolu (ABZ) a jeho metabolitů albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO).

Z chromatografického záznamu dělení standardů lze vyčíst, že nejkratší dobu je na koloně zadržován ABZSO - jeho pík se objevuje mezi 4. – 5. minutou; pak je z kolony uvolňován ABZSOO mezi 6. – 7. minutou; až před 15 minutou se z kolony začíná uvolňovat ABZ (Obr. 23).

Velkou výhodou HPLC je možnost současného kvalitativního a kvantitativního hodnocení separovaných složek vzorku. Z plochy chromatografických píků lze vypočítat obsah jednotlivých účinných látek zkoušeného vzorku pomocí předem připravené kalibrační křivky.

4.2.5 Statistická analýza

Statistická analýza naměřených dat byla provedena pomocí Studentova nepárového T-testu. Byla použita šablona T test NMiS, která slouží pro zadání hodnoty rozsahů měření, průměrů a směrodatných odchylek dvou porovnávaných souborů.

Jako kontrolní hodnota byla vždy použita hodnota specifické enzymové aktivity neinhibovaného vzorku pro daný inhibitor a danou subcelulární frakci. Pomocí T-testu se nám podařilo zjistit, zda byla inhibice prokázána a způsobila změnu střední hodnoty u pokusného souboru ve srovnání s kontrolním souborem, a to se spolehlivostí 95%.

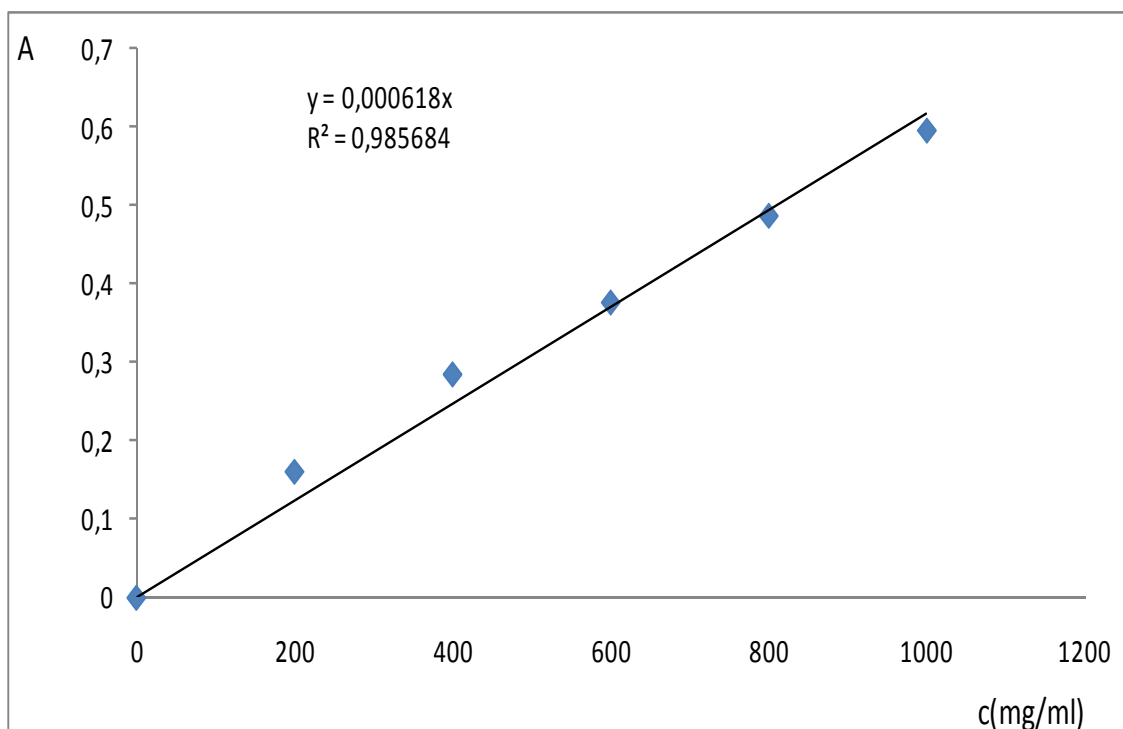
5 VÝSLEDKY

5.1.1 Stanovení obsahu bílkovin

Obsah bílkovin byl stanoven metodou redukce BCA (viz kap. 4.2.2). Pomocí spektrofotometru byla změřena intenzita zbarvení vzniklého stabilního modrofialového komplexu (Obr. 22). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny nacházející se ve vzorku. K výpočtu koncentrace bílkoviny ve vzorku bylo využito rovnice kalibrační přímky (Smith et al., 1985).

Kalibrační křivka (Obr. 24) byla sestavena z naměřených hodnot absorbancí jednotlivých koncentrací roztoku BSA, připravených dle Tab. 1. Kalibrační přímka byla tvořena šesti body, pro každý bod bylo měřeno osm paralelních vzorků.

Pomocí rovnice této kalibrační křivky byla dále určována koncentrace bílkoviny v jednotlivých vzorcích (viz Tab. 6).



Obr. 24 – Kalibrační křivka pro stanovení obsahu bílkovin (závislost absorbance na koncentraci bílkovin c (mg/ml)). Každý koncentrační bod je průměrem z osmi měření dané koncentrace.

Tab. 6 – Koncentrace bílkovin pro MIK a MIT vypočítané pomocí rovnice kalibrační křivky.

	MIK	MIT
koncentrace (mg/ml)	1,64 ± 0,20	2,55 ± 0,28

Jednotlivé hodnoty koncentrace bílkovin pro mitochondriální a mikrosomální frakci byly dále použity pro výpočet specifické enzymové aktivity vzorku u zkoumaných inhibitorů.

5.1.2 Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory methimazolem, α -nathylthioureou a indol-3-karbinolem

MET (Störmer et al. 2000, Nace et al. 1997, Zieger 1993, Grothusen et al. 1996, Genter et al. 2005), ANTU (Itoh et al. 1993, Chibak et al. 1995) a I3C (Ramaian et al. 2001, Larsen a Williams 1996, Katchmart et al. 2000) jsou inhibitory flavinových monooxygenas.

Inkubace subcelulárních frakcí (mikrosomů – MIK, mitochondrií – MIT) připravených z motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) s albendazolem, koenzymem NADPH a s inhibitory ANTU, MET a I3C byla provedena podle výše uvedené metody (kap. 4.2.3.2).

Po změření vzorků pomocí HPLC byly získány hodnoty koncentrace (ng/ml) jednotlivých metabolitů albendazolu – albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO). Pomocí známých molekulových hmotností metabolitů a koncentrací bílkovin v daném biologickém materiálu byla vypočítána specifická aktivita enzymu (pmol/min/mg) a tyto hodnoty pro dané inhibitory byly vyneseny do grafu.

Tab. 7 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a inhibitorem ANTU v koncentraci 100 μ M

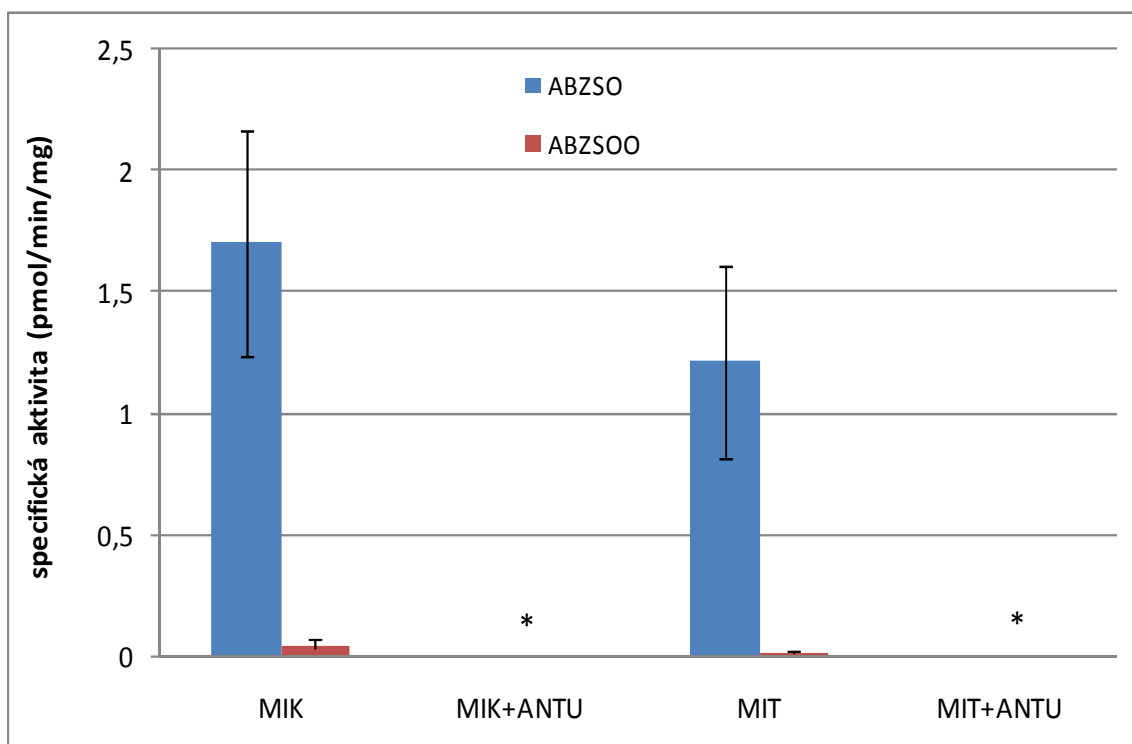
	MIK	MIK+ANTU	MIT	MIT+ANTU
ABZSO (pmol/min/mg)	1,71 \pm 0,47	0*	1,22 \pm 0,40	0*
ABZSOO (pmol/min/mg)	0,04 \pm 0,02	0*	0,01 \pm 0,003	0*

*Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

Tab. 8 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a s inhibitorem MET v koncentraci 100 μ M

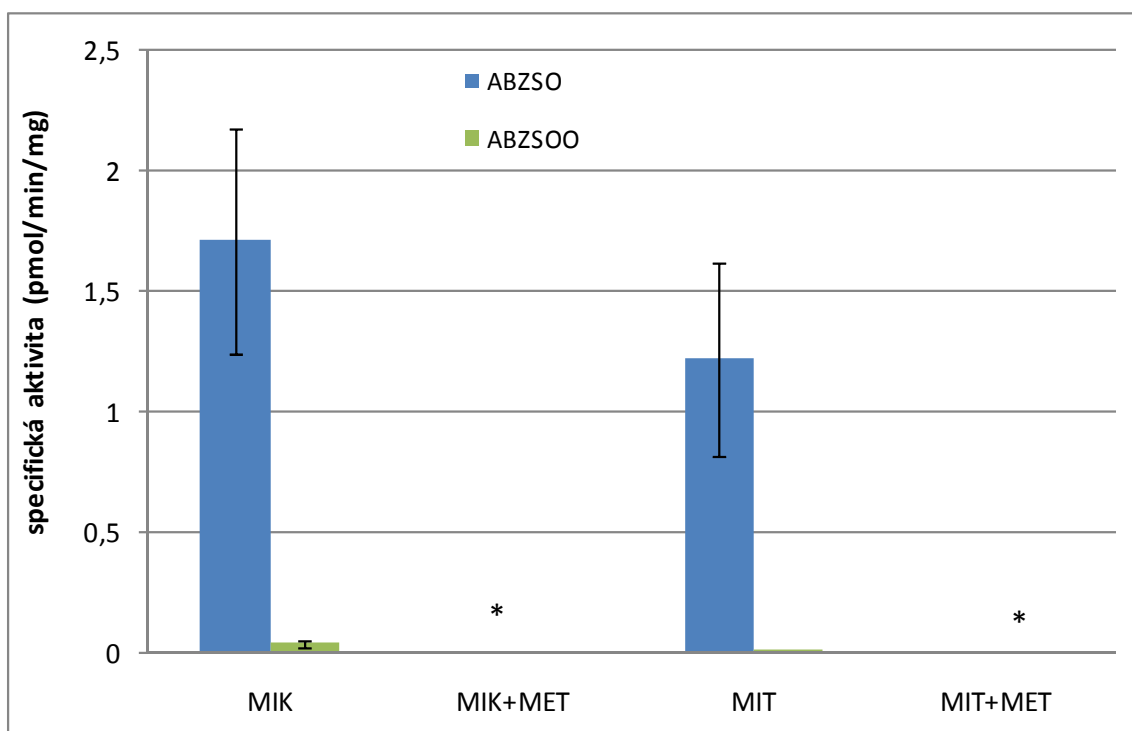
	MIK	MIK+MET	MIT	MIT+MET
ABZSO (pmol/min/mg)	1,71 \pm 0,47	0*	1,22 \pm 0,40	0*
ABZSOO (pmol/min/mg)	0,04 \pm 0,02	0*	0,01 \pm 0,003	0*

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr 25 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU (100 μM)

* Hodnoty statisticky významně odlišné (p < 0,05) od neinhibovaného vzorku



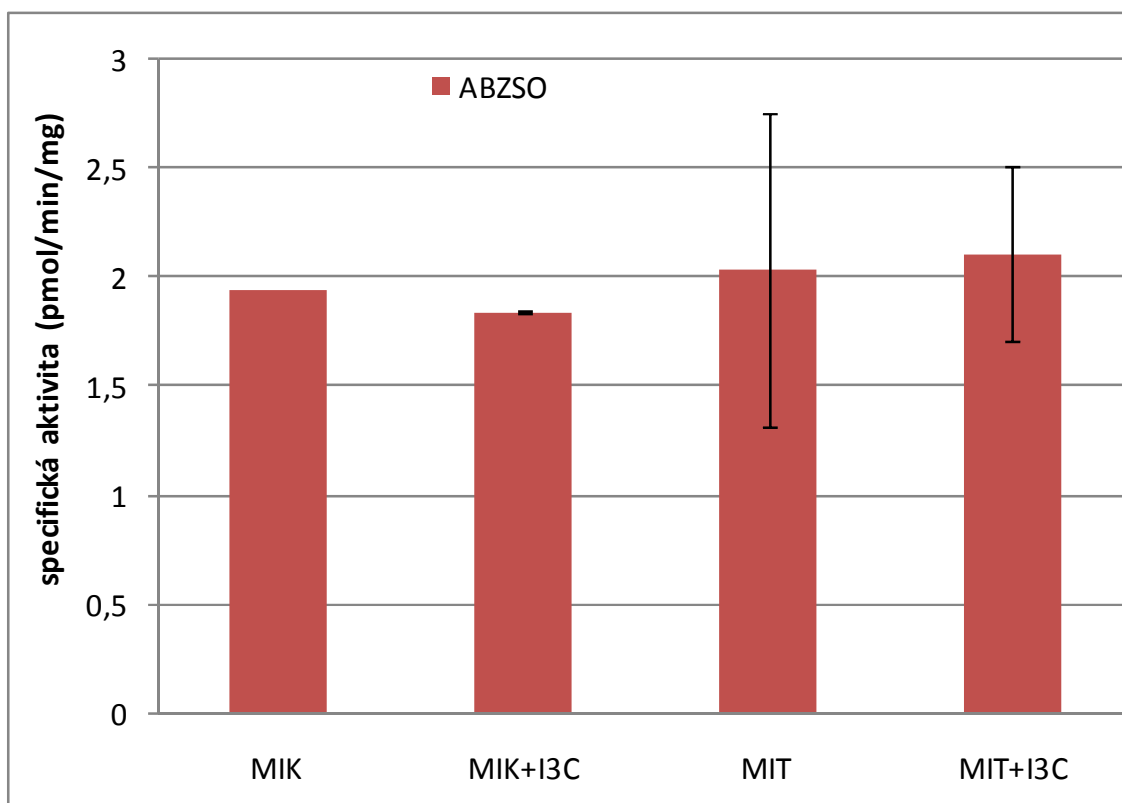
Obr 26 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru MET (100 μM)

* Hodnoty statisticky významně odlišné (p < 0,05) od neinhibovaného vzorku

V tabulkách a grafech (Tab. 7 a 8, Obr. 25 a 26) jsou zobrazeny hodnoty specifických enzymových aktivit (pmol/min/mg) pro jednotlivé metabolity a jejich směrodatné odchylky. Při inhibici enzymu inhibitory ANTU a MET byly hodnoty specifické aktivity enzymu nulové. Hodnoty enzymové aktivity enzymu metabolizujícího ABZ byly v MIK i MIT statisticky významně sníženy jak pro inhibitor ANTU tak i pro inhibitor MET. Vzhledem k tomu, že při inhibici těmito enzymy nevzniká ani jeden z metabolitů a specifická enzymová aktivita je nulová, lze tuto inhibici považovat za stoprocentní.

Tab. 9 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a s inhibitorem I3C v koncentraci 100 μ M

	MIK	MIK+I3C	MIT	MIT+I3C
ABZSO (pmol/min/mg)	1,95 \pm 0,01	1,84 \pm 0,72	2,03 \pm 0,40	2,11 \pm 0,08
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0	0	0



Obr 27 - Grafické znázornění tvorby ABZSO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μ M ABZ a s 10 μ M ABZ v přítomnosti inhibitoru I3C (100 μ M)

Při inhibici indol-3-karbinolem nebyly naměřeny žádné hodnoty ABZSOO, proto se v grafu tyto nulové hodnoty neuvádí.

Specifická aktivita enzymu metabolizujícího ABZ nebyla statisticky významně ovlivněna inhibitorem I3C.

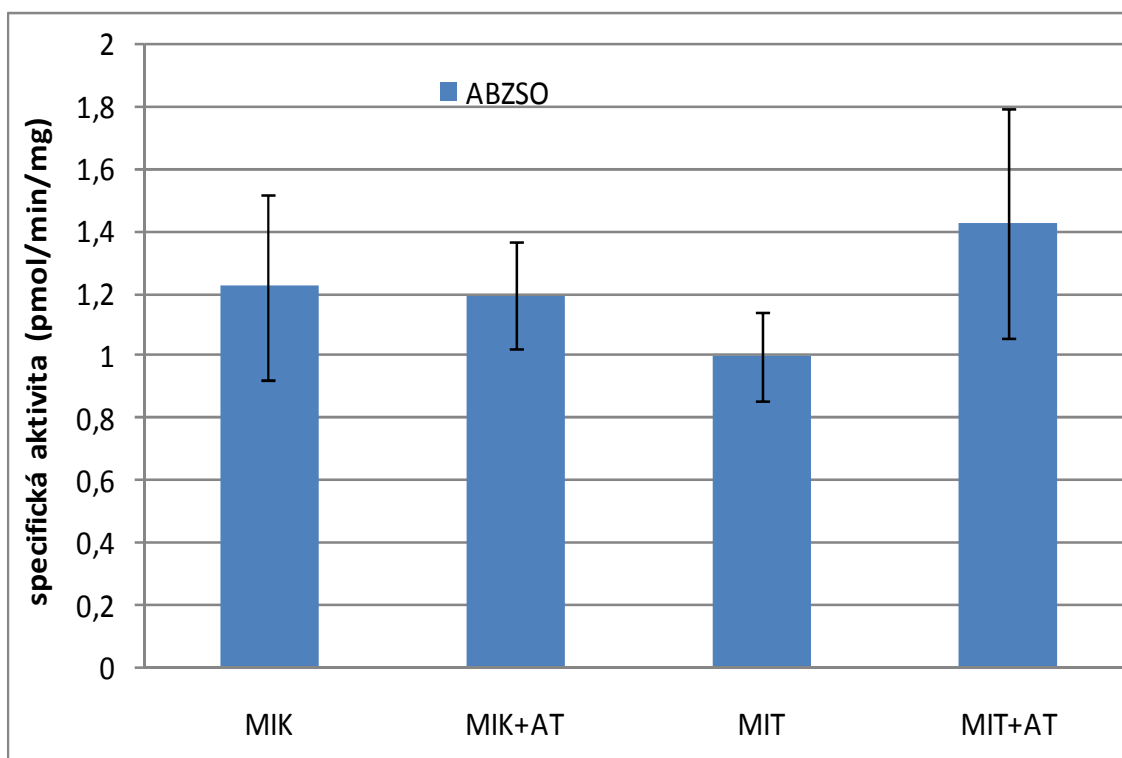
5.1.3 Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitorem 3-amino-1,2,4-triazolem

3-Amino-1,2,4-triazol (AT) je inhibitorem katalasy (Bayliak et al. 2008, Halliwell a Gutteridge 1999a).

Inkubace subcelulárních frakcí (mikrosomů – MIK, mitochondrií – MIT) připravených z motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) s albendazolem, koenzymem NADPH a s inhibitorem AT byla provedena podle výše uvedené metody (kap. 4.2.3.2). Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v Tab. 10 a na Obr. 27.

Tab. 10 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a s inhibitorem AT v koncentraci 100 μ M.

	MIK	MIK+AT	MIT	MIT+AT
ABZSO (pmol/min/mg)	1,22 \pm 0,30	1,19 \pm 0,17	0,99 \pm 0,14	1,42 \pm 0,37
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0	0	0



Obr. 28 - Grafické znázornění tvorby ABZSO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru AT (100 μM)

Při inkubaci s tímto inhibitorem byly pro ABZSO naměřeny nulové hodnoty, proto tyto hodnoty nejsou v grafu uvedeny. Aktivita enzymu metabolizujícího ABZ při inhibici AT v subcelulárních frakcích nezaznamenala žádnou statisticky významnou změnu.

5.1.4 Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory diethyldithiokarbamátem a oktylaminem

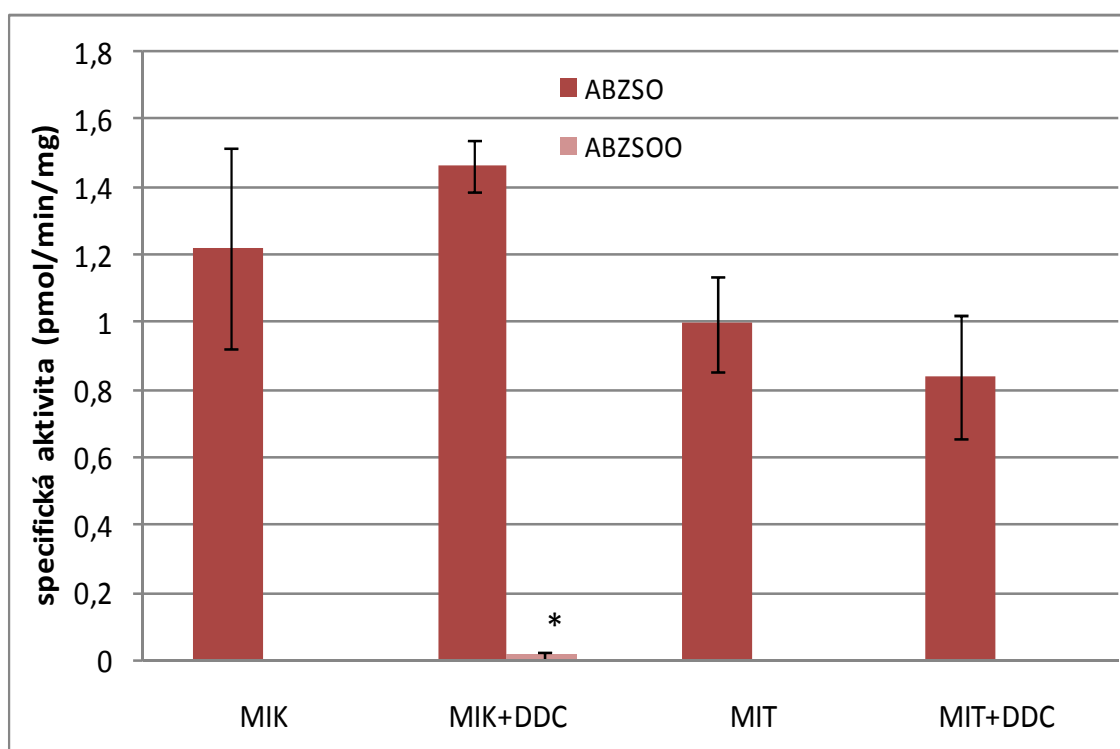
DDC (Saadeddin et al. 2004, Komen a Wanders 2006, Eagling et al. 1998) a OA (Pathak a Roy 1992, Ubaeud et al. 1999) jsou inhibitory cytochromů P450.

Inkubace subcelulárních frakcí (mikrosomů – MIK, mitochondrií – MIT) připravených z motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) s albendazolem, koenzymem NADPH a s inhibitory DDC (Tab. 11, Obr. 29) a OA (Tab. 12, Obr. 30) byla provedena podle výše uvedené metody (kap. 4.2.3.2).

Tab. 11 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a s inhibitorem DDC v koncentraci 100 μ M

	MIK	MIK+DDC	MIT	MIT+DDC
ABZSO (pmol/min/mg)	1,22 \pm 0,30	1,46 \pm 0,08	0,99 \pm 0,14	0,84 \pm 0,18
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0,01 \pm 0,01*	0	0

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 29 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μ M ABZ a s 10 μ M ABZ v přítomnosti inhibitoru DDC (100 μ M)

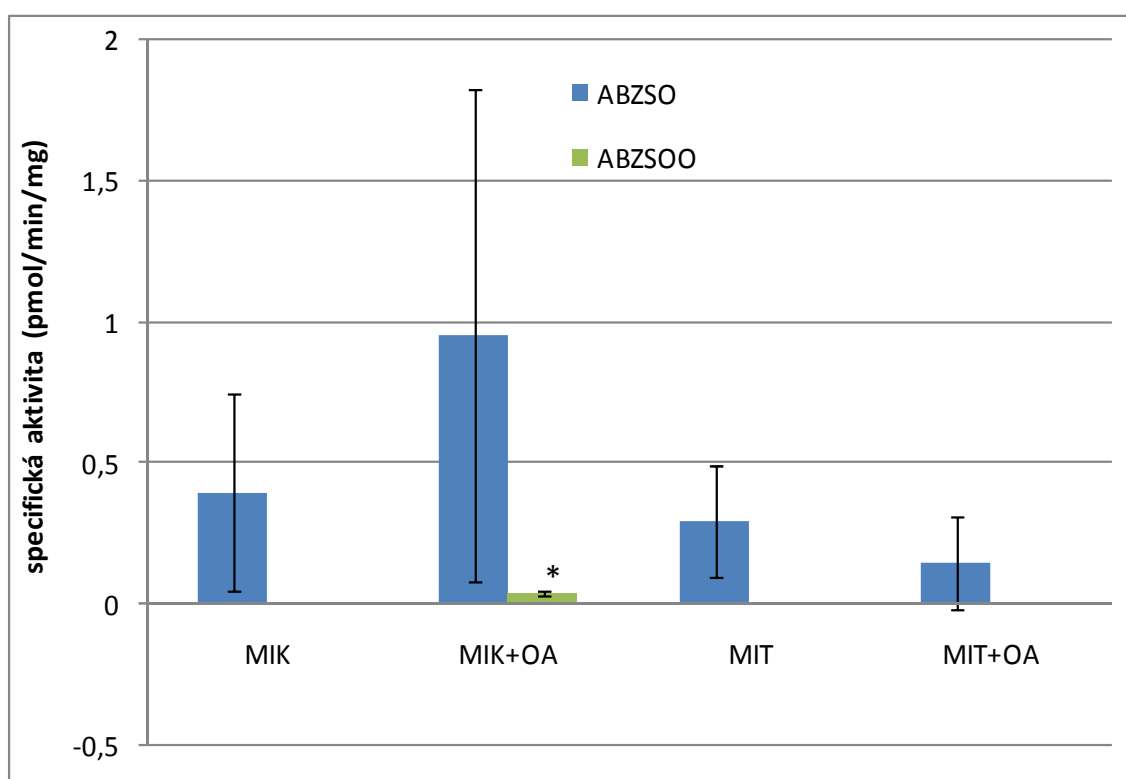
* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

Změny při inhibici DDC nejsou statisticky významné. Pouze v případě mikrosomální frakce byl při inhibici DDC zaznamenán statisticky významný vzrůst specifické enzymové aktivity u ABZSOO.

Tab. 12 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ(10 μ M) a s inhibitorem OA v koncentraci 100 μ M

	MIK	MIK+OA	MIT	MIT+OA
ABZSO (pmol/min/mg)	0,40 \pm 0,35	0,96 \pm 0,87	0,30 \pm 0,20	0,15 \pm 0,16
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0,04 \pm 0,01	0	0

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 30 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μ M ABZ a s 10 μ M ABZ v přítomnosti inhibitoru OA (100 μ M)

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

Hodnoty specifické enzymové aktivity nebyly při této inhibici statisticky významně ovlivněny. Pouze v mikrosomální frakci stoupá statisticky významně hodnota specifické enzymové aktivity pro enzym tvořící ABZSOO.

5.1.5 Inkubace subcelulárních frakcí s inhibitory kyselinou salicylhydroxamovou a merkaptosukcinátem

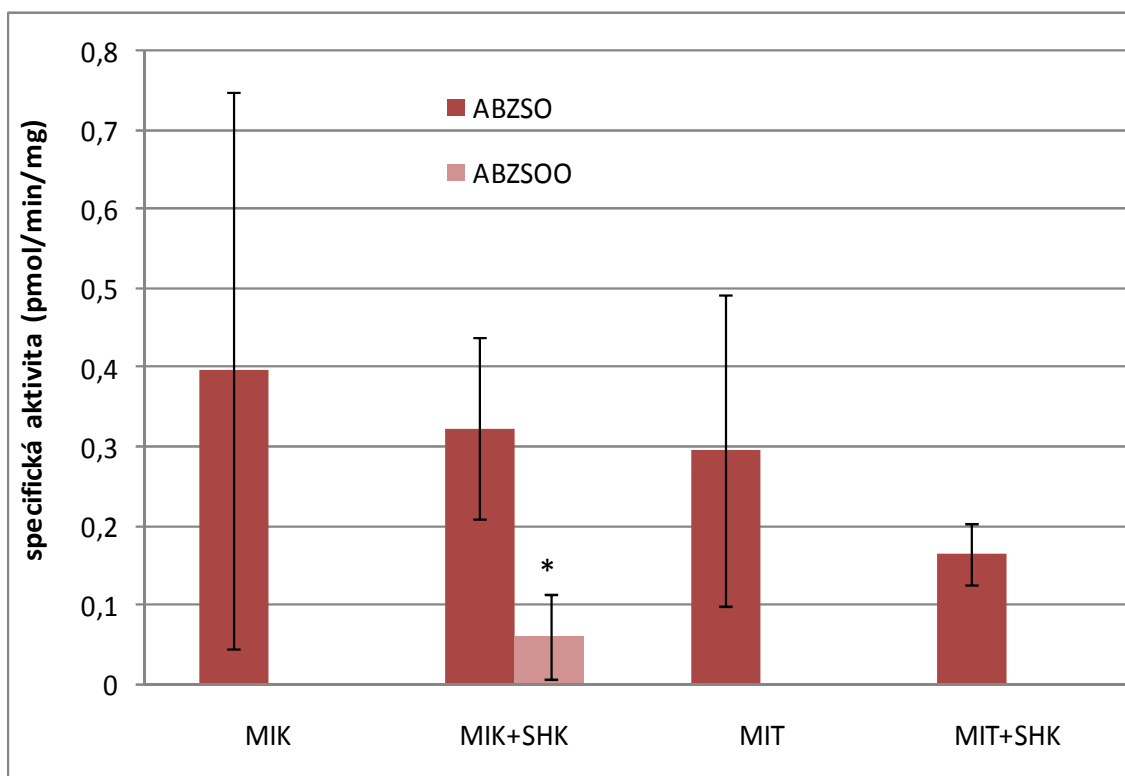
MS (Baud et al. 2004, Sokolova et al. 2001) a SHK (Allan a Walker 1988, Ikeda-Saito et al. 1999, Weis et al. 1996) jsou inhibitory enzymu peroxidasy .

Inkubace subcelulárních frakcí (mikrosomů – MIK, mitochondrií – MIT) připravených z motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) s albendazolem, koenzymem NADPH a s inhibitory SHK (Tab. 13, Obr. 31) a MS (Tab. 14, Obr. 32) byla provedena podle výše uvedené metody (kap. 4.2.3.2).

Tab. 13 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μ M) a s inhibitem SHK v koncentraci 100 μ M

	MIK	MIK+SHK	MIT	MIT+SHK
ABZSO (pmol/min/mg)	0,40 \pm 0,35	0,32 \pm 0,11	0,30 \pm 0,20	0,16 \pm 0,04
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0,06 \pm 0,05*	0	0

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od kontrolního neinhibovaného vzorku



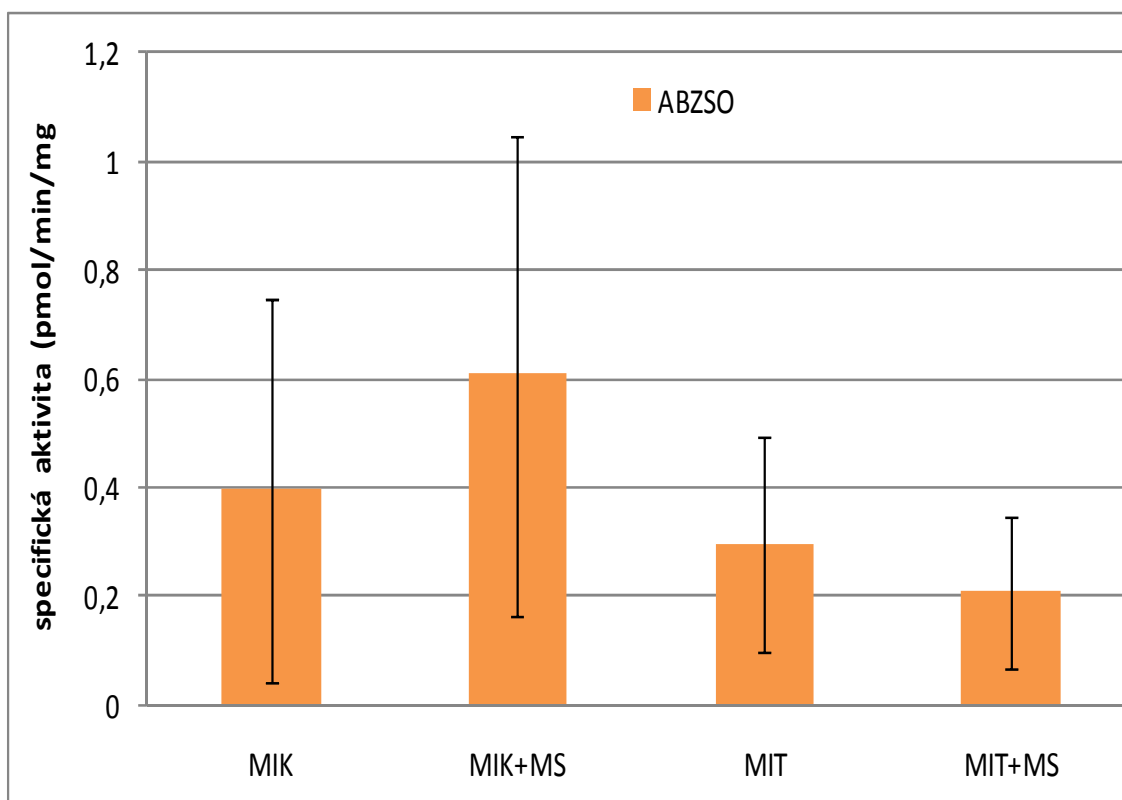
Obr. 31 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru SHK (100 μM)

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

Specifická enzymová aktivita enzymu metabolizujícího ABZ v obou subcelulárních frakcích za inhibice SHK nebyla statisticky významně ovlivněna. Pouze u hodnoty specifické enzymové aktivity pro enzym tvořící ABZSOO v mikrosomální frakci byl zaznamenán statisticky významný vzestup.

Tab. 14 – Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μM) a s inhibitorem MS v koncentraci 100 μM

	MIK	MIK+MS	MIT	MIT+MS
ABZSO (pmol/min/mg)	0,40 \pm 0,35	0,61 \pm 0,44	0,30 \pm 0,20	0,21 \pm 0,14
ABZSOO (pmol/min/mg)	0	0	0	0



Obr. 32 - Grafické znázornění tvorby ABZSO, při inkubaci subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru MS (100 μM)

ABZSO se při této inkubaci netvořil ani v jedné z frakcí, proto nejsou v grafu zaznamenány hodnoty specifické enzymové aktivity pro enzym tvořící tento metabolit.

Při inhibici MS nedošlo k žádnému statisticky významnému ovlivnění hodnot specifické aktivity peroxidasy v mikrozomech ani v mitochondriích.

5.1.6 Stanovení IC 50 pro inhibitor α -nafthylthiourea a methimazol

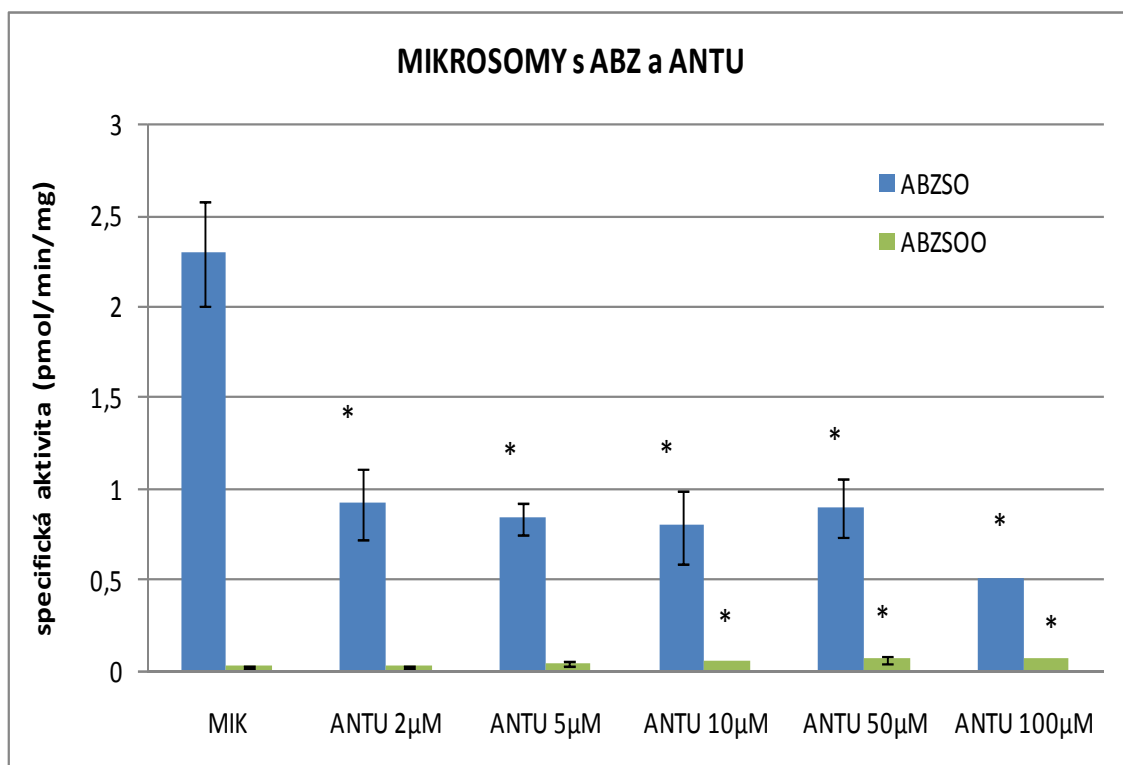
Pro inhibitory ANTU a MET byla vzhledem k vysoké inhibici enzymu tvořícího ABZSO a ABZSOO připravena koncentrační řada dle Tab. 3.

Inkubace se subcelulárními frakcemi proběhla stejným postupem jako v předchozích případech. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 15 a na Obr. 33 a 34 pro inhibitor ANTU a v Tab. 16 a na Obr. 35 a 36 pro inhibitor MET.

Tab. 15 - Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μM) a s inhibitorem ANTU v různých koncentracích

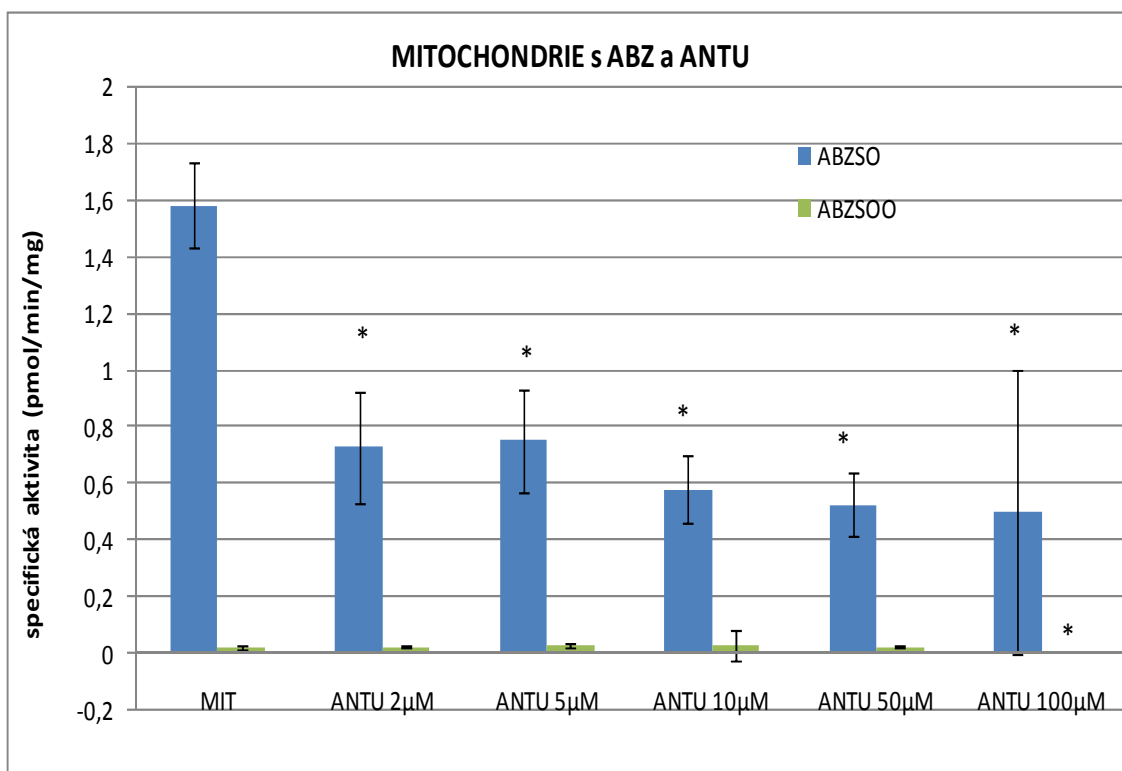
	MIK	MIK	MIT	MIT
ANTU (μM)	ABZSO (pmol/min/mg)	ABZSOO (pmol/min/mg)	ABZSO (pmol/min/mg)	ABZSOO (pmol/min/mg)
0	$2,29 \pm 0,29$	$0,02 \pm 0,01$	$1,58 \pm 0,15$	$0,02 \pm 0,01$
2	$0,92 \pm 0,19^*$	$0,02 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,19^*$	$0,02 \pm 0,003$
5	$0,84 \pm 0,09^*$	$0,05 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,18^*$	$0,03 \pm 0,01$
10	$0,79 \pm 0,20^*$	$0,06 \pm 0,002^*$	$0,58 \pm 0,13^*$	$0,03 \pm 0,06$
50	$0,90 \pm 0,16^*$	$0,06 \pm 0,02^*$	$0,52 \pm 0,11^*$	$0,03 \pm 0,004$
100	$0,51 \pm 0,004^*$	$0,06 \pm 0,001^*$	$0,50 \pm 0,502^*$	0^*

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 33 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulární frakce MIK s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU (2-100 μM).

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 34 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulární frakce MIT s 10 µM ABZ a s 10 µM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU (2-100µM).

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

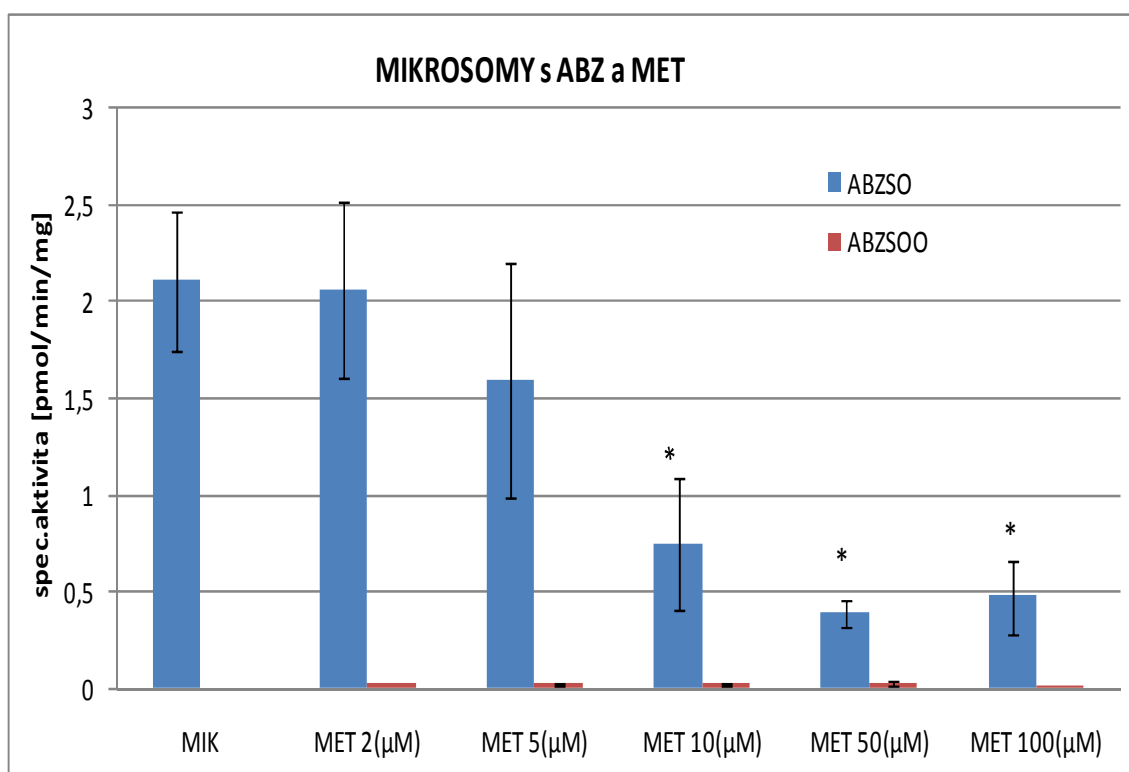
Inhibitor ANTU statisticky významně snižoval hodnoty specifické enzymové aktivity enzymu tvořícího ABZSO. Tato inhibice byla statisticky významná jak v mikrosomální, tak i v mitochondriální frakci pro všechny koncentrace inhibitoru.

Specifická aktivita enzymu tvořícího ABZSOO v MIT statisticky významně rostla u koncentrací inhibitoru 10 µM, 50 µM a 100 µM. V MIT aktivita tohoto enzymu statisticky významně klesla u hodnoty koncentrace inhibitoru 100 µM.

Tab. 16 - Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frakcí motolice s ABZ (10 μM) a s inhibitorem MET v různých koncentracích

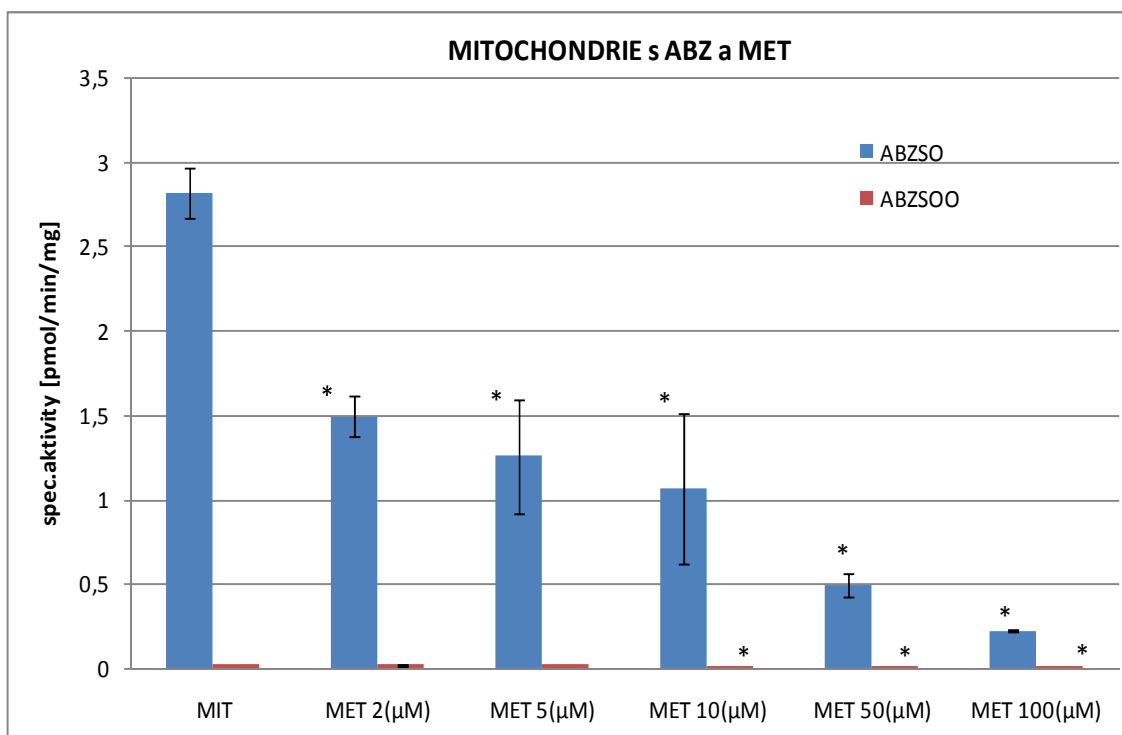
	MIK	MIK	MIT	MIT
MET (μM)	ABZSO (pmol/min/mg)	ABZSOO (pmol/min/mg)	ABZSO (pmol/min/mg)	ABZSOO (pmol/min/mg)
0	2,11 \pm 0,36	0	2,81 \pm 0,15	0,02 \pm 0,002
2	2,06 \pm 0,45	0,03 \pm 0,001	1,49 \pm 0,12*	0,02 \pm 0,01
5	1,60 \pm 0,60	0,02 \pm 0,01	1,25 \pm 0,33*	0,02 \pm 0,002
10	0,75 \pm 0,34*	0,03 \pm 0,004	1,06 \pm 0,45*	0,02 \pm 0,001*
50	0,40 \pm 0,07*	0,03 \pm 0,01	0,49 \pm 0,07*	0,01 \pm 0,003*
100	0,48 \pm 0,19*	0,02 \pm 0,003	0,22 \pm 0,01*	0,01 \pm 0,003*

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 35 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulární frakce MIK s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru MET (2-100 μM).

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 36 - Grafické znázornění tvorby ABZSO a ABZSOO, při inkubaci subcelulární frakce MIT s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru MET (2-100μM).

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

Pro inhibitor MET se v obou subcelulárních frakcích statisticky významně snížila specifická enzymová aktivita enzymu tvořícího ABZSO pro téměř všechny hodnoty koncentrace inhibitoru.

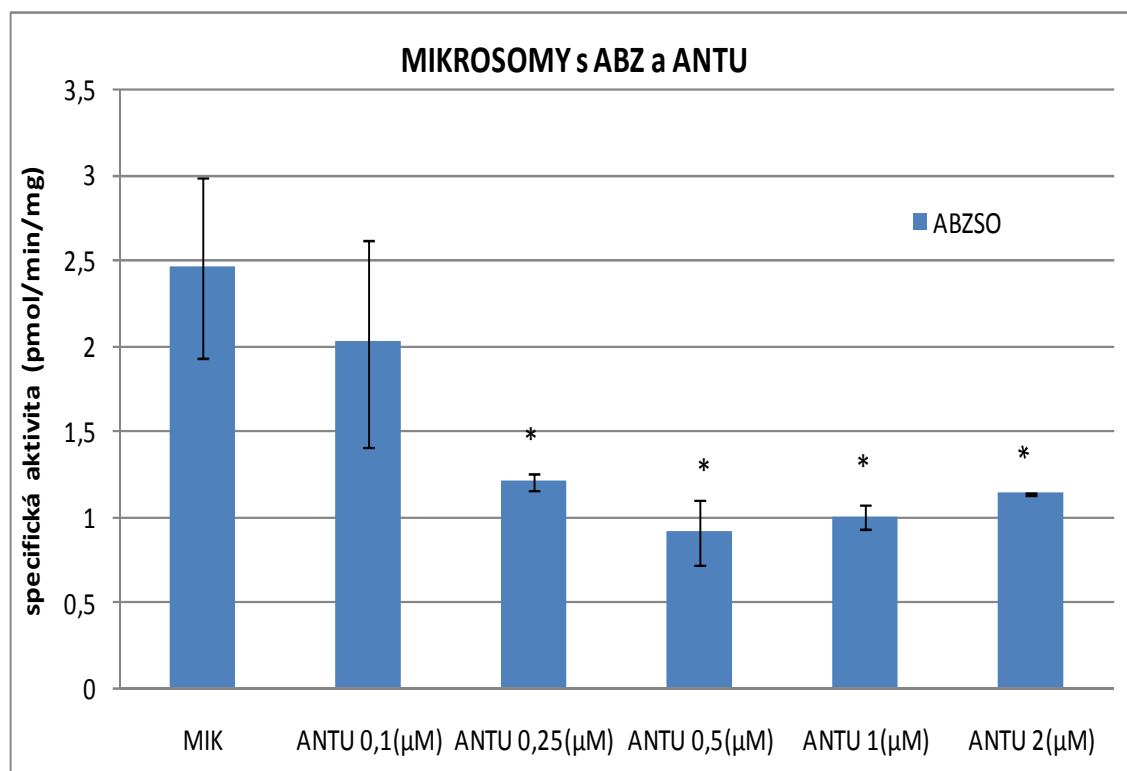
V mitochondriální frakci došlo k statisticky významnému poklesu specifické enzymové aktivity enzymu tvořícího ABZSOO pro tři poslední koncentrace inhibitoru (10 μM, 50 μM a 100 μM).

Pro inhibitor ANTU byla provedena inkubace také s nižšími koncentracemi ANTU dle Tab. 5. Výsledné hodnoty z tohoto měření jsou zaznamenány v Tab. 17 a na Obr. 37 a 38.

Tab. 17 - Biotransformace ABZ při inkubaci subcelulárních frací motolice s ABZ (10 μM) a s inhibitorem ANTU v různých koncentracích

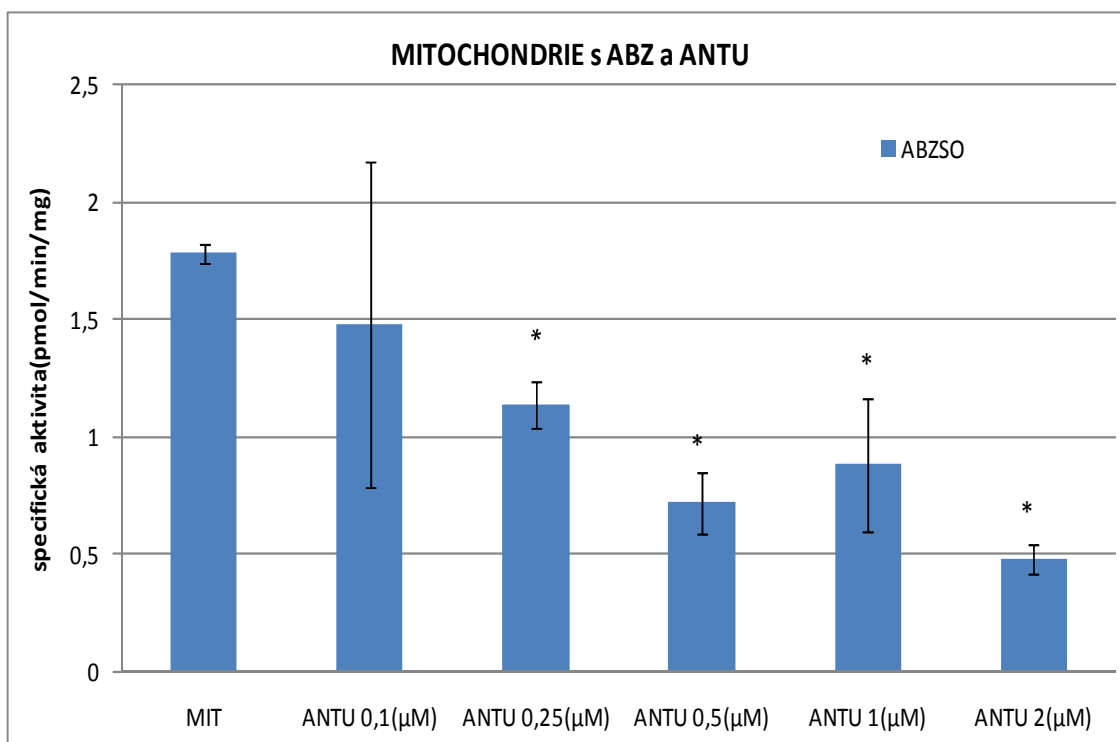
	MIK	MIT
ANTU (μM)	ABZSO(pmol/min/mg)	ABZSO(pmol/min/mg)
0	2,45 \pm 0,53	1,78 \pm 0,04
0,1	2,02 \pm 0,60	1,48 \pm 0,69
0,25	1,21 \pm 0,05*	1,13 \pm 0,1*
0,5	0,91 \pm 0,18*	0,72 \pm 0,13*
1	1,00 \pm 0,07*	0,88 \pm 0,28*
2	1,14 \pm 0,01*	0,48 \pm 0,07*

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



Obr. 37 - Grafické znázornění tvorby ABZSO, při inkubaci subcelulární frakce MIK s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU (0,1 - 2 μM).

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku



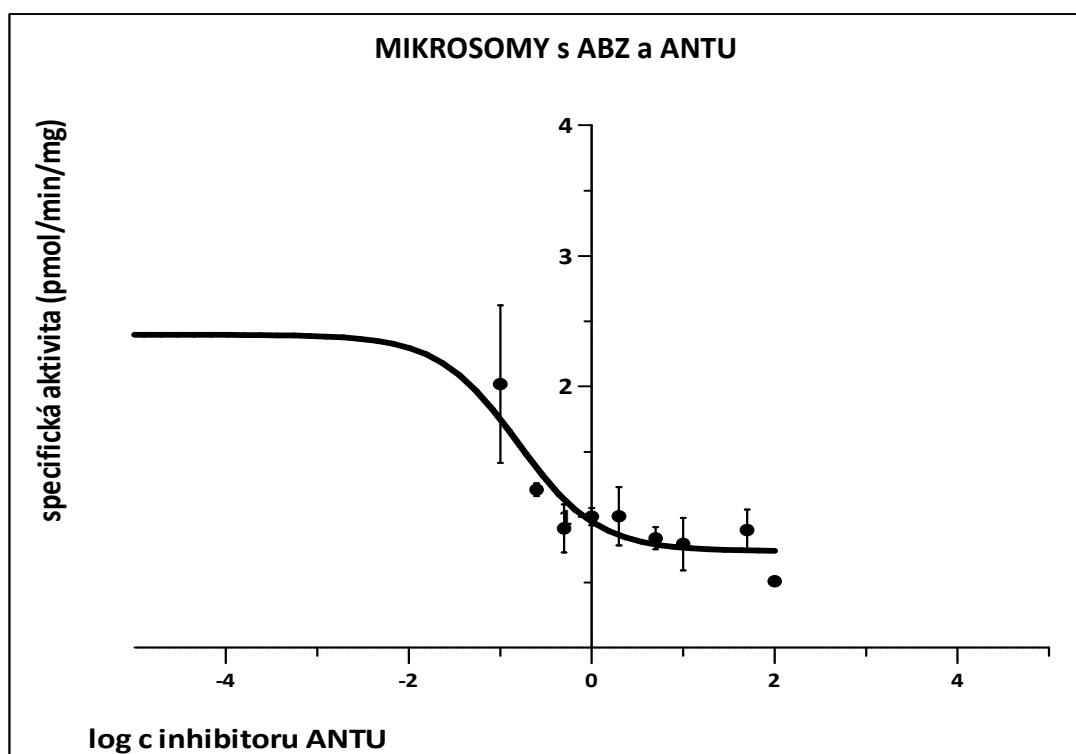
Obř. 38 - Grafické znázornění tvorby ABZSO, při inkubaci subcelulární frakce MIT s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU (0,1 - 2μM)

* Hodnoty statisticky významně odlišné ($p < 0,05$) od neinhibovaného vzorku

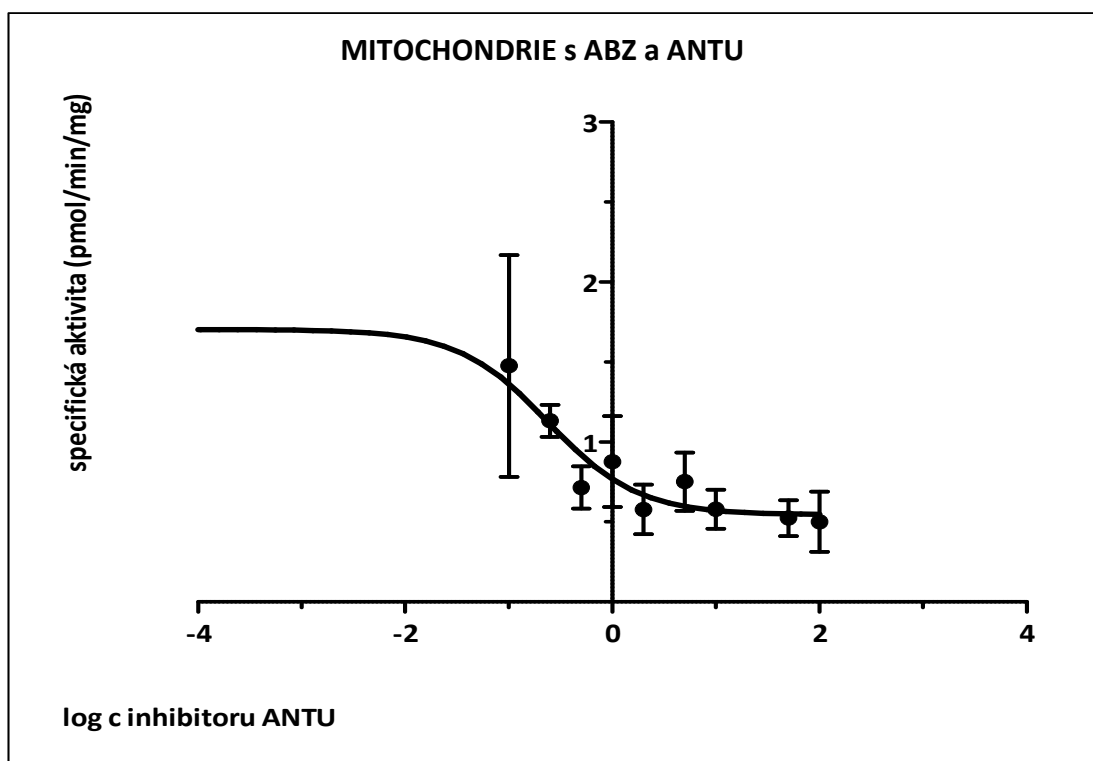
Hodnoty specifické enzymové aktivity pro enzym tvořící ABZSO byly v mikrosomální i mitochondriální frakci statisticky významně sníženy inhibitorem ANTU v koncentracích 0,25 μM, 0,5 μM, 1μM a 2 μM.

ABZSO se při této inkubaci netvořil ani v jedné z frakcí, proto nejsou v tabulce a v grafech zaznamenány hodnoty specifické enzymové aktivity pro enzym tvořící tento metabolit.

Z hodnot naměřených a vypočítaných pro koncentrační řady inhibitorů ANTU a MET byly dále vypočítané IC 50 pro tyto inhibitory. K výpočtu hodnot IC 50 bylo použito programu GraphPad Prism 5.02. Inhibiční koncentrace IC 50 reprezentuje koncentraci inhibitoru, při které za daných podmínek dochází k 50 % poklesu aktivity sledovaného enzymu. V tomto případě byla sledována koncentrace inhibitorů ANTU a MET a pokles specifické enzymové aktivity enzymu metabolizujícího ABZ na ABZSO.



Obr. 39 – Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ na koncentraci inhibitoru ANTU, při inkubaci subcelulární frakce MIK s 10 μ M ABZ a s 10 μ M ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU v různých koncentracích.

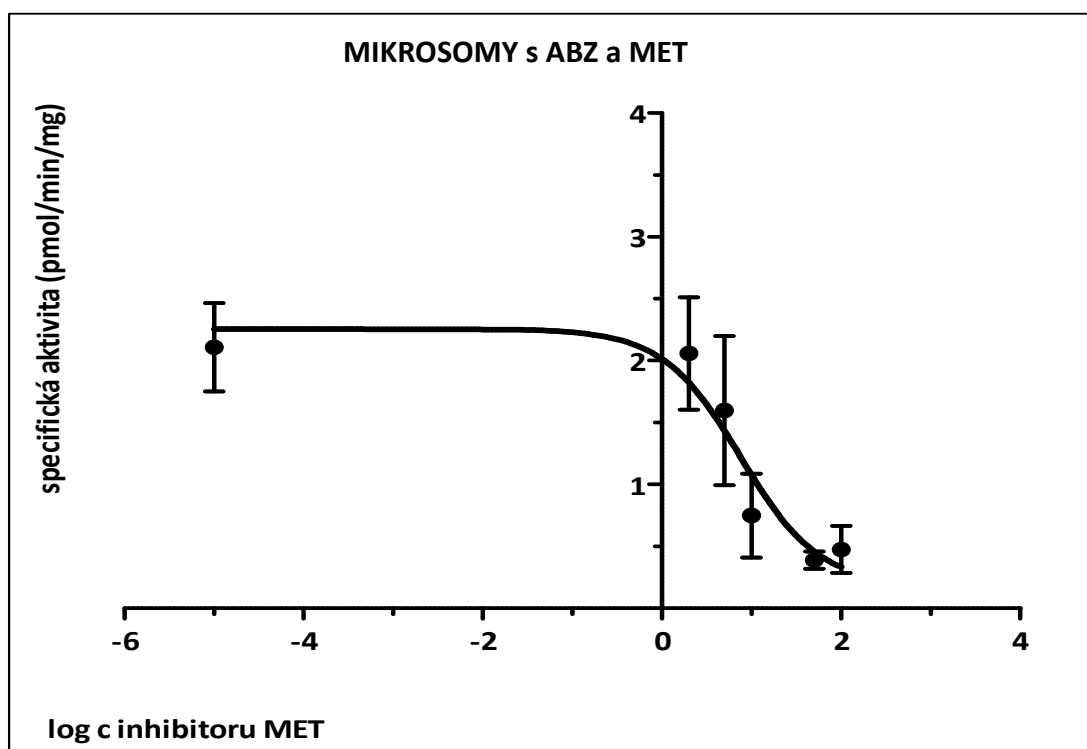


Obr. 40 - Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ na koncentraci inhibitoru ANTU, při inkubaci subcelulární frakce MIT s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru ANTU v různých koncentracích.

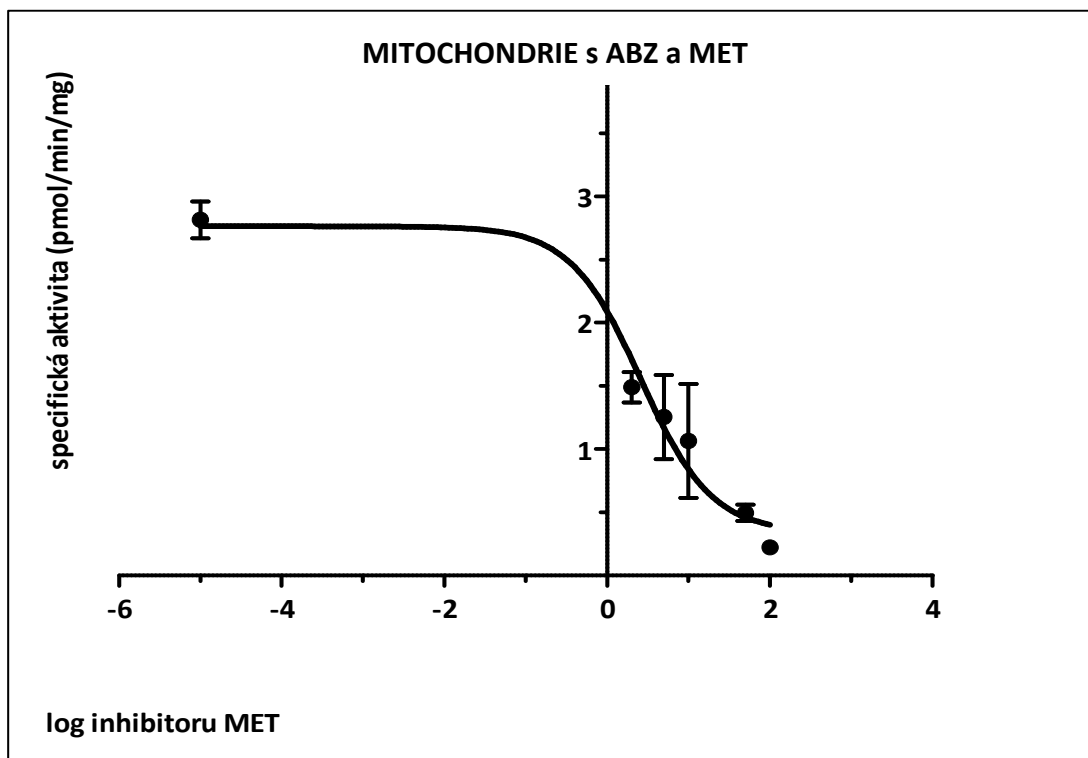
Tab. 18 – Hodnoty IC 50 (μM) pro inhibitor ANTU při inkubaci subcelulárních frakcí s ABZ (10 μM) a inhibitorem ANTU v různých koncentracích

FRAKCE	IC 50 (μM)
MIK	0,16
MIT	0,24

Pro výpočet hodnoty IC 50 pro inhibitor ANTU byly použity hodnoty z Tab. 15 a 17 pro každou subcelulární frakci zvlášť. Hodnota činila pro mikrosomální frakci **IC 50 = 0,16 μM** a pro frakci mitochondriální **IC 50 = 0,24 μM** .



Obr. 41 - Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ na koncentraci inhibitoru MET, při inkubaci subcelulární frakce MIK s 10 μ M ABZ a s 10 μ M ABZ v přítomnosti inhibitoru MET v různých koncentracích.



Obr. 42 - Grafické znázornění závislosti specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ na koncentraci inhibitoru MET, při inkubaci subcelulární frakce MIT s 10 μM ABZ a s 10 μM ABZ v přítomnosti inhibitoru MET v různých koncentracích

Tab. 19 – Hodnoty IC 50 (μM) pro inhibitor MET při inkubaci subcelulárních frakcí s ABZ (10 μM) a inhibitorem MET v různých koncentracích

FRAKCE	IC 50 (μM)
MIK	7,53
MIT	2,59

Pro výpočet hodnoty IC 50 pro inhibitor MET byly použity hodnoty z Tab. 16 pro každou subcelulární frakci zvlášť. Tato hodnota činila pro mikrosomální frakci **IC 50 = 7,53 μM** a pro frakci mitochondriální **IC 50 = 2,59 μM** .

6 DISKUSE

Helmintózy způsobené parazitickými helminty jsou v současnosti signifikantním problémem zejména z pohledu terapeutického. Jediným dostupným prostředkem v boji proti helmintózám jsou anthelmintika, na která však pořád častěji vzniká rezistence. Vznik této rezistence může být usnadněn prostřednictvím aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika. Znalost metabolismu xenobiotik je proto nezbytná vzhledem k efektivní a bezpečné farmakoterapii.

Zatímco enzymy metabolizující xenobiotika byly intenzivně studovány u člověka a savců, je u helmintů studium těchto enzymů relativně méně obsáhlé. Přesto bylo v dosavadních studiích u helmintů nalezeno mnoho typů enzymů, jako jsou například oxidasy, reduktasy, hydrolasy a transferasy (Cvilink et al. 2009a).

V doposud známých publikacích se autoři zabývali metabolismem anthelminticky aktivních substancí u helmintů z jednoho zásadního důvodu. Enzymy účastníci se biotransformace xenobiotik mají inaktivační a/nebo aktivační schopnost, a tím zásadně ovlivňují osud podaného anthelmintika v organismu helmintů (Cvilink et al. 2009a).

Solana et al. (2001) ve své práci potvrzuje, že helminti *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa* a *Ascaris suum* jsou schopni metabolismu ABZ na ABZSO ve své mikrosomální i cytosolické frakci. *F. hepatica* projevila vyšší sulfoxidační schopnost než oba zbylí helminti, navíc v obou frakcích byla schopna produkovat ABZSOO. Výsledky získané u těchto helmintů tak indikují, že helminti jsou schopni biotransformace benzimidazolů, i když se tato jejich schopnost liší kvalitativně i kvantitativně mezi jednotlivými druhy.

V případě jiného často používaného anthelmintika triklabendazolu, byla jeho sulfoxidace ve velké míře prokázána u *F. hepatica*. Parazit byl schopen efektivní přeměny triklabendazolsulfoxidu na triklabendazolsulfon (neaktivní metabolit), a tím signifikantně snížit koncentraci toxické sloučeniny ve svém organismu (Robinson et al. 2004).

U *D. dendriticum* byla sulfoxidace ABZ nalezena jak v mitochondriální, tak v mikrosomální frakci, avšak žádná ve frakci cytosolické. Také druhý krok v metabolismu ABZ, přeměna ABZSO na ABZSOO, byla u *D. dendriticum* identifikována v mitochondriální frakci (Cvilink et al. 2008). Byl to první důkaz, že

motolice kopinatá je schopna inaktivovat ABZ prostřednictvím přeměny na neaktivní metabolit ABZSOO.

Cvilink et al. (2009b) ve svém článku ukazuje, že motolice kopinatá má svůj vlastní enzymatický systém, který jí umožňuje aktivně modifikovat a neutralizovat efekt xenobiotik a podaných anthelmintik. Jeho práce potvrzuje, že u tohoto helminta probíhá sulfoxidace ABZ a ketoredukce flubendazolu a mebendazolu.

Tato práce se zaměřila na identifikaci enzymů účastnících se biotransformace anthelmintika albendazolu u motolice kopinaté. Albendazol je širokospektré benzimidazolové anthelmintikum, u kterého je dobře popsána jeho metabolická přeměna u savců (viz kap. 2.4). K vyloučení respektive k potvrzení účasti enzymů na sulfoxidaci albendazolu u motolice kopinaté bylo použito specifických inhibitorů jednotlivých enzymů.

Předpokládá se, že flavinmonooxygenasa (FMO) a cytochrom P4503A (CYP3A) jsou mediátory konverze ABZ na ABZSO a že přeměna ABZSO na ABZSOO je ovlivněna pouze cytochromem P4501A (el Amri et al. 1987, Moroni et al. 1995). Vzhledem k tomuto poznatku a dalším známým poznatkům o enzimech účastnících se metabolismu xenobiotik u helmintů (viz kap. 2.3) se tato práce zaměřila na zjištění, zda se flavinmonooxygenasy, cytochrom P450, peroxidasy, katalasy a superoxidodismutasy účastní na metabolismu albendazolu.

Prvními ze sledovaných enzymů byly FMO. Dle Cvilinka et al. (2009a) oxidace xenobiotik u helmintů může být zprostředkována flavinmonooxygenasami. V genomu helminta *Caenorhabditis elegans* byla identifikována genová sekvence kódující předpokládané homology lidských FMO (Petacorin et al. 2005). V této práci byly jako specifické inhibitory FMO použity ANTU, MET a I3C. Hodnoty enzymové aktivity enzymu metabolizujícího ABZ byly v MIK i MIT statisticky významně sníženy jak pro inhibitor ANTU tak i pro inhibitor MET. Vzhledem k tomu, že při inhibici těmito inhibitory v koncentraci 100 μ M nevznikl ani jeden z metabolitů a specifická enzymová aktivita je nulová, lze tuto inhibici považovat za stoprocentní. U inhibitoru I3C nedošlo k statisticky významné změně specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ, a tedy ani k inhibici. Možnou příčinou takového výsledku by mohl být předpoklad, že FMO není u dikrocélie substrátově specifický vůči I3C. I přesto lze předpokládat, že FMO hraje v metabolismu ABZ u motolice kopinaté zásadní roli.

Cytochrom P450 byl donedávna považován za enzym, který helminti postrádají (Precious a Barrett 1989, Barrett 1997). V současnosti však existuje mnoho dokladů nejen o přítomnosti genů kódujících CYP, ale také o aktivitě některých enzymů z této rodiny u několika helmintů. Ve stádiu výzkumu je genová sekvence kódující CYP u důležitých helmintů jako jsou například *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Onchocerca volvulus* a *Ascaris suum* (Cvilink et al. 2009a). U vlasovky slézové (*Haemonchus concortus*) byla nalezena typická CYP monooxygenasová aktivita závislá na NADPH (Kotze 1997). Také u *S. mansoni* byla dokázána vysoká aktivita CYP (Saees et al. 2002). V této práci byly jako inhibitory CYP použity DDC a OA. Při této inhibici však nedošlo k žádné statisticky významné změně specifické aktivity enzymu metabolizujícího ABZ. Bohužel se tak nepodařilo prokázat roli tohoto enzymatického systému na metabolismu ABZ. Buď motolice CYP nemá, nebo je jeho specifita odlišná od isoform CYP známých u jiných živočišných druhů.

Peroxidasy mohou být jednou z dalších skupin enzymů, které se podílejí na oxidaci xenobiotik u helmintů (Kotze 1999, Barret 1997). Zatím však neexistují žádné detailnější informace o jejich participaci na detoxikaci xenobiotik u helmintů. Peroxidasy byly u helmintů studovány dosud pouze z hlediska jejich antioxidační funkce (Cvilink et al. 2009a). V malých koncentracích byla nalezena glutathionperoxidasa u některých helmintů, například *S. mansoni* (Mei et al. 1996). Jako specifické inhibitory peroxidasy a GPx byly v této práci použity MS a SHK. Tyto inhibitory však statisticky významně neovlivnily specifickou aktivitu enzymu metabolizujícího ABZ. Proto jsme účast peroxidasy a GPx na metabolismu ABZ nemohli potvrdit.

V práci byl také použit AT jako specifický inhibitor pro katalasu. Enzym metabolizující ABZ však při inkubaci tímto inhibitorem nezaznamenal žádnou statisticky významnou změnu ve své specifické aktivitě. Z tohoto důvodu nebylo možné roli katalasy na metabolismu ABZ potvrdit. Její aktivita však byla nalezena u některých hlístic (Bruschi a Lucchi 2001).

Pro inhibitory ANTU a MET byly vypočítány hodnoty IC₅₀ pro každou ze subcelulárních frakcí. Hodnota IC₅₀ pro ANTU byla v mikrosomální frakci 0,16μM a ve frakci mitochondriální 0,24μM. Pro inhibitor MET byly tyto hodnoty v mikrosomální frakci 7,53μM a ve frakci mitochondriální 2,59μM. Při porovnání

těchto hodnot je zřejmé, že hodnoty IC₅₀ pro ANTU jsou v obou subcelulárních frakcích mnohem nižší než pro MET. Je tedy možné, že enzymy, které jsou těmito inhibitory inhibovány, mají k ANTU vyšší afinitu než k MET. Vzhledem k tomu, že hodnoty IC₅₀ pro ANTU i MET jsou velmi nízké, lze předpokládat, že enzymy FMO se účastní na sulfoxidaci ABZ na ABZSO.

7 ZÁVĚR

Vzhledem k tomu, že použití anthelmintik je v současné době jedinou efektivní metodou v boji s helminty a parazitózami jimi způsobenými, je velice důležité získat poznatky o obranných mechanismech, kterými tyto helminti disponují.

Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) představuje parazitického helminta, který byl doposud jen zcela minimálně prozkoumán. V několika pracích se potvrdilo, že tento helmint je schopen metabolizovat anthelmintika, avšak zatím nebyly prozkoumány enzymy účastníci se těchto biotransformací.

Tato práce se snažila identifikovat jednotlivé enzymy, nebo enzymatické systémy, které by mohly hrát hlavní roli v biotransformaci anthelmintika albendazolu. Použitím specifických inhibitorů byla potvrzena zásadní role flavinmonooxygenasového systému při přeměně albendazolu na albendazolsulfoxid. Ostatní použité inhibitory statisticky významně neovlivnily specifickou aktivitu enzymu metabolizujícího albendazol.

Pro inhibitory ANTU a MET byly změřeny a následně vypočítány jejich inhibiční koncentrace IC₅₀. Hodnoty IC₅₀ byly pro inhibitor ANTU řádově nižší než pro inhibitor MET. Je tedy zřejmé, že k ANTU mají FMO vyšší afinitu. Velmi nízké hodnoty IC₅₀ pro oba inhibitory podporují předpoklad, že se FMO účastní na sulfoxidaci ABZ na ABZSO.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ABZ** - albendazol
ABZSO - albendazolsulfoxid
ABZSOO - albendazolsulfon
ANTU - α -nafthylthiourea
AT - 3-amino-1,2,4-triazol
CYP - cytochrom P450
DDC - diethyldithiokarbamát
DMSO - dimethylsulfoxid
FAD - flavinadenosindinukleotid
FMO - flavinmonooxygenasa
GPx - glutathionperoxidasa
GST - glutathion S-transferasa
I3C - indol-3-karbinol
MET - methimazol
MIK - mikrosomy
MIT - mitochondrie
MS - mekaptosukcinát
NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OA - oktylamin
SHK - kyselina salicylhydroxamová
SOD - superoxiddismutasa

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alvarez L. I., Sanchez S. F. a Lanusse C. E. (1999) In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2, 77–86 (převzato z Velík et al. 2003)
- Allan A. C. a Walker J. R. L. (1988) The selective inhibition of catechol oxidases by salicylhydroxamic acid. *Phytochemistry* 27 (10), 3075-3076
- Anzenbacher P., Dawson J. H. a Kitawa T. (1989) Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand. *Journal of Molecular Structures* 214, 149-158 (převzato z Stiborová et al. 1999)
- Badie A. a Rodeland D. (1988) Les fourmis parasitées par *dicrocoelium lanceolatum rudolphi* en limousin. Les relation avec le support végétal. *Rev. Med. Vet.* 139, 629-633 (převzato z Otranto a Traversa 2003)
- Barrett J. (1997) Helminth detoxification mechanisms. *J Helminthol* 71, 85-89 (převzato z Cvilink et al. 2009)
- Batra S., Chatterjee R. K. a Srivastava V. M. L. (1992) Antioxidant system of *Litomosoides carinii* and *Setaria cervi*: effect of a macrofilaricidal agent. *Veterinary Parasitology* 43, 93-103 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Baud O., Greene A. E., Li J., Wang M., Volpe J. J. a Rosenberg P. A. (2004) Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience* 24 (7), 1531-1540
- Bayliak M., Gospodarion D., Semchyschyn H. a Luschchak V. (2008) Inhibition of catalase by aminotriazole in vivo results in reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemistry* 73(3), 420-426
- Brophy P. M. a Barret J. (1990) Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 100, 345-349 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Bruschi F. a Lucchi N. W. (2001) Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites: No doubt on their evasive role. *Acta Parasitologica* 46 (4), 233–241
- Bruschi F., Carulli G., Azzarà A., Homan W. a Minuci S. (2000) Inhibitory effects of human neutrophil function by the 45kDa glycoprotien derived from

the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. International Archives of Allergology and Immunology 122, 58-65 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)

- Bumay A, Rincheval V., Trotot P., Mignotte B. a Vayssiére J. (2005) The superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate has antagonistic effects on apoptosis by triggering both cytochrome c release and caspase inhibition. Free Radical Biology and Medicine 40 (8), 1377-1390
- Campbell W. (1990) Benzimidazoles – veterinary uses. Parasitology Today 4, 130–133 (převzato z Velík et al. 2003)
- Campos E. G., Hermes-Lima M., Smith J. M. a Pichard R. K. (1999) Characterisation of *Fasciola hepatica* cytochrome c peroxidase as an enzyme with potential antioxidant activity in vitro. International Journal of Parasitology 29, 655-662 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Catalase - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-1]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Catalase_Structure.png>
- Coles G. C. a Stafford K. A. (2001) Activity of oxiclozanide, nitroxylin, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. Veterinary Record 148, 723-724
- Craney J., Wijffel G. L., Sexton J. L., Sanderman R. M., Spithill T. W. a Parson J. C. (1995) *Fasciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. Experimental Parasitology 81, 106-116 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Cristofol C., Virkel G., Alvarez L., Sanchez S., Arboix M. a Lanusse C. (2001) Albendazole sulphoxide enantiomeric ratios in plasma and target tissues after intravenous administration of ricobendazole to cattle. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2, 117–124 (převzato z Velík et al. 2003)
- Cvilink V., Lamka J. a Skálová L. (2009a) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. Drug Metabolism Reviews 41 (1), 8-26
- Cvilink V., Szotáková B., Křížová V., Lamka J. a Skálová L. (2008) Phase I biotransformation of albendazole in lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). Research in Veterinary Science 86(1), 49-55
- Cvilink V., Szotáková B., Vokřál I., Bártíková H., Lamka J. a Skálová L. (2009b) Liquid chromatography/mass spectrometric identification of

benzimidazole anthelmintics metabolites formed ex vivo by *Dicrocoelium dendriticum*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 23, 2679-2684

- Cytochrome P450 - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-1]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:CytP450Oxidase-1OG2.png>>
- Eagling V. A., Tjia J. F. a Back D. J. (1998) Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology* 45 (2), 107-114
- Eckert J. a Hertzberg H. (1994) Parasite control in transhumant situations. *Veterinary Parasitology* 54, 103-125
- el Amri H. S., Fargetton X., Delatour P. a Batt A. M. (1987) Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependent monooxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica* 10, 1159–1168 (převzato z Velík et al. 2003)
- Eswaramoorthy S., Bananno J. B., Burkley S. K. a Swaminathan S. (2006) Mechanism of action of flavin-containing monooxygenase. *PNSA* 103 (26), 9832-9837
- Genter M. B., Deamer N. J., Blake B. L., Wesley D. S., a Levi P. E. (1995) Olfactory toxicity of methimazole: Dose - response and structure - activity studies and characterization of flavin - containing monooxygenase activity in the Long - Evans rats olfactory mucosa. *Toxicological Pathology* 23 (4), 477-486
- Glutathione peroxidase - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-1]. Dostupné z:<<http://en.wikipedia.org/wiki/File:GlutPeroxidase-1GP1.png>>
- Glutathione S-transferase - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-1]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:GST-wiki.jpg>>
- Gottschall D. W., Theodorides V. J. a Wang, R. (1990) The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today* 4, 115–124 (převzato z Velík et al. 2003)
- Grothusen A., Hardt J., Bräutigah L., Lang D. a Böcker R. (1996) A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arct Toxicol* 71, 64-71
- Guengerich P. F. a Macdonald T. L. (1990) Mechanism of cytochrome P-450 catalysis. *The FASEB Journal* 4, 2453-2459

- Guengerich P. F. a Shimada T. (1993) *Humann Drug Metabolism. From Molecular Biology to Man*. CRC Press, London, str. 6 (převzato z Stiborová et al. 1999)
- Halliwell B. a Gutteridge J. M. C. (1999a) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. vydání, New York: Oxford University Press, Inc. , strany 140-146, 170-172 (převzato z Baud et al. 2004)
- Halliwell B. a Gutteridge J. M. C.(1999b) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. vydání, New York: Oxford University Press, Inc. 851 stran (převzato z Pláteník J. 2009)
- Hennessy D. R., Steel J. W., Lacey E., Eagleson G. K. a Prichard R. K. (1989) The disposition of albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 4, 421–429 (převzato z Velík et al. 2003)
- Hiepe T. (1994) Helminth control in sheep and goat flocks. *Tierärztliche Praxis* 22 (1), 29-34
- Hillyer G.V. a Hopla C.V. (1998) *Handbook Series in Zoonoses*. Life Science 63, 1963-1974
- Hong Z., Kosman D. J., Thakur A., Rekosh D. a LoVerde P. T. (1992) Identification and purification of second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity* 60, 3641-3651 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Hudeček J., Bazmruk V., Anzenbacher P. a Hunro A. W. (1997) Catalytically self-sufficient P450 CYP 102 (Cytochrome P450 BM-3): Resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (3), 811-815 (převzato z Stiborová et al. 1999)
- Chiba K., Kobayashi K., Itoh S., Chiba T., Ischizaki T. a Kamataki T. (1995) N-oxydation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by the rat liver flavin-containing monooxygenase expressed in yeast cells. *European Journal of Pharmacology* 293 (1), 97-100
- Ikeda-Saito H., Shelley D. A., Lu L., Booth K.S., Caughey W. S., a Kimura S. (1991) Salicylhydroxamic acid inhibits myeloperoxidase activity. *Journal of Biochemical Chemistry* 266, 3611-3616

- Isaac R. E., Eaves L., Muimo R. a Lamango N. (1991) N-acetylation of biogenic amines in *Ascaridia galli*. *Parasitology* 102 (3), 445-450 (převzato z Cvilink et al. 2009)
- Itoh K., Kimura T., Yokooi T., Itoh S. a Kamataki T. (1993) Rat liver flavin-containing monooxygenase: cDNA cloning and expression in yeast. *Biochemical and Biophysical Acta* 1173, 165-171
- Jíra J. (1998) *Lékařská helmintologie – Helmintoparazitární nemoci*. Galén, Praha, 495 stran
- Jurášek V. a Dubinsky P. (1993) *Veterinární parazitologie*. Příroda, Bratislava, 398 stran
- Karadag B., Bilici A., Doventas A., Kantarci F., Selcuk D., Dincer N., Oner Y.A., Erdinler D.S. (2005) An unusual case of biliary obstruction caused by *Dicrocoelium dentriticum*. *Scand J Infect Dis* 37, 385-388
- Katchamart, Stresser D. M., Dehal S. S., Kupfer D. a Williams D. E. (2000) Concurrent flavin-containing monooxygenase downregulation and cytochrome P-450 induction by dietary indole in rat: implications for drug-drug interaction. *Drug Metab. Dispos.* 28, 930-936
- Kim T. S., Jung Y., Na B. K., Kim K. S. a Chung P.R. (2000) Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infection and Immunity* 68, 3941-3948 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Köhler P. (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336-345
- Komen J. C. a Wanders R. J. A. (2006) Identification of the cytochrome P450 enzymes responsible for the ω -hydroxylation of phytanic acid. *FEBS Letters* 580 (16), 3794-3798
- Kotze A. C. (1997) Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int J Parasitol* 27, 33-40 (převzato z Cvilink et al. 2009a)
- Kotze A. C. (1999) Peroxide-supported in-vitro cytochrome P450 activities in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 29, 389-396 (převzato z Cvilink et al. 2009a)
- Lacey E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today* 6, 112–115 (převzato z Velík et al. 2003)

- Lane N. (2002) Oxygen. The Molecule that made the World. New York: Oxford University Press, Inc., 374 stran (převzato z Pláteník J. 2009)
- Larsen-Su S. a Williams D. E. (1996) Dietary indole-3-carbinol inhibits FMO activity and expression of flavin-containing monooxygenase form 1 in rat liver and intestine. *Drug Metab. Dispos.* 24, 927-931
- Lubega G. W. a Prichard R. K. (1991) Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Experimental Parasitology* 2, 203–213 (převzato z Velík et al. 2003)
- Manga-Gonzalez M. Y., Ferreras M. C., Campo R., Gonzalez-Lanza C., Perez V. a Garcia-Merin J. F. (2004) Hepatic marker enzymes, biochemical parameters and pathological effects in lambs experimentally infected with *Dicrocoelium dentriticum* (Degeneva). *Parasitol. Res.* 93, 344-355.
- Mantovani A., Ricciardi C., Stazi A. V. a Macri C. (1995) Effects observed on gestational day 13 in rat embryos exposed to albendazole. *Reproductive Toxicology* 3, 265–273 (převzato z Velík et al. 2003)
- Marques M. P. D., Takayanagui O. M., Bonato P. S., Santos S. R. C. J. a Lanchote V. L. (1999) Enantioselective kinetic disposition of albendazole sulfoxide in patients with neurocysticercosis. *Chirality* 3, 218–223 (převzato z Velík et al. 2003)
- Marriner S. E. a Bogan J. A (1980) Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *American Journal of Veterinary Research* 7, 1126–1129 (převzato z Velík et al. 2003)
- Matsumura N., Ochi K., Ichimura M, Mizushima T., Harada H. a Harada M. (2001) Pancreas study on free radicals and pancreatic fibrosis - pancreatic fibrosis induced by repeated injection of superoxide dismutase inhibitor. *Pancreas* 22, 53-57
- McCord J. M. a Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- McGonigle S., Curley G. P. a Dalton J. P. (1997) Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 115, 101-104 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)

- McGonigle S., Dalton J. P. a James E. R. (1998) Peroxiredoxins: a new antioxidant family. *Parasitology Today* 14, 139-145 (převzato z Bruschi a Lusch 2001)
- Mei H., Hiria H., Tanaka M., Hong Z., Rekosh D. a LoVerde P. T. (1995) *Schistosoma mansoni*: clonign and characterisation of a gene encoding cytosolid Cu/Zn superoxide dismutase. *Experimental Parasitology* 80, 250-259 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Mei H., Thakur A., Schwartz J. a Lo Verde P. T. (1996) Expression and characterisation of glutathione peroxidase in human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immuniti* 64, 4299-4306 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Moroni P., Buronfosse T., Longin Sauvageon C., Delatour P. a Benoit E. (1995) Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 2, 160–165 (převzato z Velík et al. 2003)
- Nace C. G., Genter M. B., Sayre L. M. a Crofton K. M. (1997) Effect of methimazole, an FMO substrate and competitive inhibitor, on the neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in male rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 37, 131-140
- Otranto D. a Traversa D. (2002) A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology* 107, 317-335
- Otranto D. a Traversa D. (2003) Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends in Parasitology* 19, 12-15
- Parkinson A. (2001) Biotransformation of xenobiotics. Technology for the study of xenobiotics, in Casarett & Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill Book Company, New York, 134-218
- Pathak D. N. a Roy D. (1992) Examination of microsomal cytochrome P450 - catalyzed in vitro activation of o-phenylphenol to DNA binding metabolite(s) by 32P-postlabeling techniques. *Carcinogenesis* 13 (9), 1593-1597
- Peroxiredoxin - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-1]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Peroxiredoxin.png>>

- Petalcorin M. L., Joshua G. W., Agapow P. M. a Dopplin C. T. (2005) The FMO genes of *Caenorhabditis elegans* an *C. briggsae*: characteristics, gene expression, and comparative genomic analysis. *Gene* 346, 83-96 (převzato z Cvilink et al. 2009a)
- Piacenza L., Radi R., Goni F. a Carmona C. (1998) Cu/Zn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology Today* 117, 555-562 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Pica-Mattoccia L., Carlini D., Guidi A., Cimica V., Vigorosi F. a Cioli D. (2006) The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristic of a sulfontransferase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (1), 307-312 (převzato z Cvilink et al. 2009)
- Pláteník J. (2009) Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní Medicína pro Praxi* 11 (1), 30 – 33
- Plumb D.C. (1999) *Veterinary Drug Handbook*. Pharma Vet Publishing, Minnesota
- Precious W. Y. a Barrett J. (1989) The possible absence of cytochrome P-450-like xenobiotic metabolism in helminths. *Biochem. Biophys. Acta* 992, 215-222 (převzato z Cvilink et al. 2009)
- Rahko T. (1972) Studies on the pathology of dicrocoeliasis and fascioliasis in the goat. *Acta Vet Scand* 13, 554-562
- Ramaiah S. K., Apte U a Mehendale H. M. (2001) Cytochrome P450 2E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1088-1095
- Revilla-Nuin B., Manga-Gonzalez M.Y., Minambres B. a Gonzalez-Lanza C. (2005) Partial characterization and isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. *Veterinary Parasitology* 134, 229-240
- Rhoads M. L. (1983) *Trichinella spiralis*: identification and purification of superoxide dismutase. *Experimental Parasitology* 56, 41-54 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Riganó R., Profumo E., Bruschi F., Carulli G., Azzarà A., Ioppolo S., Buttari B., Ortona E., Margutti P., Teggi A a Siracusano A. (2001) Modulation of human response by *Echinococcus granulosus* antigen B and possible role in evading

host defenses. *Infection and Immunity* 69, 288-296 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)

- Robinson M. W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E. M. a Fairweather I. (2004) The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research* 92, 205-210 (převzato z Cvilink et al. 2009a)
- Roche C., Liu L. J., LePresle T., Capron A. a Pierce J. R. (1996) Tissue localization and stage-specific expression of the phospholipid hydroperoxid glutathion peroxidase of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75, 187-195 (převzato z Bruschi a Luschi 2001)
- Sánchez-Andrade R., Paz-Silva A., Suárez J. L., Arias M., López C., Morrondo P. a Scala A. (2003) Serum antibodies to *Dicrocoelium dendriticum* in sheep from Sardinia (Italy). *Prev. Vet. Med.* 57, 1-5
- Saadeddin A., Torres-Molina F., Cárcel-Trullols J., Araico A. a Peris J. E. (2004) Effect of cytochrome P450 inhibitors (diethyldithiocarbamate, ketoconazole and grapefruit juice) on the pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid. *Il Farmaco* 59, 687-702
- Saeed H. M., Mostafa M. H., O'Connor P. J., Rafferty J. A. a Doenhoff M. J. (2002) Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma Haematobium* adult worms. *FEBS Lett* 519,205-209 (převzato z Cvilink et al. 2009a)
- Sheehan D., Meade G., Folex V. M. a Down C. A. (2001) Structure, function, and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient anzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16 (převzato z Civlink et al. 2009)
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K. I., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. a Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85
- Smulevich G., Paoli M., Burke J. F., Smith A.T., Sanders S. A. a Thorneley R. N. F. (1994) Characterisation of recombinant Horseradish peroxidase c and three side-direct mutants, F41V, F41W, and R38K by resonance raman spectroscopy. *Biochemistry* 33 (23), 7398-7407 (převzato z Stiborová et al. 2004)

- Sokolova T., Gutterer J. M., Mirrunger J., Hamprecht B. a Dringen R. (2001) Catalase in astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and inactivation during the disposal of hydrogenperoxide. *Neuroscience Letters* 297, 129-132 (převzato z Baud et al. 2004)
- Solana H. D., Rodriguez J. A. a Lanusse C.E. (2001) Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitology Research* 4, 275–280
- Solana H. D., Sallovitz J.M., Lanusse C.E. a Rodriguez J.A. (2002) Enantioselective binding of albendazole sulphoxide to cytosolic proteins from helminth parasites. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1, 7–13 (převzato z Velík et al. 2003)
- Souček P. a Gut I. (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22, 83-103 (převzato z Stiborová et al. 1999)
- Stiborová M., Hudeček J., Hodek P a Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 93, 229-237
- Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V. a Páca J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy* 98, 876-890
- Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V. a Frei E. (2000) Heme peroxidase: structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 65 (3), 361-370 (převzato z Stiborová et al. 2004)
- Störmer E., Roots I. a Brockmöller J. (2000) Benzydamine N-oxidation as an index reaction reflecting FMO activity in human liver microsomes and impact of FMO3 polymorphisms on enzyme activity. *Clinical Pharmacology* 50, 553-561
- Superoxide dismutase - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. [cit. 2010-11-11]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:SOD.gif>>
- Veitch N. C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249-259
- Velík J., Baliharová V., Skálová L., Szotáková B., Wsól V. a Lamka J. (2003) Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes. *I. Vet. Pharmacol. Therap.* 26, 297-302

- Ubeaud G., Schiller C.-D., Hurbin F., Jaeck D. a Coassolo P. (1999) Estimation of flavin-containing monooxygenase activity in intact hepatocytes monolayers of rat, hamster, dog and human by using N-oxidation of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 8 (4), 255-260
- Weis V. M., Shall A. L. a McFall-Ngai M. J. (1996) A peroxidase related to the mammalian antimicrobial protein myeloperoxidase in Euprymna-Vibrio mutualism. *PNAS* 93 (24), 13683-13688
- Ziegler D. H. (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 179-199 (převzato z Störmer et al. 2000)