

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

**Indukce biotransformačních enzymů benzimidazolovými anthelmintiky**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové, 2006

Veronika Křížová

Děkuji své školitelce, paní doc. RNDr. L. Skálové, Ph.D., za možnost zpracovávat diplomovou práci pod jejím vedením, za pomoc při řešení zadaného úkolu, poskytnuté materiály, odborné konzultace a korektury textu. Též děkuji doc. RNDr. J. Lamkovi, CSc. za přípravu biologického materiálu a PharmDr. M. Šavlíkovi, Ph.D. za pomoc při stanovování některých aktivit. V neposlední řadě děkuji paní Pakostové za zpracování vzorků na HPLC.

## OBSAH

Obsah.....	3
1. Úvod.....	5
2. Teoretická část.....	6
2.1. Muflon ( <i>Ovis musimon</i> Pall.).....	6
2.2. Anthelmintika.....	8
2.2.1. Benzimidazolová anthelmintika.....	8
2.2.1.1. Albendazol.....	8
2.3. Biotransformace xenobiotik.....	10
2.3.1. Biotransformační enzymy.....	10
2.3.1.1. Reakce 1. fáze biotransformace.....	11
2.3.1.1.1. Cytochromy P450.....	12
2.3.1.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO).....	15
2.3.1.2. Reakce 2. fáze biotransformace.....	18
2.3.1.2.1. UDP-glukuronosyltransferasa (UGT).....	18
2.3.1.2.2. Glutathion-S-transferasa (GST).....	19
2.4. Indukce a inhibice biotransformačních enzymů.....	20
2.4.1. Mechanismus indukce CYP 1A.....	21
3. Cíl práce.....	23
4. Experimentální část.....	24
4.1. Pokusná zvířata a biologický materiál.....	24
4.2. Pracovní postupy.....	24
4.2.1. Použité chemikálie a přístroje.....	24
4.2.2. Příprava subcelulárních frakcí.....	26
4.2.3. Stanovení celkové koncentrace bílkoviny metodou BCA.....	26
4.2.4. Elektroforéza, western blotting.....	27
4.2.5. Spektrofluorimetrické stanovení aktivity EROD, MROD, PROD, BROD.....	28
4.2.6. Stanovení aktivity TBSO (thiobenzamid-S-oxidasa).....	30
4.2.7. Stanovení aktivity 6 $\beta$ -TOH (6 $\beta$ -testosteronhydroxylasa).....	31
4.2.8. Spektrofluorimetrické stanovení aktivity MFCD (methoxyfluorkumarindemethylasa).....	33
4.2.9. Stanovení aktivity UGT (UDP-glukuronosyltransferasa).....	35
4.2.10. Stanovení aktivity GST (glutathion-S-transferasa).....	36
4.2.11. In vitro inkubace mikrosomů s ABZ s následnou HPLC analýzou vzniklých metabolitů.....	37
4.2.12. Statistické vyhodnocení výsledků.....	39

4.3. Výsledky.....	40
4.3.1. Koncentrace bílkoviny.....	40
4.3.2. Western blotting (kvantifikace indukce CYP1A1/2) .....	43
4.3.3. Aktivita EROD, MROD, PROD, BROD .....	45
4.3.4. Aktivita TBSO.....	48
4.3.5. Aktivita 6 $\beta$ -TOH .....	49
4.3.6. Aktivita MFCD.....	50
4.3.7. Aktivita UGT.....	51
4.3.8. Aktivita GST .....	52
4.3.9. Výsledky HPLC analýzy inkubace mikrosomů s albendazolem.....	54
5. Diskuse .....	57
6. Závěr.....	60
7. Seznam použitých zkratek.....	61
8. Literatura .....	62

# 1. ÚVOD

Choroby způsobené červy jsou aktuální u všech obratlovců. Negativní projevy parazitace zvířat jsou nepřímé i přímé ztráty v jejich užitkovosti (chovatelské, produkční a reprodukční). Mnohé helmintózy jsou i zoonózami (Lamka a Ducháček, 1998).

Benzimidazolová anthelmintika jsou celosvětově rozšířená především ve veterinární medicíně. Jsou indikována k prevenci a léčbě endoparazitických onemocnění. Albendazol je důležitý zástupce benzimidazolových anthelmintik. Je to širokospektré anthelmintikum, mezi jehož cílové živočišné druhy patří i ovce muflon. Tento živočišný druh je velice vnímavý k různým endoparazitickým nákazám (Muelleriosis, Trichostrongylosis, Dicrocoeliosis dendriticum, Nematodirosis, Fasciolosis), a proto je anthelmintická medikace nutná (Baliharová et al., 2003; Velík et al., 2004).

Podávání farmakologicky aktivních substancí může modulovat (indukovat nebo inhibovat) biotransformační enzymy. Indukce způsobuje vzestup metabolické aktivity enzymů, inhibice naopak její pokles v závislosti na přítomnosti xenobiotika. Modulační aktivita biotransformačních enzymů ovlivní účinek a plazmatický poločas současně či následně podávaných léčiv, což může mít závažné farmakologické nebo toxikologické důsledky. Může např. dojít k vzestupu plazmatické hladiny léčiva s rizikem toxického působení nebo naopak ke snížení plazmatické koncentrace se snížením terapeutického efektu léčiva pod terapeutickou mez. Změnou biotransformačních cest se rovněž zvyšuje riziko nežádoucích účinků. V případě anthelmintik se snížením koncentrace účinné látky zvyšuje nebezpečí vývoje lékové rezistence helmintů. U potravinových zvířat, mezi něž muflon patří, je navíc riziko nečekaného prodloužení eliminace léčiva a jeho metabolitů či změny metabolické cesty, což může zapříčinit přítomnost léčiva v živočišném produktu. Modulační účinek může zvýšit citlivost ke kontaminantům životního prostředí s následnou možností vzniku onemocnění (Velík et al., 2004).

Výše zmíněné důsledky indukce a inhibice biotransformačních enzymů ukazují, že je nezbytné modulaci monitorovat u všech používaných léčiv. V humání farmakologii a toxikologii jsou experimenty *in vitro* a na dobrovolnících běžné, nezbytné při registraci nových léčiv. Znalosti o modulaci biotransformace léčivy ve veterinární farmakologii mají značné mezery. V důsledku mezidruhových rozdílů má o modulaci aktivity enzymů přesnou výpovědní hodnotu pouze pokus s konkrétním cílovým druhem (Velík et al., 2004).

V předchozí studii byl testován modulační účinek albendazolu na biotransformační enzymy při opakovaném podávání dávky 7,5 mg/kg ž. hm. muflonům (Velík et al., 2005). Zjistilo se, že albendazol a hlavně jeho oxidační produkt albendazolsulfoxid mají výrazný indukční vliv především na aktivitu cytochromu P450 1A.

Cílem této práce bylo zjistit, jestli by z hlediska indukce biotransformačních enzymů nebylo výhodnější podávat albendazol muflonům jednorázově ve vyšší dávce (30 mg/kg ž. hm.).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. MUFLON (*Ovis musimon* Pall.)



Obr.1 Muflon (*Ovis musimon*)

Původem je muflon divoká ovce z Korsiky a Sardinie. Do střední Evropy byla zavedena v 16.století, k nám již v roce 1530 do obory u Telče (Javůrek, 1961). Chov mufloní zvěře se u nás v poválečném období velmi zpopularizoval a rozšířil díky úspěchům na mezinárodních a světových výstavách loveckých trofejí (Žalman, 1997).

Muflon potřebuje kopečnatý, skalnatý terén, bez vysoké sněhové vrstvy. U nás je mufloní zvěř chována nejen v oborách, ale daří se jí i v četných volných honitbách (Javůrek, 1961).

Mufloní rodinu tvoří muflon, muflonka a muflončata. Muflon se podobá statné ovci 100 až 120 cm dlouhé, v kohoutku 65 až 75 cm vysoké, dosahuje hmotnosti 55 až 65 kg. Muflonky jsou menší a lehčí (Bouchner a Bergner, 1991). Mohou se dožít věku až 20 let.

V letní srsti je mufloní zvěř rezavě hnědá, zimní srst je delší, tmavší a beranům vyrůstá na krku hříva.

Mufloni mají mohutné, srpovitě točené duté rohy neboli toulce z černé rohoviny. Tyto rohy ani nevytloukají, ani neshazují. Silní mufloni mívají rohy o délce až 70 i 100 cm. Rohy začnou růst mladým beránkům již v 6.měsíci. V prvním roce tvoří rohy mírně ohnutou špici (průměrná délka 10-16 cm), v druhém roce se toulce začnou křivit (20-25 cm), mezi čtvrtým a šestým rokem tvoří již přibližně půlkruh, mezi sedmým a osmým rokem tři čtvrtiny kruhu a v pozdějším věku kruh uzavírají nebo dokonce i přesahují. Toulce silných beranů mohou vážit až 6 kg. Každý roční přírůstek je oddělen od přírůstku minulého roku hlubším kruhovým vrubem, podle jejichž počtu se dá přesně zjistit věk muflonů. Kromě přírůstkových vrubů jsou na toulcích četné vypouklé prstence, starý muflon jich může mít 60 až 80. Toulce se

spirálovitě točí těsně vedle krku, průřez mají trojhranný. Lovný je muflon tehdy, má-li toulce zatočené nejméně v půlkruh. Často mají krátké růžky i muflonky.

Mufloni žijí v tlupách, staří mufloni jsou samotáři. Větrí-li nebezpečí, vydávají varovný zvuk podobný kýchavému písknutí. Kamzíci se muflonům vyhýbají, srnčí se snese s muflonkami, ale beranům se vyhýbá.

Potravou je muflonům tráva, výhonky keřů, pochoutkou borůvčí, do polí chodí málo. Rádi sbírají žaludy a kaštany, v zimě berou s chutí jehličí čerstvě poražených jedlí. Mají složený žaludek (Javůrek, 1961). Přestože muflon patří k přežvýkavým druhům naší volně žijící zvěře, jsou ve stavbě jejich trávicího ústrojí odlišnosti, které jsou výsledkem adaptace a specializace jednotlivých druhů na konkrétní způsob života a obživy. Tato specializace je výsledkem neustále probíhajících selekčních procesů v přírodě, kdy se žijící organismy neustále přizpůsobují a specializují k využívání potravních a prostorových možností v přírodě. Volně žijící přežvýkavce je možné na základě stavby jejich předžaludku rozdělit do dvou základních skupin. 1. durivorní typ zahrnuje zvířata konzumující potravu s nízkou koncentrací živin (muflon), 2. mollivorní typ zvěře vyhledávající selektivně především koncentrovanou stravu (srnec). Přechodem mezi těmito extrémními typy jsou jelen a daněk. Trávicí trakt muflona je přizpůsoben pro využívání nejméně kvalitních složek potravního spektra, a proto je nejméně náročný na kvalitu přijímaných krmiv ze všech druhů naší zvěře a spokojí se i s pastvou na chudých stanovištích. Příjem kvalitní potravy ale samozřejmě zlepšuje kvalitu chované zvěře, a proto je třeba pečovat o kvalitní úživnost honiteb i pro mufloní zvěř, ale na druhé straně není třeba plýtvat při jejím přikrmování drahými koncentrovanými krmivy (Dvořák a Kamler, 1998).

Říje muflonů trvá od konce října do začátku prosince. V tomto období se silní berani prudce potýkají a nárazy toulců je daleko slyšet. Březost muflonek trvá 22 týdnů, kladou obvykle v dubnu zpravidla po jednom, jen velmi vzácně po dvou muflončatech. Muflonče již několik hodin po narození následuje nemotornými kroky matku. Po 2÷3 dnech zesílí jeho běhy tak, že už je člověk nechytí.

V tuhých zimách zahyne mnoho beranů, poněvadž během říje velmi zeslábnou a zimu přežívají hůře než ovce.

Z chorob se u mufloní zvěře nejvíce vyskytují endoparazitózy (Muelleriosis, Trichostrongylosis, Dicrocoeliosis dendriticum, Nematodirosis, Fasciolosis (Baliharová et al., 2003)) a ektoparazitózy. Z nepřátel je nejhorší větší toulavý pes (Javůrek, 1961).

## 2.2. ANTHELMINTIKA

Anthelmintika jsou látky používané pro eliminaci helmintů z organismu. Helminty je možno rozdělit do tří skupin: tasemnice (Cestodes), hlístice (Nematodes) a motolice (Trematodes). Podobně jako helminti jsou dělena také anthelmintika. Proti tasemnicím používáme anticestodika, proti hlísticím antinematodika a proti motolicím antitrepatodika (Lincová, Farghali et al., 2002).

### 2.2.1. Benzimidazolová anthelmintika

Podávání benzimidazolových anthelmintik je celosvětově rozšířeno především ve veterinární medicíně. Pro tuto indikaci jim patří dle ATC klasifikace kód Q09AA (veterinaria-anthelmintika). Používají se k léčbě a prevenci endoparazitických nákaz (Velík et al., 2004). Konkrétně to jsou tiabendazol, mebendazol, fenbendazol, albendazol, kambendazol, luxabendazol, triklabendazol, oxfendazol, oxibendazol, flubendazol, parbendazol, ciklobendazol a z proléčiv febantel, netobimin a thiofanat (Lamka a Ducháček, 1998). Species pro která jsou tato anthelmintika určena jsou psi, kočky, hovězí dobytek, ovce, kozy, prasata, koně, lamy, lovná zvěř a ptactvo, drůbež, plazi a člověk. V humání medicíně se z derivátů benzimidazolu k terapii helmintóz používají pouze mebendazol, albendazol a thiabendazol, kód ATC je P02CA (Velík et al., 2004).

Benzimidazoly jsou léčiva s antinematodní, z části antitrepatodní a anticestodní (vyjíměčně antimykotickou aktivitou). Mechanismus účinku je založen na inhibici energetického metabolismu parazitujících červů. Většina léčiv skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky i ovocidně. Anthelmintická aktivita je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. U monogastričních zvířat (pes, kočka, prase) a člověka je většinou třeba opakovaného podání léčiva. U polygastričních zvířat či dalších býložravců (skot, ovce, kůň,..) lze benzimidazoly podávat i jednorázově (Lamka a Ducháček, 1998).

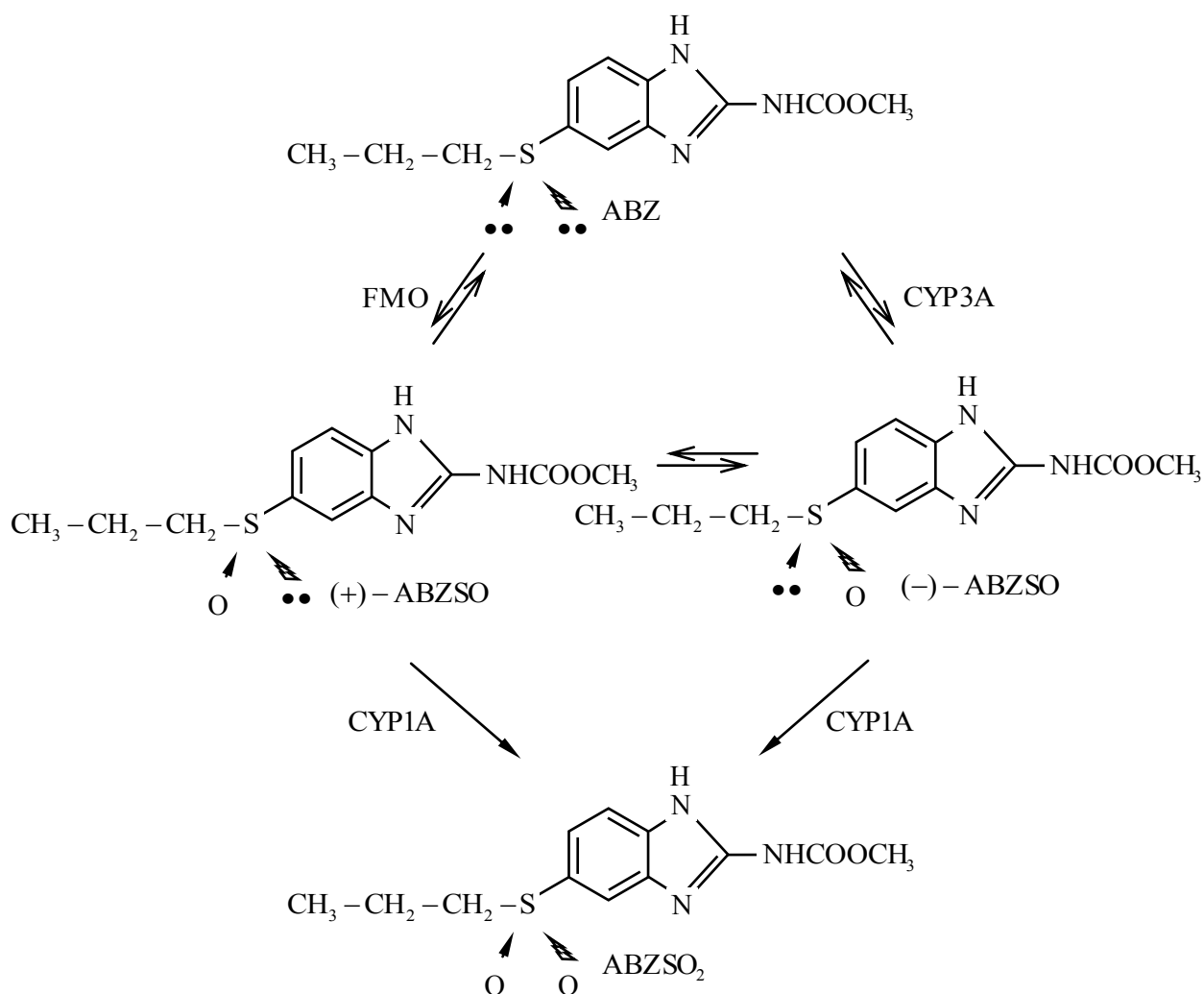
Ve své struktuře nemají benzimidazol pouze anthelmintika, ale připojením odlišných substituentů získáme inhibitory protonové pumpy či H<sub>1</sub> antihistaminika (Velík et al., 2004).

#### 2.2.1.1. Albendazol

Albendazol, chemicky methyl-[5-(propylsulfanyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát (ČL 2002), je důležitý zástupce benzimidazolových anthelmintik. Jeho biotransformace byla studována na mnoha živočišných druzích. Jako molekula s atomem síry podléhá při biotransformaci dvoustupňové S-oxidaci. V prvním kroku vznikne chirální albendazolsulfoxid (ABZSO), tuto reakci katalyzují především flavinové monooxygenasy a cytochrom P4503A. FMO se podílejí hlavně na vzniku (+) stereoizomeru, CYP hlavně na (-)



stereoizomeru. Poměr vzniklých (+) a (-) izomerů je druhově specifický. Dalším krokem je oxidace na albendazolsulfon (ABZSO<sub>2</sub>), přičemž se na katalýze nejvíce podílí podrodina cytochrom P4501A. Největší anthelmintickou aktivitu pravděpodobně vykazuje albendazolsulfoxid narozdíl od farmakologicky neúčinného albendazolsulfonu (Velík et al., 2003).



Obr.2 Schéma oxidace albendazolu (překresleno dle Velík et al., 2003)

První studie dokladující, že albendazol je induktor biotransformačních enzymů pochází z konce 80.let 20.století. Albendazol a albendazolsulfoxid, narozdíl od albendazolsulfonu, způsobují indukci podrodiny CYP1A. Albendazolsulfoxid má větší potenciál k indukci než parentní látka (Velík et al., 2004).

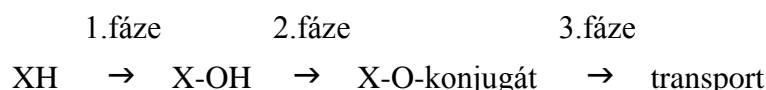
## 2.3. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Živé organismy se stále setkávají s látkami jim cizími (xenobiotiky). Aby tyto látky neznamenal pro organismus ohrožení jejich vnitřního prostředí, mají buňky řadu mechanismů, kterými se xenobiotikům brání. Organismy mají sadu enzymů, které dokáží cizorodé látky (léky, součásti potravin, znečištěniny vzduchu) přeměnit (biotransformovat) tak, aby vznikly látky, které se z organismu snadno vyloučí. To znamená, že se z původní lipofilní látky vytvoří většinou látka hydrofilnější, polárnější, která se lépe eliminuje (Kvasničková, 1995).

Z hlediska farmakologického účinku léčiva může při biotransformaci dojít ke dvojitě přeměně: 1) biodeaktivaci, kdy vytvořený metabolit nebo konjugát léčiva má nižší či žádný biologický účinek a 2) bioaktivaci, kdy se původní léčivo mění na metabolit více farmakologicky účinný či toxický (Lincová, Farghali et al., 2002).

Biotransformační přeměny a jejich důsledky jsou náplní jednoho z biochemických oborů – xenobiochemie. Ta studuje metabolické přeměny látek tělu cizích a enzymy, které tyto přeměny katalyzují. Zkoumá vlivy, které aktivitu biotransformačních enzymů mohou měnit. Odhaluje strukturu i vlastnosti metabolitů látek tělu cizích, zvláště jejich biologickou aktivitu. Přispívá k pochopení mechanismu účinku xenobiotika a studuje jejich vliv na důležité metabolické cesty endogenních látek – eobiotik (Kvasničková, 1995).

Je několik možností osudu xenobiotika v organismu. Pokud je dostatečně polární, je z organismu eliminováno beze změny. Pokud není dostatečně polární, ale má ve své struktuře volné hydrofilní skupiny, reaguje s endogenními sloučeninami za vzniku konjugátu, který je následně z organismu vyloučen. Další možností je, že xenobiotikům je pomocí enzymů oxidačních, redukčních nebo hydrolytických (viz dále) přeměněno na metabolit, který může být rovnou eliminován nebo může reakcí s endogenní sloučeninou vytvořit snadno vyloučitelný konjugát (Kvasničková, 1995). Následující schéma znázorňuje postup biotransformace xenobiotika, ale z uvedeného vyplývá, že některé fáze mohou být při biotransformaci daného konkrétního xenobiotika vynechána. Významnou roli v metabolismu léčiv hraje také transport xenobiotika a jeho metabolitů či konjugátů přes plazmatické membrány.



### 2.3.1. Biotransformační enzymy

Enzymy katalyzující biotransformaci léčiv i jiných cizorodých látek mají nižší substrátovou selektivitu, a proto se mohou podílet na biotransformaci látek nejrůznějších struktur i zcela nových sloučenin (Lincová, Farghali et al., 2002).

Je zvykem řadit enzymy oxidační, redukční a hydrolytické do tzv. 1. fáze metabolismu, kdy vzniká polárnější produkt zavedením nebo odkrytím substituentů, které jsou schopny reagovat s konjugáčními enzymy, které tvoří 2. fázi metabolismu. Vzniklý konjugát je zpravidla látka velmi polární, disociovaná v pH prostředí, není schopna se resorbovat a je proto vylučována z organismu (Kvasničková, 1995). Jako 3. fáze metabolismu xenobiotik se označuje jejich transport z buňky přes cytoplazmatickou membránu pomocí různých přenašečů (Štorkánová, 2004; Velík et al., 2004).

Hlavním místem biotransformace léčiv jsou játra (avšak i jiné orgány, např. ledviny, gastrointestinální trakt, kůže plíce), která mají významnou metabolickou aktivitu. Přeměna léčiv v játrech je velmi důležitá pro léčiva podávaná perorálně. „Efekt prvního průchodu játry“ významně limituje dostupnost léčiv silně metabolizovaných v játrech. Enzymy s biotransformační aktivitou jsou v buňce umístěny především v endoplazmatickém retikulu a cytosolu, ale tato aktivita byla zjištěna také v mitochondriích, v membráně buněčného jádra a plazmatické membráně (Lincová, Farghali et al., 2002).

#### 2.3.1.1. Reakce 1. fáze biotransformace

Jak již bylo zmíněno, reakce 1. fáze a enzymy, které je katalyzují, jsou oxidační, redukční a hydrolytické. Kvantitativně nejvýznamnější z celé této skupiny jsou oxidační reakce zprostředkované oxidačními enzymy (Kvasničková, 1995).

Při oxidačních reakcích dochází k zavedení hydroxylové skupiny do struktury léčiva, k dealkylaci, tvorbě N-oxidů či S-oxidů, deaminaci, dehalogenidaci, desulfuraci v závislosti na chemické struktuře původního léčiva. Katalýzu těchto reakcí zprostředkovává převážně enzymatický systém cytochromů P450 a flavinové monooxygenasy (Lincová, Farghali et al., 2002), ale důležité jsou i alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, xanthinoxidasa či aminooxidasy.

Při reakcích redukčních se redukují karbonylová skupina, nitro- a azoskupina, N-oxidy, sulfoxidy či dochází k redukční dehalogenaci (Lincová, Farghali et al., 2002). Těchto reakcí se účastní např. alkoholdehydrogenasa, aldo/ketoreduktasy, nitro- a azoreduktasy, dihydrodioldehydrogenasy, cytochromy P450, chinonreduktasa, glutathionreduktasa a další.

K reakcím hydrolytickým patří hydrolytické štěpení esterové vazby, vazby C-N (amidy, karbamáty, hydrazidy) a hydrolytická dehalogenace. Zúčastněné enzymy jsou např. arylesterasy, karboxyesterasy, acetylerasy, cholinesterasa, karboxyamidasy či epoxidhydrolasy (Lincová, Farghali et al., 2002).

### 2.3.1.1.1. Cytochromy P450

Enzymatický systém cytochromů P450 byl objeven v roce 1958 v mikrosomální frakci potkaních jater. Byl popsán jako hemoprotein vázaný na membrámu endoplazmatického retikula. Funkce tohoto enzymatického systému byla objasněna v roce 1963.

Původně byl cytochrom P450 popsán jako jediný enzym, v dnešní době je popsáno více než 1200 různých forem cytochromu P450 nacházejících se v nejrůznějších živočišných a rostlinných druzích. Kromě savců je popisován u ptáků, ryb, plazů, hmyzu, měkkýšů, plžů, členovců, hub, rostlin a bakterií (Dostálek, 2006).

Pod názvem cytochromy P450 se skrývá velká skupina enzymů, jejichž společnou vlastností je přítomnost hemu, jehož pátým ligandem je thiolátový anion pocházející z cysteinu. Tato skupina vykazuje po redukci hemoproteinu a vazbě s CO charakteristické absorpční maximum komplexu 450 nm (označení „450“ v názvu tohoto systému). Písmeno „P“ znamená peak. Šestáým ligandem hemu se v průběhu reakce stává molekula kyslíku. Cytochrom P450 se relativně snadno přeměňuje na formu inaktivní, což se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukované formy s CO z 450 nm na 420 nm, například v důsledku nahrazení thiolátové skupiny cysteinu imidazolem, histidinem či serinem (Dostálek, 2006).

Enzymy této skupiny se liší svými apoproteiny. Substrátová specifita jednotlivých forem je odrazem právě rozličnosti těchto apoproteinů.

S přibývajícím množstvím popisovaných cytochromů P450 bylo třeba vytvořit systém jednotného názvosloví. Všechny popsané cytochromy tvoří tzv. nadrodinu. Příslušnost k nadrodině se označuje zkratkou CYP. Podle stoupající podobnosti aminokyselinové struktury byl enzymatický systém cytochromu P450 rozdělen do rodin (s podobností nejméně 40%) a podrodin (s podobností nejméně 55%) a označen arabskými čísly a velkými písmeny. Zástupci dané podrodiny (např. CYP3A) se dále označují arabskou číslicí (např. CYP3A4). Číselné označení příslušné rodiny není náhodné, ale děje se podle předem daného schématu. Vyšší živočichové (1-49), nižší eukaryonta (51-70), rostliny (71-100), bakterie (101-174) (Dostálek, 2006).

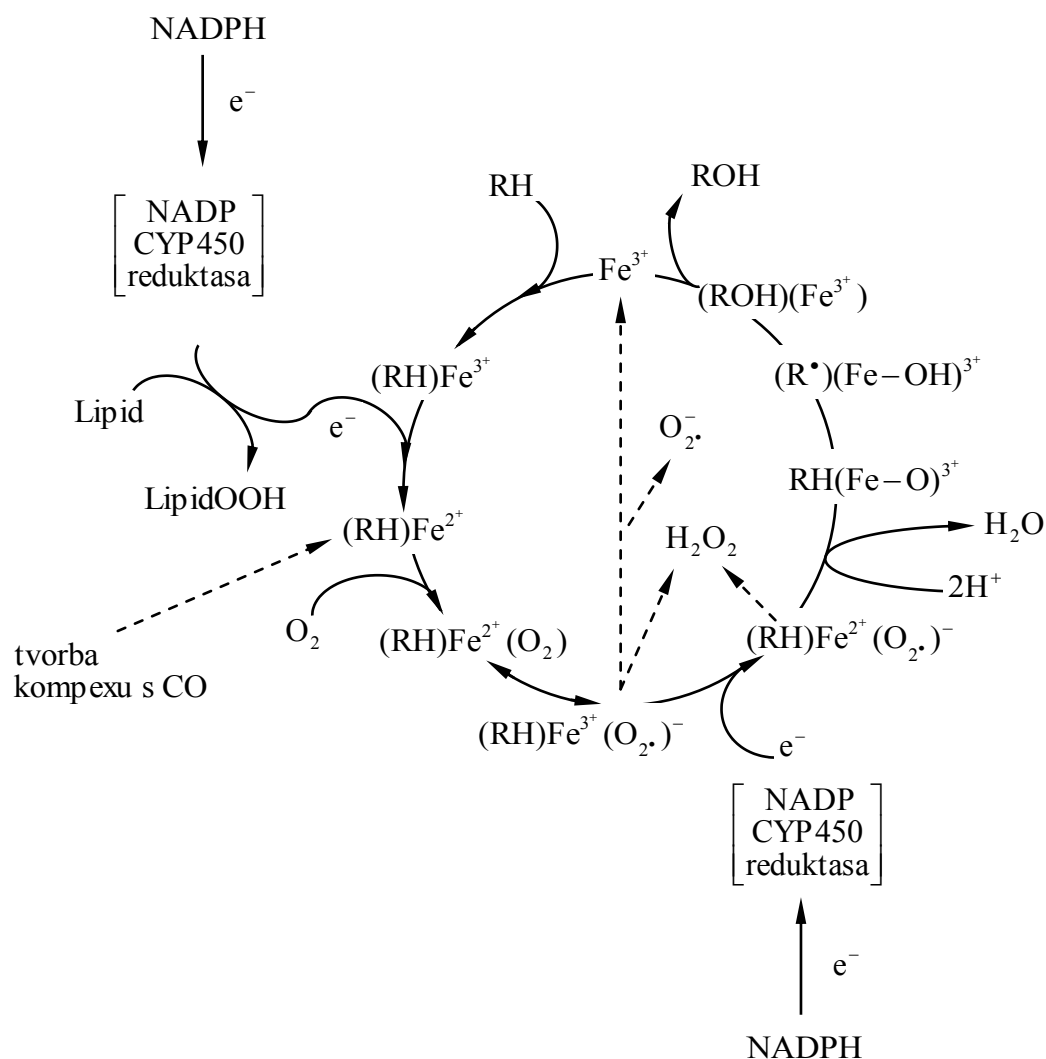
Starší název cytochrom P450 je dnes někdy pro bližší specifikaci nahrazován názvem hem-thiolátové enzymy (na rozdíl od redoxních proteinů, kterými jsou cytochrom a, b či c).

Systém cytochromu P450 katalyzuje více než 40 různých reakcí, z nichž nejdůležitější je hydroxylace. Počet chemických substancí, které se mohou stát substráty cytochromu P450 je větší než 1000. U člověka je známo přibližně šedesát různých forem cytochromu P450, lišící se jak strukturou, tak i substrátovou specifitou (Dostálek, 2006).

Tab.1 Funkční specifita zástupců enzymatického systému cytochromu P450 (Dostálek, 2006)

Funkční specifita	CYP
xenobiotika	CYP1,2A,2B,2C,2D,2E,3
steroidy	CYP2G,7,8B,11,17,19,21,27A,46
mastné kyseliny	CYP2J,4,5,8A
vitamín D	CYP24,27B
kyselina retinová	CYP26
žlučové kyseliny	CYP27
nejasná funkce	2A7,2R1,2S1,2U1,2W1,3A43,4A22,4F11,4V2,4X1,4Z1

Enzymatický systém cytochromu P450 je u eukaryot pevně vázán na membrány endoplazmatického retikula, mitochondrií či jádra, narozdíl od bakterií, kde se nachází v rozpustné formě v cytosolu. Tvoří přibližně 15% endoplazmatického retikula. Popisován je v játrech, ledvinách, prostatě, kůži, nosním epitelu, placentě, mozku, plicích, slezině, pankreatu, gastrointestinálním traktu, vaječnicích a varlatech (Dostálek, 2006).



Obr.3 Reakční cyklus enzymatického systému cytochromu P450 (překresleno dle Dostálek, 2006)

Centrální enzym monoxygenace je cytochrom P450, který obsahuje prostetickou skupinu Fe-protoporfirin IX. Substrát RH se váže s oxidovaou formou cytochromu P450 na komplex RH-(Fe<sup>3+</sup>). Dochází k jednoelektronové redukci železa za vzniku RH-(Fe<sup>2+</sup>), naváže se kyslík a vzniká ternální komplex RH-Fe<sup>2+</sup>(O<sub>2</sub>) ↔ RH-Fe<sup>3+</sup>(O<sub>2</sub>), který je redukován dalším elektronem. Následuje heterolýza vazby O-O, za vzniku reaktivního oxidantu a molekuly vody. Dvouelektrodovou oxidací substrátu vzniká produkt a regeneruje se cytochrom P450. Zdrojem kyslíku v monoxygenázové reakci mohou být i peroxidy (zvláště organické hydroperoxidy), reakční mechanismus je pak samozřejmě odlišný. K redukci cytochromu P450 jsou nutné dva elektrony z hydrogenovaného nikotinamid adenindinukleotid fosfátu NADPH. Ve tkáních savců nacházíme dva typy elektronových transportních systémů. Jeden typ nacházíme v mitochondriích, druhý v endoplazmatickém retikulu, tento druhý typ se nazývá též mikrosomální typ cytochromu P450. Transferu elektronů na mitochondriální cytochrom P450 pomáhají dvě rozpustné sloučeniny, konkrétně flavoprotein spojený s NADPH a protein ferodoxinového typu, s atomy síry a železa, nazvaný ferodoxin. Tyto enzymy byly poprvé popsány v dřeni nadledvin, i proto jsou velmi často nazývány adrenodoxin a adrenodoxin reduktáza. Mikrosomální cytochrom P450 se skládá ze dvou na membránu vázaných komponent, cytochromu a NADPH-cytochrom P450-reduktázy, jenž má dvě domény – flavin adenin dinukleotid (FAD) doménu a flavin adenin mononukleotid (FMN) doménu. FAD přijímá dva elektrony (nutné k redukci cytochromu P450) z NADPH a přes FMN je přenáší na enzymatický systém cytochromu P450 (Dostálek, 2006).

Na základních vlastnostech xenobiotik, jako struktura, geometrické struktura nebo elektrochemických vlastnostech, záleží kterou isoformou CYP budou biotransformovány.

Tab.2 Základní struktura substrátů pro různé isoformy CYP (dle Dostálka, 2006)

Substráty pro isoformu:	jsou:
CYP1A2	planární (poly)aromatické/heterocyklické aminy a amidy
CYP2C9	slabé kyseliny, sloučeniny s možností tvorby vodíkových můstků
CYP2C19	neutrální molekuly nebo slabé lipofilní báze s možností tvorby vodíkových můstků
CYP2D6	bazické sloučeniny, nejčastěji s molekulou N ve své molekule
CYP2E	neutrální sloučeniny s malou molekulovou hmotností
CYP3A4	sloučeniny s velkou molekulovou hmotností

Množství cytochromu v jednotlivých tkáních nelze brát absolutně. Jejich obsah v tkáních závisí na mnoha faktorech, například na genetickém polymorfismu, vlivu vnějšího prostředí, výživě, věku, pohlaví, kouření, konzumace alkoholu, působení podávaných léčivých přípravků. To znamená, že i v případě, kdy je o určité formě cytochromu P450 deklarováno, že je přítomna jen v mizivém množství, může jeho koncentrace v příslušné tkáni či orgánu za určitých podmínek extrémě narůst (Dostálek, 2006).

### **Podrodina CYP3A**

Tato rodina se jeví jako nejdůležitější z celého systému cytochromu P450, protože figuruje jak v biotransformačních procesech xenobiotik, tak i endogenních substrátů. Široká substrátová specifita naznačuje skutečnosti, že se tato podrodina vyvinula v průběhu evoluce zejména z toho důvodu, aby chránila živé organismy před škodlivinami z vnějšího prostředí, které se do těla dostávají potravou (má velký význam v procesu presystémové eliminace). Jedná se však o velmi nestabilní formu což do značné míry omezuje i práci v in vitro podmínkách (Dostálek, 2006).

### **Podrodina CYP1A**

Zástupci podrodiny CYP1A, isoformy CYP1A1 a CYP1A2, se také velmi významně podílí na biotransformačních procesech xenobiotik. Katalyzují podobné reakce a mají rovněž ze 70% shodnou aminokyselinovou sekvenci. Jsou ovlivnitelné řadou faktorů (věk, pohlaví, těhotenství, řada induktorů a inhibitorů). Bylo prokázáno, že zvýšená aktivita těchto forem ovlivňuje výskyt nádorů (počet i růst) a to u isoformy CYP1A1 plic, prsu a kůže a v případě isoformy CYP1A2 kolorektálních nádorů a nádorů močového měchýře. Populaci můžeme podle metabolické aktivity formy rozdělit na pomalé, středně rychlé a rychlé metabolizátory (Dostálek, 2006).

### **Podrodina CYP2C**

U této podrodiny je velmi zajímavé, že není známa žádná toxická látka, která by byla touto podrodinou aktivována. Na rozdíl od zbývajících forem podrodiny CYP2C není forma CYP2C18 inducibilní. Opět zde existuje polymorfismus (Dostálek, 2006).

#### **2.3.1.1.2. Flavinové monooxygenasy (FMO)**

Flavinové monooxygenasy byly objeveny v roce 1964 Zieglerem, tedy v době, kdy se pozornost soustředila na studium cytochromů P450.

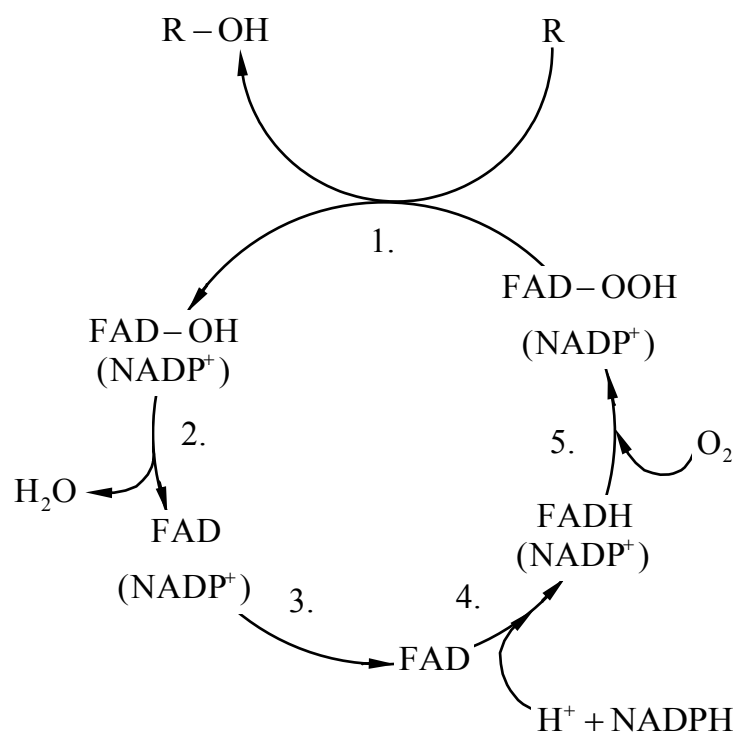
Některé substráty mají oba dva enzymové systémy společné, na jejich metabolismu se ale podílejí různou měrou a vzniklé produkty se od sebe mohou lišit (např. prostorovým uspořádáním). Reakční mechanismus obou monooxygenas je zásadně odlišný (Kvasničková, 1995). Liší se také tím, že na rozdíl od cytochromu P450 jsou FMO tepelně labilní, inhibovatelné teplem. Cytochrom P450 je inhibovatelný neionickým detergentem, který na FMO nepůsobí. Z hlediska pH, které je pro katalýzu danými systémy optimální, je to pro FMO mezi 8-10, pro většinu cytochromů P450 mezi 7-8 (Štorkánová, 2004).

Substráty flavinových monooxygenas jsou sloučeniny různé struktury, fyzikálně-chemických vlastností i biologické aktivity. Společné však je, že v molekule obsahují nukleofilní centrum, které je často tvořeno heteroatomem (mají afinitu k sloučeninám, které

obsahují dusík, síru nebo fosfor). Většina eobiotik (endogenních substrátů) jsou také nukleofily, ale před katalytickým účinkem FMO je chrání více než jeden náboj v molekule což aktivitu FMO blokuje. Víme, že většina důležitých biomolekul v buňce jsou dikationty (např. polyaminy), dipolární sloučeniny (aminokyseliny, peptidy) nebo obsahují více než jeden aniont v místě vzdáleném od heteroatomu (koenzym A, thiaminpyrofosfát aj.), a tak počet iontově nabitých skupin a jejich pozice v molekule chrání eobiotické nukleofily před katalytickým působením FMO. Biotransformují ale řadu léčiv (alkaloidy, antihistaminika, inhibitory monoaminoxidasy, antidepresiva aj.), látek ze zevního prostředí (agrochemikálie) či znečištěnin vody a ovzduší (Kvasničková, 1995).

Některé typy reakcí, které FMO katalyzují jsou: oxidace primárních, sekundárních a terciálních aminů, oxidace sulfidů a sulfoxidů, oxidace thiolů, sulfenových kyselin a disulfidů, oxidace thioamidů či thiokarbamidů (Kvasničková, 1995).

FMO jsou přítomny takřka ve všech buňkách v organismu a jsou značně enzymově aktivní. Existuje pět isoform FMO, klasifikace vychází z primární struktury enzymové bílkoviny a zásady pro jejich nomenklaturu byly převzaty z nomenklatury cytochromů P450. Jednotlivé isoformy se liší v primární struktuře, spektrálními vlastnostmi i specifitou k substrátům (Kvasničková, 1995).

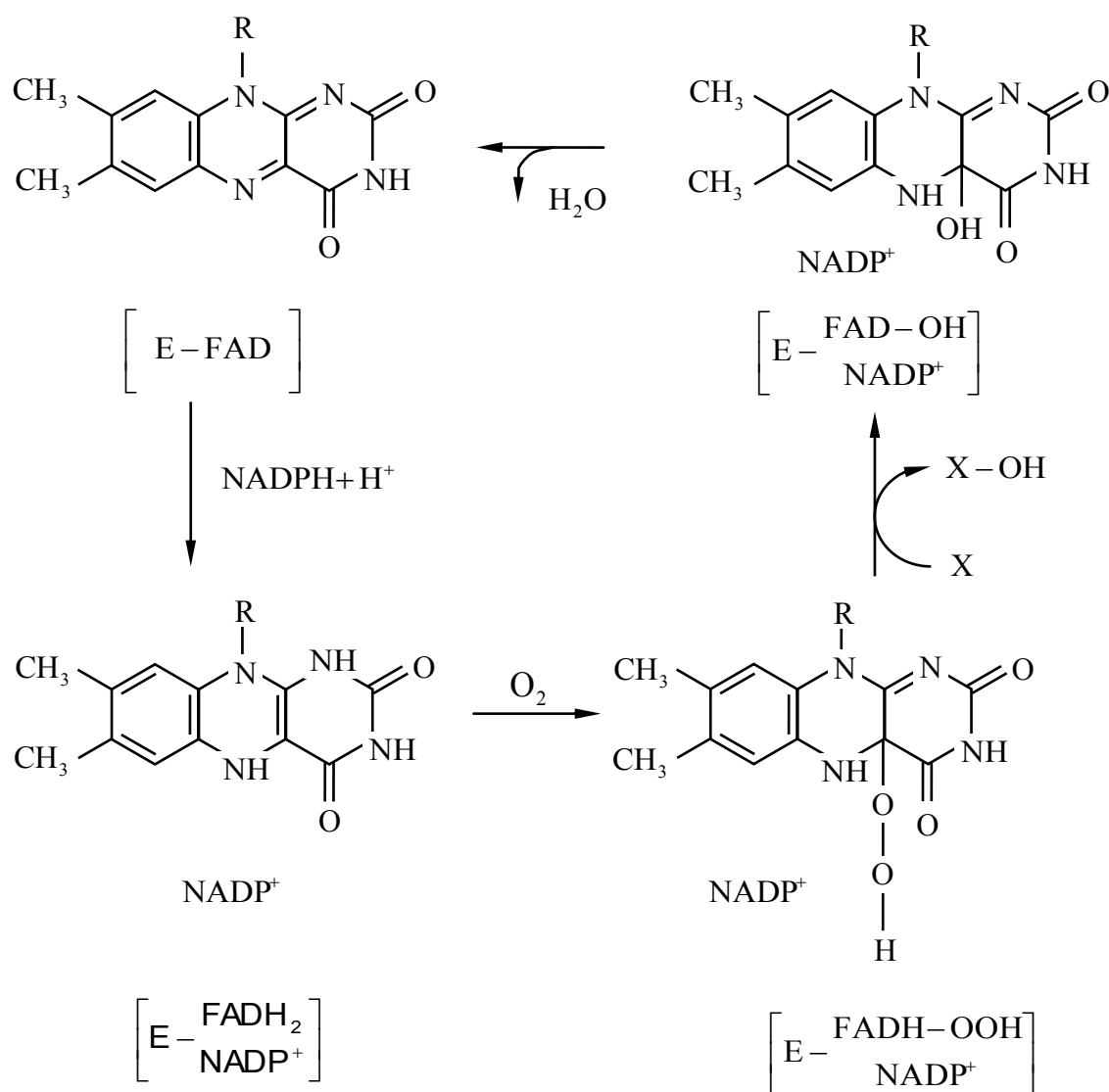


Obr.4 Zjednodušené schéma mechanismu katalýzy FMO (dle Kvasničková, 1995)

Koenzymem flavinových monooxygenas je flavinadenin dinukleotid (FAD). Ten je redukován NADPH (donorem elektronu) na FADH, ten reaguje s kyslíkem a vzniká nejdůležitější meziprodukt 4 $\alpha$ -hydroperoxid flavinu, který reaguje se substrátem R za vzniku oxygenovaného produktu R-OH. 4 $\alpha$ -hydroperoxid se mění na 4 $\alpha$ -hydroxid flavinu, který dále regeneruje na FAD. Zvláštnost této katalýzy spočívá v tom, že aktivaci kyslíku (tedy ke



vzniku 4 $\alpha$ -hydroperoxidu) dochází bez účasti substrátu, ostatní kroky katalytického cyklu znamenají regeneraci všech reakčních meziproduktů, kterých se substrát neúčastní (Kvasničková, 1995). Enzym, jehož základem je isoalloxazinový kruh, tedy existuje ve čtyřech detegovatelných formách: redukované, oxidované, hydroxylované a hydroperoxidové, jak se názorně vidět na následujícím schématu.



Obr.5 Pravděpodobný mechanismus katalytického cyklu FMO (dle Kvasničková, 1995)

### 2.3.1.2. Reakce 2. fáze biotransformace

Biotransformační reakce 2. fáze se nazývají reakce konjugační nebo syntetické. Při nich dochází za účasti enzymů transferas k vytvoření kovalentní vazby mezi funkční skupinou původního léčiva či metabolitu z 1. fáze a konjugačním činidlem (kyselina glukuronová, sulfát, glutathion, methionin, acetát, aminokyseliny). Konjugační činidla vznikají v těle z živin v procesu intermediárního metabolismu. Vytvářejí se polární konjugáty, téměř vždy neaktivní, které jsou rychle vylučovány do moče nebo stolice. Někdy ale mohou vzniknout i toxicky působící konjugáty. Konjugáty léčiv s vyšší molekulovou hmotností se vylučují z větší části do žluče a mohou se v přítomnosti střevních reduktáz štěpit na původní látku. Konjugační reakce probíhají zejména v játrech, ledvinách či plicích (Lincová, Farghali et al., 2002).

Biosyntetické mechanismy konjugačních reakcí vyžadují zdroje energie. Tato energie může být dodána buď aktivací konjugačního činidla nebo aktivací substrátu (Kvasničková, 1995). Obecně jsou reakce katalyzovány enzymy transferasami. Tvorby glukuronidů je katalyzována přenosem UDP-glukuronové kyseliny pomocí glukuronosyltransferasy, tvorba sulfátů přenosem fosfoadenosylfosfosulfátu pomocí sulfotransferasy, acetylace přenosem acetylkoenzymu A pomocí acetyltransferasy, tvorba merkapturonové kyseliny neboli glutathionová konjugace přenosem glutathionu pomocí glutathiontransferas a tvorba metylovaných konjugátů přenosem S-adenosylhomocysteinu (tvořeného z methioninu) pomocí methyltransferas na metabolit nebo léčivo obsahující příslušnou -OH, -SH nebo -NH funkční skupinu v molekule. Při peptidových konjugacích se aktivuje léčivo ve formě kyseliny s aminokyselinou glycinem nebo glutaminem za pomoci acyltransferas (Lincová, Farghali et al., 2002).

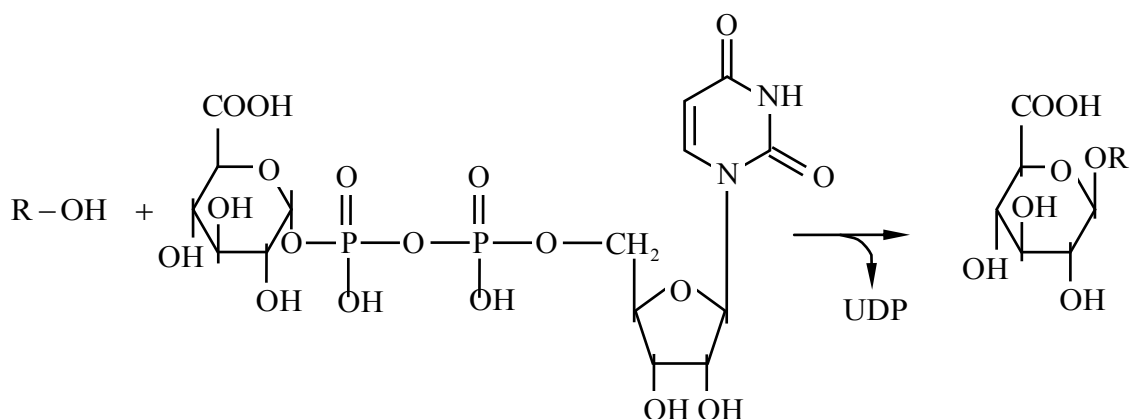
Substrátem pro konjugační reakce jsou i některá eobiotika, jako steroidní hormony, bilirubin či některé žlučové kyseliny (Kvasničková, 1995).

Dále bude pozornost věnována enzymům, které přímo souvisí s experimentální částí diplomové práce, tedy v případě enzymů 2.fáze UDP-glukuronosyltransferase a glutathion-S-transferase.

#### **2.3.1.2.1. UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)**

Glukuronidace je nejčastější konjugační reakce. Podle substrátu rozlišujeme čtyři skupiny glukuronových konjugací a to O-, N-, S- a C-glukuronidace. Podléhají jí nejen xenobiotika, ale i řada eobiotik, např. bilirubin, steroidní hormony, thyroïdní hormony, serotonin. Enzym katalyzující tyto reakce je UDP-glukuronosyltransferasa. Nejvyšší aktivitu má v játrech, dále

v ledvinách, gastrointestinálním traktu a v kůži. Převážně je lokalizován na membránách hladkého a drsného endoplazmatického retikula (Kvasničková, 1995).



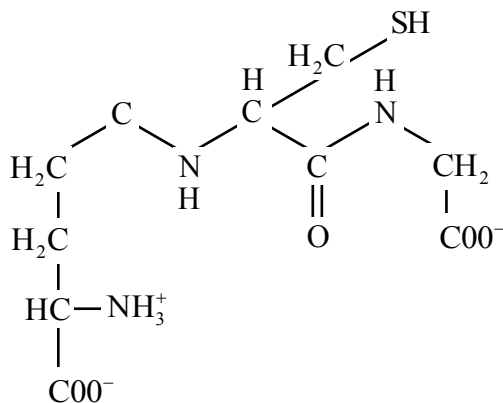
Obr.6 Schéma konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou (dle Kvasničková, 1995)

Tato reakce ukazuje přenos glukuronosyly z uridindifosfoglukonátu na vhodný nukleofilní akceptor (např. hydroxyl, karboxyl, sulfhydrylovou skupinu, aminoskupinu). Přitom dochází k inverzi na anomerickém uhlíku cukerného zbytku z polohy  $\alpha$  do polohy  $\beta$ . Vzniklé konjugáty jsou většinou rozpustné, polární, disociované, jsou posledními produkty ve sledu biotransformačních přeměn vylučované z organismu močí a žlučí (Kvasničková, 1995).

Jako u jiných biotransformačních enzymů i u glukuronosyltransferasy existuje několik isoform. Jejich nomenklatura, podobně jako např. u cytochromů P450, vychází z aminokyselinového složení (rodina, podrodina, konkrétní isoforma).

### 2.3.1.2.2. Glutathion-S-transferasa (GST)

Glutathion (=glutamylcysteinylglycin) je fyziologicky významný tripeptid, který (kromě jiných funkcí) se účastní metabolismu xenobiotik. Je silným nukleofilním konjugáčním činidlem (Kvasničková, 1995).

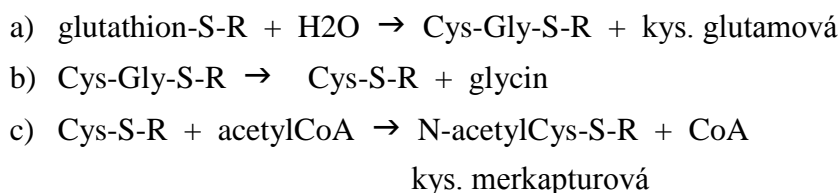


Obr.7 Strukturní vzorec glutathionu

Substráty těchto reakcí jsou a) sloučeniny se silně elektrofilní skupinou (halogenidová, sulfonová, fosfátová, nitroskupina), b) sloučeniny s dvojnou vazbou mezi atomy uhlíku, c) arenoxidy a epoxidy (nepotřebují enzymovou katalýzu), d) sloučeniny s elektrofilním heteroatomem.

Glutathion-S-transferasa se nachází v cytosolu buněk a vyznačuje se schopností vázat velký počet lipofilních molekul i takových, které nejsou jejich substráty v buňkách. Tím pomáhají „uskladnit“ některé toxické sloučeniny i endogenní látky (např. bilirubin). Lze tedy říci, že odstraňují toxický vliv některých sloučenin nejen tím, že je přeměňují na méně toxické konjugáty, ale i vazbou na svoji molekulu (Kvasničková, 1995).

Na rozdíl od jiných konjugátů, nejsou konjugáty s GSH konečným produktem biotransformace. Účinkem  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy je konjugát dále transformován – glutathion-S-konjugát je přeměněn na merkapturonovou kyselinu několika postupnými kroky. Nejprve je odštěpen glutamát, v dalším stupni glycin a zbývá cystein S-konjugát, který je acetyltransferasou acetylován a vzniká příslušná merkapturová kyselina (viz. obr. 8) (Kvasničková, 1995).



R=konjugovaný zbytek xenobiotika

Obr.8 Schéma přeměny glutathion-S-konjugátu (dle Kvasničková, 1995)

## 2.4. INDUKCE A INHIBICE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ

Některá léčiva vyvolávají zvýšenou enzymatickou aktivitu, tzv indukci, jiná léčiva naopak metabolickou enzymatickou aktivitu tlumí a způsobují tzv. inhibici. Protože se nemusí jednat o specifický děj, velmi často se tato změna metabolické aktivity týká několika enzymů. Důsledkem enzymatické indukce po opakovaném podání látky není jenom zrychlení metabolismu, ale i snížení plazmatických hladin a terapeutického účinku. K této situaci dochází v případech, kdy metabolity léčiva mají malý nebo žádný farmakologický účinek. Pokud mají metabolity větší účinek, resp. vyšší toxicitu než mateřská látka, může při enzymatické indukci dojít až k projevům intoxikace. Jiné lékové substráty mohou biotransformační procesy inhibovat. Výsledkem inhibice biotransformačních procesů je většinou prodloužení farmakologického účinku vyvolávající látky i současně podávaných

léciv, která se vylučují stejnou biotransformační cestou jako látky vyvolávající inhibici. V případě, že se léčiva metabolicky transferují na aktivní meziprodukty, může inhibice biotransformačních procesů snížit účinek v neaktivní formě podávaného léčiva (Dostálek, 2006).

Indukce biotransformačních enzymů byla studována od konce 50.let 20.stol., zvláště ve vztahu k cytochromu P450 (Kvasničková, 1995; Conney, A.H., 2003).

Enzymová indukce se vzhledem k farmakologickým důsledkům definuje jako zvýšení aktivity specifického enzymu, které je výsledkem zvýšení jeho syntézy (zvýšení syntézy m-RNA) nebo snížením jeho degradace či pozitivní modulací hotového enzymu (Kvasničková, 1995).

#### **2.4.1. Mechanismus indukce CYP 1A**

Na biotransformaci xenobiotik se podílejí hlavně rodiny CYP1, 2, 3 a 4. Jednotlivé isoformy cytochromu P450 jsou indukovatelné podáváním určitých látek. Indukce exprese rodiny CYP1 je regulována prostřednictvím heterodimeru AhR (aryl hydrocarbon receptor) a Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Exprese rodin CYP2, 3 a 4 je kontrolována jinými transkripčními faktory jaderných receptorů (CAR, PXR či PPAR) (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).

Silnými induktory transkripce CYP1A1 a CYP1A2 jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), např. 3-methylcholantren,  $\beta$ -naftoflavon či benzo(a)pyren a halogenované aromatické uhlovodíky (HAH), např. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin nebo 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. Jak již bylo zmíněno výše, indukci transkripce genů pro tyto isoformy zprostředkovává Ah receptor (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005; Daujat et al.,1996).

Normálně se AhR nachází v klidovém stavu v cytoplazmě v komplexu s Hsp90 (90kDa heat-shock proteins), XAP2 a p23. Po navázání induktoru na cytosolickou AhR ligand vázající podjednotku, tato podléhá aktivačnímu procesu, který zahrnuje uvolnění Hsp90, přemístění do jádra a heterodimerizace s Arnt. Tento heterodimerický komplex interaguje s transkripčními faktory nazývanými XRE (xenobiotic-responsive elements) (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005; Daujat et al.,1996).

AhR má stejné složení od bezobratlých po obratlovce. Tento vysoký stupeň konzervace mezi druhy naznačuje, že AhR hraje důležitou roli v udržování homeostázy. Toto tvrzení podporuje fakt, že mnoho endogenních sloučenin s chemickými vlastnostmi odlišnými od těch látek, které jsou známy jako silně účinné induktory, byly izolovány jako potenciální přirozené ligandy. Mezi ty patří například tryptamin, bilirubin, biliverdin či lipoxin A<sub>4</sub>. Tyto endogenní sloučeniny mají v porovnání s PAHy a HAHy mnohem nižší vazebnou afinitu k AhR (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).

Benzimidazolové deriváty (inhibitory protonové pumpy – omeprazol, lansoprazol a antiparazitika – oxfendazol, albendazol, fenbendazol, thiabendazol) jsou také poměrně výrazné induktory genu pro CYP1A1. Nemají však jako typické silné aktivátory AhR (PAH,

HAH) planární strukturu (Daujat et al., 1996). Proto se předpokládá, že nepůsobí přímo jako ligandy AhR, ale aktivují AhR dependentní genovou expresi nepřímo, prostřednictvím metabolické přeměny na ligandy či tak, že ovlivní některou intracelulární cestu, která vyústí v aktivaci AhR (ligand independentní aktivace AhR) (Denison a Nagy, 2003).

Za normálních podmínek vykazuje gen pro CYP1A2 určitou bazální expresi, zatímco žádná bazální exprese nebyla pozorována u CYP1A1. Exprese CYP1A1 může být zvýšena v mnoha tkáních jako odpověď na přítomnost induktoru, zatímco exprese CYP1A2 je omezena pouze na játra (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- stanovit enzymové aktivity cytochromu P450 1A1/2, 3A, 2C9 v mikrosomální frakci homogenátu jater a střevní mukózy muflonů
- stanovit enzymovou aktivitu FMO v mikrosomální frakci homogenátu jater a střevní mukózy muflonů
- stanovit aktivitu konjugačních enzymů UGT a GST v mikrosomální resp. v cytosolické frakci homogenátu jater a střevní mukózy muflonů
- porovnat tyto aktivity ve skupině léčených a kontrolních muflonů, tzn. zjistit jestli má jednorázové podání albendazolu (30 mg/kg ž. hm.) modulační vliv na některý ze sledovaných enzymů
- testovat metabolismus albendazolu (ABZ) *in vitro* v mikrosomální frakci homogenátu jater a střevní mukózy muflonů, stanovit kinetické parametry sulfoxidace ABZ
- porovnat metabolismus ABZ u kontrolních a léčených zvířat
- posoudit, jestli by z hlediska indukce enzymů nebylo výhodnější podávat muflonům jednorázově albendazol v dávce 30 mg/kg ž. hm. oproti dávkovacímu schématu 5 x 7,5 mg/kg ž. hm.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. POKUSNÁ ZVÍŘATA A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Species, na kterém byla prováděna experimentální část této diplomové práce, byl muflon (*Ovis musimon*). Konkrétně šlo o muflonky z obory Vlkov, které byly rozděleny do dvou skupin. Jedné skupině byl jednorázově podán albendazol (30 mg/kg živé váhy), druhá skupina sloužila jako kontrolní. Každá skupina čítala celkem pět zvířat. Ve skupině léčených byly muflonky označené 41 (6 let stará, 27 kg), 42 (10 let, 29 kg), 43 (8 let, 31 kg), 44 (6 let, 29 kg), 45 (9let, 27 kg). Kontrolní skupinu tvořily muflonky označené ČL (6 let), ČP (6 let), 54 (5 let), 58 (6 let) a 60 (8 let). Zvířata nebyla jinak medikována.

Albendazol byl podán individuálně perorálně jako 10% suspenze připravená z Vermitanu 20% granulátu AUV dispergací v gelu z mikrokrystalické celulózy (Avicel RC-591). Kontrolní skupině byl podáván gel bez albendazolu.

24 hod. po podání byla zvířata utracena. Z jejich dutiny břišní byly vyjmuty játra a asi 1,5 m tenkého střeva (měřeno od duodena). Krev z jater a střevní obsah byly vymyty příslušnými roztoky. Játra byla rozdělena na malé kousky, střeva asi na pětiny a během cesty do laboratoře byly zmrazeny v tekutém dusíku. V laboratoři byly do dalšího zpracování uchovávány v hlubokomrazícím boxu při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. PRACOVNÍ POSTUPY

#### 4.2.1. Použité chemikálie a přístroje

Chemikálie:

- Na – fosfátový pufr 0,1M pH 7,4
- Na – fosfátový pufr s 20 % glycerolu
- Tris – HCl pufr 0,1M pH 7,4
- draselno – fosfátový pufr 0,1M pH 8,0
- roztok A:  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BCA v 0,1M NaOH
- roztok B: 4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- polyklonální IgG proti CYP1A1/2
- anti IgG protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatou
- ethoxyresorufin, methoxyresorufin, pentoxyresorufin, benzyloxyresorufin
- $\text{MgCl}_2$
- DMSO
- NADPH



- resorufin
- thiobenzamid
- acetonitril
- HFC
- testosteron
- dichlormethan
- kortikosteron
- MFC
- p – nitrofenol
- UDP – glukuronová kyselina
- neionogenní detergent Slovasol
- kyselina trichloroctová 3 %
- NaOH
- CNDB
- GSH
- ABZ
- ABZSO
- ABZSO<sub>2</sub>

Přístroje:

- laboratorní předvážky Kern KB
- analytické váhy Scaltec SBC 22
- pH metr Thermo Orion model 410A
- homogenizátor Potter S
- Haraeus Biofuge stratos
- Beckman Coulter
- Hawlet Packadr Scanjet 3570c
- Ultrazvuková lázeň NETZ
- Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS50B
- Třepačka Multi – vortex V-32
- Eppendorf Thermomixer comfort
- Bio – Rad Model 550 Microplate Reader
- Spektrofotometr Helios β
- Thermo Haake P5
- Eppendorf centrifuge 5415D
- Eppendorf concentrator 5301
- Universal UV lampe Camag
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Hawlet Packard 1100

#### 4.2.2. Příprava subcelulárních frakcí

Vzorky jater od léčených a neléčených muflonů byly vyndány z hlubokomrazícího boxu. Po mírném roztátí při laboratorní teplotě byly rozstříhány na malé kousky a rozváženy po 5g (2x 5g od každého muflona). V chladicím boxu byly zhomogenizovány a zředěny 0,1M Na-fosfátovým pufrům pH 7,4 1:6 (tzn. 5g jater v 30ml pufru).

Se vzorky střev se postupovalo tak, že po rozmrazení v roztoku Na- fosfátového pufru se rozstříhly podél a pro účel získání mikrosomů a cytosolu s obsahem biotransformačních enzymů se použila pouze střevní mukóza seškrábnutá z vnitřní strany střev. 10g této mukózy bylo zhomogenizováno a zředěno Na-fosfátovým pufrům 1:3 (tzn. 10g mukózy v 30ml pufru).

Následný postup byl u jater i střev stejný. Nejdříve byly v předchlazené (4st.C) centrifuze Heraeus centrifugovány při 5000g 20min. Supernatant z prvního točení byl přelit do čistých kyvet a znovu centrifugován ve stejném rotoru při 20000g 60min. Následně byl supernatant opatrně přelit do centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu Beckman a v ní točen při 100000g 60min.

Supernatant po třetí centrifugaci byl požadovaný cytosol. Ten byl slit do kádinek a za stálého míchání rozpipetován po 1,1ml do mikrozkumavek.

Peletu po třetí centrifugaci tvořily mikrosomy. Pro jejich přečištění se opět zředily 30ml pufru, zhomogenizovaly a ultracentrifugovaly při 100000g 60min. Získaná peleta - mikrosomy se zhomogenizovaly s 5ml Na-fosfátového pufru s 20% (v/v) obsahem glycerolu. Takto zhomogenizované mikrosomy byly slity do kádinek, ještě se na chvíli ponořeny do ultrazvukové lázně pro lepší homogenizaci a za stálého míchání na míchačce rozpipetovány po 1,1ml do mikrozkumavek.

Mikrozkumavky s cytosolem i mikrosomy byly od jejich získání do použití v příslušných stanovení aktivit uchovávány v hlubokomrazícím boxu se stálou teplotou -80°C.

#### 4.2.3. Stanovení celkové koncentrace bílkoviny metodou BCA

Princip metody spočívá v tom, že proteiny reagují s měďnatými ionty  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přecházejí na měďné  $\text{Cu}^{1+}$ , které redukuje BCA (bicinchonic acid) za vzniku modrého zbarvení. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Měří se spektrofotometricky na mikrotitrační destičce pomocí čtečky Biorad při 562nm.

Pro vlastní stanovení koncentrace bílkoviny byly mikrosomy a cytosol zředěny 20x redestilovanou vodou. Takto byly připraveny dvě ředění a z každého ředění pak čtyři paralelní vzorky, celkem tedy osm paralelních vzorků pro měření bílkoviny pro každé mikrosomy a cytosol.

Do každé jamky na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  vzorku bílkoviny (výše uvedené naředěné mikrosomy a cytosol) a 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku C, který v čas

potřeby vznikl naředěním roztoku A a roztoku B v poměru 50:1 (viz níže). V jednotlivých sloupcích na destičce tedy byly vzorky od jednotlivých zvířat a to vždy čtyři vzorky od každého ze dvou ředění. Do prvního sloupce byla místo vzorku bílkoviny napipetováno 10ul vody, tento sloupec byl pro měření slepých vzorků. Jedna jamka též posloužila pro změření tzv. blanku, zde bylo 210  $\mu$ l vody. Vzorky byly dobře promíchány a 30min se inkubovaly při 37°C.

Po inkubaci byla na čtečce Biorad změřena absorbance při 562nm proti destilované vodě (blanku) a poté od hodnot absorbance vzorků odečten průměr hodnot absorbance slepých vzorků.

Roztok A:  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BCA v 0,1M NaOH

Roztok B: 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Při výpočtu koncentrace bílkoviny se vycházelo z již dříve zhotovené kalibrační křivky, kde byl jako standard použit hovězí sérový albumin.

#### 4.2.4. Elektroforéza, western blotting

Rozdělení jednotlivých proteinů pomocí gelové elektroforézy a následná inkubace s protilátkami proti CYP1A1/2 bylo prováděno pro kvantifikaci indukce těchto isoformů cytochromu P450. Měření bylo provedeno s jaterní i střevní mikrosomální frakcí léčených a kontrolních muflonů.

##### SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza

*Princip:*

Jednotlivé polypeptidové řetězce tvoří komplex se záporně nabitými molekulami SDS (=dodecylsulfát sodný, součást vzorkového, elektrodového pufru i gelů), a proto se v gelu pohybují ve formě záporně nabitého komplexu SDS-protein destičkou porézního polyakrylamidového gelu. Redukční činidlo, například merkaptoethanol, se přidává pro přerušování disulfidových vazeb uvnitř proteinu nebo mezi dvěma molekulami. Za těchto podmínek se proteiny pohybují rychlostí odpovídající jejich molekulové hmotnosti (Alberts et al., 1998).

*Postup:*

Nejprve byly připraveny gely (separační – spodní a zaostřovací – horní), elektrodový pufr (ředěním koncentrovaného elektrodového pufru), vzorkový pufr (k zásobnímu vzorkovému pufru přidán 2-merkaptoethanol 50  $\mu$ l/ 1 ml).

Vzorky mikrosomů byly naředěny na koncentraci proteinu 2  $\mu$ g/ $\mu$ l redestilovanou vodou. Následně bylo 20  $\mu$ l takto naředěných proteinů smícháno se vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a povařeno 3 min v mikrozkuřkách v termobloku. Byl připraven stojánek

s gelem, elektrodový pufr byl nalit do horního i spodního elektrodového prostoru. Pomocí nanášecího bloku byly napipetovány vzorky (10 µl) a do jedné jamky byl napipetován molekulární standard (5 µl). Vanička s aparaturou byla postavena do ledové lázně. Elektroforéza probíhala na zaostřovacím gelu při konstantním napětí 100 V, na separačním při napětí 200 V.

### Western blotting

#### *Příprava na blotting:*

Po elektroforéze byl separační gel opatrně vyjmut ze stojánku a na několik minut ponořen do blotovacího pufru. Při sestavování blotovacího sendviče se postupovalo od spodních částí blotovacího zařízení a všechny součásti sendviče byly nejdříve namočený v blotovacím pufru. Složení sendviče od spodních vrstev: bílá houbička, silný filtrační papír, gel, nitrocelulósová membrána, silný filtrační papír, bílá houbička. Sendvič byl umístěn do blotovací vaničky, zcela zalit blotovacím pufrem, vanička byla umístěna do ledové lázně. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 90 min při konstantním napětí 100 V.

#### *Detekce:*

Po skončení blottingu byla membrána vyjmuta, promyta a následovala inkubace s primární protilátkou (polyklonální kozí IgG proti CYP1A1/2 – Daiichi Chemicals, Tokyo, Japonsko) 45min při pokojové teplotě. Po intenzivním promývání následovala inkubace s AP-sekundární protilátkou (anti-kozí IgG konjugovaná s alkalickou fosfatase pro chemiluminiscenční detekci - Pierce, Illinois, USA) opět 45 min při pokojové teplotě. Membrána byla opět promyta v příslušných roztocích. Nakonec byla membrána vysušena mezi filtračními papíry a umístěna do speciální kazety s filmem. Následovala expozice filmu, vyvíjení a ustalování. Vyhodnocení probíhalo denzitometricky.

### **4.2.5. Spektrofluorimetrické stanovení aktivity EROD, MROD, PROD, BROD**

Touto metodou se stanovuje enzymová aktivita, která je u potkana a člověka přiřazována aktivitě isoform cytochromů P450: CYP1A1/2 (EROD, MROD), CYP2B (PROD), CYP3A a částečně CYP2B (BROD). Metoda je založena na přidání substrátu, relativně specifického jen pro určitou isoformu CYP k mikrosomální frakci. CYP metabolizují substrát na fluoreskující produkt – resorufin. Přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru (Perkin-Elmer LS 50 B).

Stanovované aktivity:

- EROD = ethoxyresorufin-*O*-deethylasa; substrátem je ethoxyresorufin
- MROD = methoxyresorufin-*O*-demethylasa; substrátem je methoxyresorufin
- PROD = pentoxyresorufin-*O*-depentylasa; substrátem je pentoxyresorufin
- BROD = benzyloxyresorufin-*O*-dearylasa; substrátem je benzyloxyresorufin

Použité zásobní roztoky:

- Tris-HCl pufr 0,1M pH 7,4
- kofaktor  $MgCl_2$  0,1M
- substrát 0,5mM v DMSO
- NADPH 50mM v Tris pufru
- standardní přídavek resorufinu 0,47 $\mu$ M
- mikrosomy

Před měřením byly nastaveny tyto parametry přístroje:

Vlnová délka excitační:	530nm
Vlnová délka emisní:	585nm
Doba inkubace:	180s
Excitační štěrba:	10nm
Emisní štěrba:	20nm
Teplota:	37°C

Postup při měření byl následující:

Kyveta se nechala temperovat na 37°C, rovněž pufr byl udržován v lázni při 37°C. Naopak připravené roztoky NADPH, substrátů a mikrosomy byly umístěny do ledové tříště. Roztoky substrátů byly ještě chráněny před světlem.

Do kyvety byl napipetován pufr, kofaktor, mikrosomální frakce a specifický substrát v objemech uvedených v následující tabulce. Byl spuštěn záznam spektrofluorimetru. Asi po 50s temperování směsi byla enzymatická reakce v kyvetě zahájena přidáním NADPH. Po 150s bylo do kyvety připipetováno 10  $\mu$ l standardního přídatku resorufinu. Před měřením dalšího vzorku byl obsah kyvety odsát a kyveta byla propláchnuta třikrát destilovanou vodou. Pro každý vzorek mikrosomů byla provedena dvě paralelní měření.

Tab.3 Složení reakční směsi

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu$ l]
Tris-HCl pufr	885
Kofaktor $MgCl_2$	50
Mikrosomální frakce	50
Substrát	5
NADPH	10

Po změření vzorků byla odečtena směrnice přímky nárstu intenzity fluorescence (od startu do přidání standardního přídatku) a intenzita začátku a konce přídatku.

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

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

**a**.....aktivita enzymu

**k**.....směrnice přímky od startu reakce do přidavku resorufinu

**B-A**.....přírutek fluorescence od začátku do konce přidavku resorufinu

**n**.....látkové množství standartního přidavku ve vzorku (4,7 pmol v kyvetě)

**D**.....zředění mikrosomů ve vzorku

**60**.....přepočet na minuty

Takto vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [pmol/min/mg] vztahena na mg bílkoviny.

#### 4.2.6. Stanovení aktivity TBSO (thiobenzamid-S-oxidasa)

Touto metodou se stanovuje enzymová aktivita, která je u laboratorních zvířat a člověka relativně specifická pro FMO. Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-oxidu thiobenzamidu (TBSO) za použití thiobenzamidu jako substrátu a koenzymu NADPH.

Použité zásobní roztoky:

- draselno-fosfátový pufr 0,1M pH 8,0
- substrát: thiobenzamid (TB) 89 mM v acetonitrilu
- NADPH 1 mM
- mikrosomy – zředěné pufrům tak, aby obsah bílkoviny v reakční směsi byl 0,75 mg/ml
- acetonitril

Postup při měření byl následující:

Do kyvety spektrofotometru byly napipetovány mikrosomy. Jejich množství bylo předem spočítáno tak, aby koncentrace bílkoviny byla přibližně 75 mg/ml. Mikrosomy byly zředěny pufrům do objemu 1 ml. Byl připipetováno 25  $\mu$ l NADPH a 12,5  $\mu$ l pufru. Směs se chvíli nechala temperovat při 35°C. Následně bylo přidáno 12,5  $\mu$ l substrátu (TB) nebo 12,5  $\mu$ l acetonitrilu u slepých vzorků. Směs byla protřepána a ihned se měřila absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios  $\beta$  při 370 nm a 35°C. Hodnoty absorbance byly odečítány po 1 min po dobu 7 min.

Tab.4 Složení reakční směsi

Složka reakční směsi	Objem [μl]
Mikrosomy	55 - 205
Pufr	795 - 945
NADPH	25
Substrát	12,5

Aktivita byla měřena v jaterních mikrosomech léčených a kontrolních muflonů. Pro každý vzorek mikrosomů byly změřeny tři paralelní vzorky a slepý vzorek.

Pro výpočet aktivity byly vypočteny rozdíly absorbancí v jednotlivých minutách, určil se průměr absorbance za 1 minutu a odečetla se absorbance slepého vzorku. Z této hodnoty absorbance se aktivita vypočítala pomocí molárního absorpčního koeficientu S-oxid thiobenzamidu a vztáhla na zředění mikrosomů v reakční směsi.

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

$$a = \frac{\Delta A}{\varepsilon} * D * 10^3 \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

a.....aktivita enzymu

ΔA.....rozdíl absorbancí v jednotlivých minutách

ε.....molární absorpční koeficient S-oxid thiobenzamidu ( $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

D.....zředění v 1 ml vzorku

$10^3$ .....přepočet z μmol na nmol

Takto vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [nmol/min/mg] vztahována na mg bílkoviny.

#### 4.2.7. Stanovení aktivity 6β-TOH (6β-testosteronhydroxylasa)

Touto metodou se stanovuje enzymová aktivita, která je u člověka připisována hlavně isoformě CYP3A. Metoda stanovení je založena na inkubaci mikrosomální frakce s testosteronem a NADPH, následnou extrakcí a HPLC stanovení hydroxylovaných metabolitů testosteronu.

Použité zásobní roztoky:

- Na-fosfátový pufr 0,1M pH 7,4
- Kofaktor  $MgCl_2$  250mM
- NADPH 15mM ve fosfátovém pufru
- Standartní přídavek HFC 10 $\mu$ M v pufru
- Testosteron 100mM v DMSO
- $CH_2Cl_2$
- kortikosteron 0,9mM v MeOH jako vnitřní standard

### Inkubace

Inkubace probíhala v 1,5ml mikrozkumavkách.

Nejdříve bylo napipetováno:

- 375  $\mu$ l Na-fosfátového pufru 0,1M
- 10  $\mu$ l  $MgCl_2$
- 100  $\mu$ l mikrosomů
- 10  $\mu$ l NADPH

Tato inkubační směs byla preinkubována 5 min při 37°C za stálého míchání (Thermomixer Eppendorf). Poté byla reakce zahájena přidáním 5  $\mu$ l testosteronu (v pravidelných intervalech do jednotlivých mikrozkumavek). Mikrozkumavky byly ihned protřepány a následovala inkubace 15 min při 37°C. Po těchto 15 min byla reakce zastavena přidáním 0,7ml chlazeného  $CH_2Cl_2$  (opět v pravidelných intervalech aby byla dodržena předepsaná doba inkubace) a protřepáním.

### Extrakce

Po zastavení reakce bylo ke vzorkům přidáno 10  $\mu$ l kortikosteronu jako vnitřní standard. Po intenzivním třepání na třepáče (stupeň 5, po dobu 3 min.) a centrifugaci (5000ot./min, po dobu 10 min) byla odebrána organická (spodní) vrstva a přenesena do vialky. K vodné fázi bylo opět přidáno 0,5 ml  $CH_2Cl_2$  a třepání a centrifugace zopakována. Opět byla organická fáze odebrána a přidána do vialky k prvnímu odběru. Organická fáze ve vialce byla odpařena na koncentrátoru při 60 °C (asi 20 min). Vialky se vzorky byly uzavřeny a v chladu a temnu uschovány pro pozdější HPLC analýzu.

### HPLC podmínky

Přístroj:	Hewlet Packard 1100
Kolona:	ODS Hypersil 125x4
Detektor:	SPD-10A VP Shimadzu absorbance detector
Detekce při:	254 nm
Nástřík:	20 $\mu$ l



Čas: 40 min  
 Teplota: 25 °C  
 Tlak: 27 MPa při 30:70 v/v  
 Rozsah: 1250 mV  
 Průtok mobilní fáze: 1 ml/min  
 Mobilní fáze: A: 75 ml THF  
                   600 ml MeOH  
                   325 ml H<sub>2</sub>O  
                   B: 75 ml THF  
                   925 ml H<sub>2</sub>O  
 Gradient mobilní fáze: 30% A + 70% B, lineární změna poměru na 100:0  
 Probublávat heliem.  
 Jednotky: [nmol]

Pro toto stanovení byly použity směsné jaterní a střevní vzorky. Každý vzorek pak pětkrát paralelně proměřen.

Výpočet aktivity byl proveden na základě získaných hodnot množství metabolitu 6β-hydroxytestosteronu ve vzorku, byla zohledněna doba inkubace a zředění mikrosomů.

Tedy podle vzorce:

$$a = \frac{x}{15} * D \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

a.....aktivita

x.....množství 6β-hydroxytestosteronu

15.....doba inkubace (min)

D.....zředění

Takto vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [nmol/min/mg] vztažena na mg bílkoviny.

#### 4.2.8. Spektrofluorimetrické stanovení aktivity MFCD (methoxyfluorkumarindemethylasa)

MFCD aktivita v lidských vzorcích koresponduje s aktivitou CYP2C9. Je založena na inkubaci substrátu MFC (7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin)s mikrosomální frakcí a NADPH koenzymem. MFCD transformuje MFC na fluoreskující produkt HFC (7-hydroxy-4-trifluoromethylkumarin). Přírůstek fluorescence se měří na spektrofluorimetru, jeho velikost je přímo úměrná aktivitě enzymu. Vyhodnocení se provádí metodou standardního přídávku.

Použité zásobní roztoky:

- Na-fosfátový pufr 0,1M pH 7,4
- Kofaktor MgCl<sub>2</sub> 0,1M vodný roztok
- Substrát MFC 2mM v DMSO
- NADPH 25mM ve fosfátovém pufru
- Standardní přídavek HFC 10μM v pufru
- Mikrosomální frakce

Před měřením byly nastaveny tyto parametry přístroje:

Vlnová délka excitační:	410nm
Vlnová délka emisní:	510nm
Doba inkubace:	180s
Excitační šterbina:	4nm
Emisní šterbina:	4nm
Teplota:	37°C

Postup při měření byl následující:

Kyveta se nechala temperovat na 37°C, rovněž pufr byl udržován v lázni při 37°C. Naopak připravené roztoky NADPH, MFC, HFC a mikrosomy byly umístěny do ledové tříště. HFC byl ještě chráněn před světlem.

Do kyvety byl napipetován pufr, kofaktor, mikrosomální frakce a specifický substrát v objemech uvedených v následující tabulce. Byl spuštěn záznam fluorimetru. Asi po 30s ustalování směsi byla enzymatická reakce v kyvetě spuštěna přidáním NADPH. Po 120s bylo do kyvety připipetováno 10 μl standardního přídávku HFC (1.standardní přídavek) a po dalších 30s dalších 10 μl HFC (2.standardní přídavek). Před měřením dalšího vzorku byl obsah kyvety odsát a kyveta třikrát propláchnuta destilovanou vodou. Pro každý vzorek mikrosomů byla provedena tři paralelní měření.

Tab.5 Složení reakční směsi před přidavkem HFC

Složka reakční směsi	Objem [μl]
Pufr	910
Kofaktor MgCl <sub>2</sub>	50
Mikrosomální frakce	20
Substrát MFC	10
NADPH	10

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

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

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

**a**.....aktivita enzymu

**k**.....směrnice přímky od startu reakce do prvního přidavku substrátu (počítán průměr ze tří odečtených hodnot při třech paralelních měření jednoho vzorku)

**B-A**.....přírůstek fluorescence od začátku do konce přidavku HFC (počítán průměr ze šesti měření – 3měření po 2 přidavcích)

**n**.....látkové množství HFC ve vzorku

**D**.....zředění mikrosomů ve vzorku

**60**.....přepočet na minuty

Takto vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [pmol/min/mg] vztažena na mg bílkoviny.

#### 4.2.9. Stanovení aktivity UGT (UDP-glukuronosyltransferasa)

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení přeměny p-nitrofenolu na nitrofenolglukuronid za enzymové katalýzy UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).

Použité zásobní roztoky:

- Substrát: 0,556mM p-nitrofenol
- Konjugační činidlo: UDP-glukuronová kyselina 0,9mM
- Tris/HCl pufr pH 7,4
- Detergent: neionogenní detergent pro aktivaci UGT (Slovasol)
- Stop roztok: kyselina trichloroctová 3% (w/v)
- Neutralizační roztok: NaOH 1M
- Vzorek: mikrosomální frakce

Postup při stanovení byl následující:

Ze známých hodnot koncentrace proteinu se vypočítalo množství detergentu (1:2), které se přidalo ke 100  $\mu\text{l}$  mikrosomů. Tato směs se nechala 20 min inkubovat při 4°C.

Do připravených mikrozkušavek v ledové lázni se napipetovala reakční směs podle následující tabulky. Celkem byly připraveny čtyři paralelky vzorku a dvě paralelky slepého vzorku (místo UDP-GA se použilo 30  $\mu\text{l}$  redestilované vody). Mikrosomy s detergentem startují reakci.

Tab.6 Složení reakční směsi

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu$ l]
Tris-HCl pufr	30
p-nitrofenol	30
UDP-GA	30
Mikrosomy s detergentem	10

Mikrozkumavky s takto připravenou reakční směsí byly uzavřeny, promíchány a vloženy do lázně, kde probíhala inkubace při 37°C 20 min.

Reakce byla ukončena přemístěním mikrozkumavek do ledové lázně a přidáním 50  $\mu$ l trichloroctové kyseliny jako stop roztoku. Následně byl deproteinizovaný roztok centrifugován 3 min při 5000ot./min. 50  $\mu$ l supernatantu bylo přidáno k 50  $\mu$ l NaOH již připraveného v jamkách mikrotitračních destiček. Po zabarvení se na čtečce BioRad změřila absorbance nezreagovaného p-nitrofenolu při 415 nm. Hodnota absorbance vzorků se odečítala od hodnoty absorbance slepých vzorků.

Výpočet aktivity enzymu byl proveden na základě molárního úbytku p-nitrofenolu, vztažen na zředění vzorku a dobu inkubace. Vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [nmol/min/mg] vztažena na mg bílkoviny.

#### 4.2.10. Stanovení aktivity GST (glutathion-S-transferasa)

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu při použití 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu a glutathionu, katalyzátorem je právě glutathion-S-transferasa.

Použité zásobní roztoky:

- substrát: 0,1M 1- chloro-2,4-dinitrobenzenu v 95% ethanolu (CDNB)
- konjugační činidlo: 0,1M redukovaný glutathion (GSH)
- 0,1M Na-fosfátový pufr
- cytosolická frakce

Postup při měření byl následující:

Do UV-VIS transparentní kyvety byla napipetována reakční směs v množství dle následující tabulky.

Tab.7 Složení reakční směsi

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
pufr	960
GSH	10
cytosol	20
CDNB	10

Nejdříve se napipetoval pufr, poté GSH a cytosol. Směs se protřepala. Po napipetování roztoku CDNB, který je aktivátorem reakce, se ihned začalo měřit. Absorbance se měřila na UV-VIS spektrofotometru Helios  $\beta$  při 340nm a odečítala se po 30s, 60s, 90s.

Bylo třeba vyzkoušet ředění cytosolu, aby nebyla absorbance větší než 1, protože potom už není závislost Lambert-Beerova zákona lineární.

Pro každý vzorek cytosolu byly změřeny tři paralelní vzorky. Rovněž byly proměřeny slepé vzorky (bez cytosolu).

Výpočet aktivity enzymu byl proveden pomocí molárního extinkčního koeficientu S-2,4-dinitrofenylglutathionu  $\epsilon=9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a vztažen na zředění vzorku.

$$a = \frac{\Delta A}{\epsilon} * D \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

a..... aktivita

$\Delta A$ ..... rozdíl absorbance v 90s a 60s, od které se odečte rozdíl absorbancí slepého vzorku v týchž časech

$\epsilon$ ..... molární extinkční koeficient

D..... zředění cytosolu v reakční směsi (50)

Vypočtená hodnota aktivity byla pro získání specifické aktivity [nmol/min/mg] vztažena na mg bílkoviny.

#### 4.2.11. In vitro inkubace mikrosomů s ABZ s následnou HPLC analýzou vzniklých metabolitů

##### Inkubace

Směsné vzorky jaterních a střevních mikrosomů byly inkubovány s albendazolem. Zjišťovala se tak in vitro aktivita biotransformačních enzymů z množství jednotlivých metabolitů ABZSO a ABZSO<sub>2</sub>.

Složení reakční směsi:

- 50  $\mu$ l NADPH 0,1 mM v Na-fosfátovém pufru
- 50  $\mu$ l mikrosomů
- 50  $\mu$ l substrátu 100  $\mu$ M ABZ v DMSO a Na-fosfátovém pufru

Směsné vzorky mikrosomů léčených a kontrolních muflonů byly inkubovány s ABZ po třech paralelních vzorcích.

Postup při přípravě k inkubaci a inkubace byl následující:

Do mikrozkuvek byl napipetován příslušný objem zásobního roztoku substrátu a pufru, NADPH. Mikrozkuvky byly přendány na vyhřátou třepačku a reakce byla zahájena přidáním mikrosomů. Inkubace probíhala 30 min při 37°C za aerobních podmínek. Reakce byla ukončena přendáním mikrozkuvek s reakční směsí do ledové lázně a přidáním 180  $\mu$ l acetonitrilu. Následně probíhalo 3 min. třepání a centrifugace 10 min při 10 000g. 300  $\mu$ l supernatantu bylo přepipetováno a zmrazeno pro následnou HPLC analýzu vzniklých metabolitů.

Zároveň byly připraveny slepé vzorky ke zjištění množství ABZ, ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> vázaných v mikrosomech. Extrakce těchto metabolitů byla provedena vytřepáním mikrosomů s acetonitrem v poměru 1:1.

### HPLC analýza

HPLC podmínky pro achirální metodu měření metabolitů

Přístroj:	Hewlet Packard 1100
Kolona:	Discovery C18
Detektor:	SPD-10A VP Shimadzu absorbance detector
Detekce $\lambda_{EX}$ :	290 nm
$\lambda_{EM}$ :	320 nm
Nástřik:	50 $\mu$ l
Čas:	25 min
Teplota:	25 °C
Tlak:	18,2 MPa
Rozsah:	1250 mV
Průtok mobilní fáze:	1 ml/min
Mobilní fáze:	Amonium acetat 0,1M pH 4,7 : Acetonitril (71:29)

Jednotlivé metabolity byly identifikovány na základě retenčních časů referenčních látek (standarty byly získány darem od prof. Lanusse z Argentiny). Retenční čas ABZSO je asi 2,9 min, ABZSO<sub>2</sub> asi 4,3 min a ABZ asi 22,1 min.

Vzorky ABZSO byly po změření achirální metodou odebírány do vialek a odpařeny na koncentrátoru. Po rozpuštění v 300  $\mu$ l mobilní fáze pro chirální metodu se na chirální koloně měřilo množství jednotlivých enantiomerů.

HPLC podmínky pro chirální metodu měření množství enantiomerů ABZSO

Přístroj:	Hewlet Packard 1100
Kolona:	AGP 150x3 mm
Detektor:	SPD-10A VP Shimadzu absorbance detector
Detekce $\lambda_{EX}$ :	290 nm
$\lambda_{EM}$ :	320 nm
Nástřik:	50 $\mu$ l
Čas:	30 min
Teplota:	25 °C
Tlak:	9,1 MPa
Rozsah:	1250 mV
Průtok mobilní fáze:	0,5 ml/min
Mobilní fáze:	Na-fosfátový pufr 0,01M pH 6,9 : 2-propanol (500:1)

Retenční čas (-)-ABZSO je asi 5,5 min, (+)-ABZSO asi 13,9 min.

Množství jednotlivých metabolitů bylo vypočteno na základě již dříve sestrojených kalibračních křivek.

#### 4.2.12. Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky stanovených enzymových aktivit skupiny léčených a kontrolních zvířat byly statisticky hodnoceny Studentovým nepárovým t – testem s hladinou spolehlivosti 0,95.

### 4.3. VÝSLEDKY

#### 4.3.1. Koncentrace bílkoviny

Koncentrace bílkoviny byla stanovována v mikrosomální a cytosolické frakci jater a střev léčených a kontrolních muflonů metodou BCA popsanou v kapitole 4.2.3.

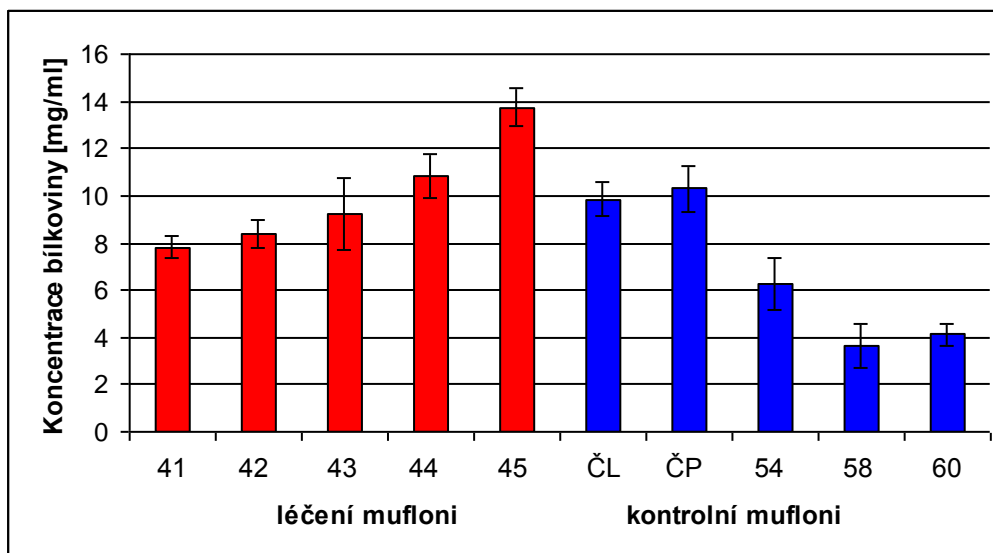
#### Mikrosomy

Naměřené koncentrace proteinů v 1 ml mikrosomální suspenze jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázku 9 a 10. Obrázek 9 graficky znázorňuje koncentraci bílkoviny v jaterní mikrosomální frakci jednotlivých zvířat, obrázek 10 znázorňuje totéž v mikrosomech střev. Je zde možné porovnat koncentraci proteinů u léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře).

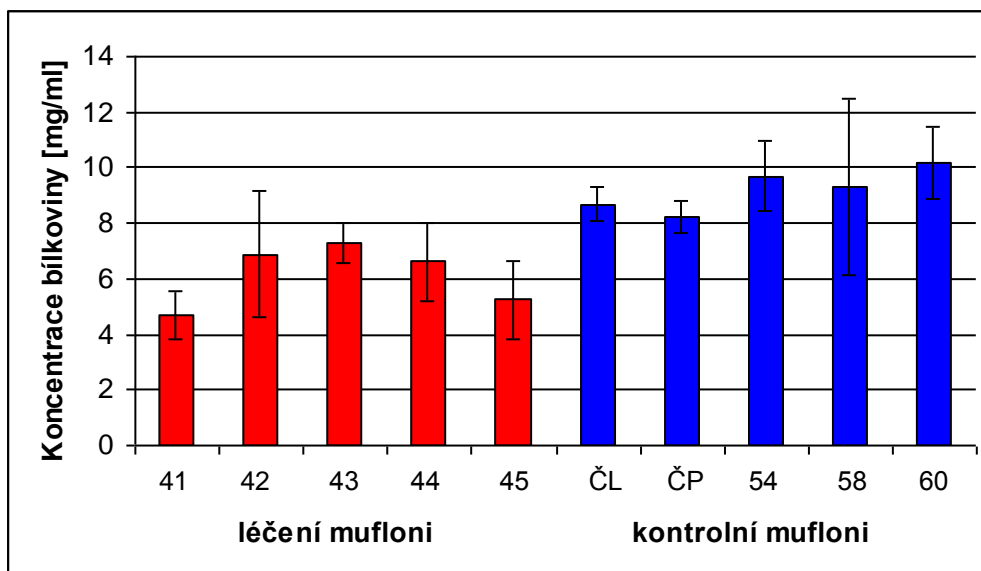
Tab.8 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v mikrosomální frakci jater a střev léčených a kontrolních muflonů.

Mikrosomální frakce		Konc.bílkoviny [mg/ml]	
		játra	střevo
Léčení mufloni	41	7,8 ± 0,5	4,7 ± 0,9
	42	8,4 ± 0,6	6,9 ± 2,3
	43	9,2 ± 1,5	7,3 ± 0,7
	44	10,8 ± 0,9	6,6 ± 1,4
	45	13,8 ± 0,8	5,3 ± 1,4
	Průměr	10,0 ± 0,4	6,2 ± 0,5
Kontrolní mufloni	ČL	9,9 ± 0,7	8,7 ± 0,6
	ČP	10,3 ± 1,0	8,2 ± 0,6
	54	6,3 ± 1,1	9,7 ± 1,3
	58	3,6 ± 0,9	9,3 ± 3,2
	60	4,1 ± 0,4	10,2 ± 1,3
	Průměr	6,8 ± 0,2	9,2 ± 0,9





Obr.9 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v **jaterní** mikrosomální frakci léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)



Obr.10 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] ve **střevní** mikrosomální frakci léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

V tabulce 8 jsou vidět koncentrace proteinů v mikrosomální suspenzi jater a střev jednotlivých zvířat, zároveň zde jsou vypočteny koncentrace průměrné.

Průměrná koncentrace proteinů v mikrosomech jater léčených zvířat je 10,0 mg/ml, u kontrolní skupiny je tato koncentrace 6,8 mg/ml. Statisticky zde nebyl prokázán významný rozdíl množství proteinů mezi skupinou léčenou a kontrolní.

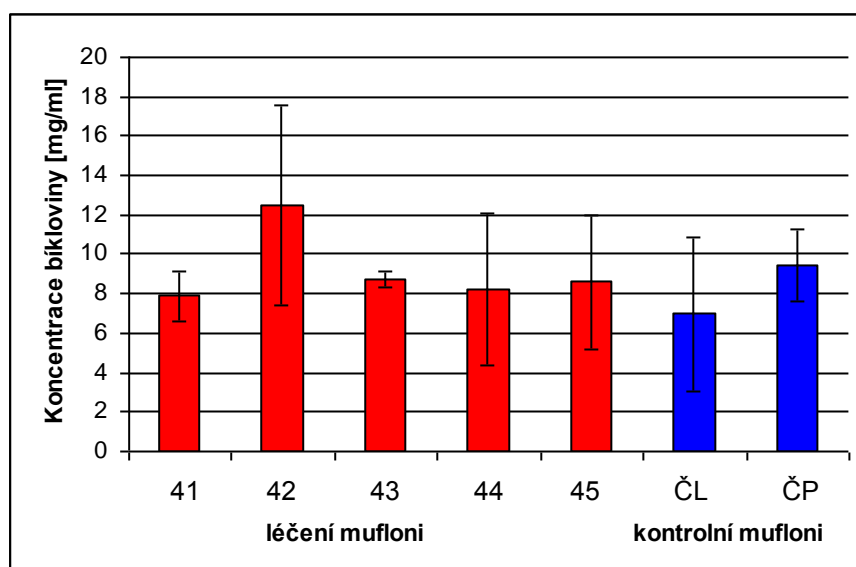
Průměrná koncentrace proteinů v mikrosomech střev léčených zvířat je 6,2 mg/ml, u kontrolní skupiny je tato koncentrace 9,2 mg/ml. V tomto případě byl Studentovým t – testem prokázán rozdíl mezi oběma skupinami. Kontrolní skupina zvířat má ve střevních mikrosomech větší množství proteinů než skupina léčených zvířat.

## Cytosol

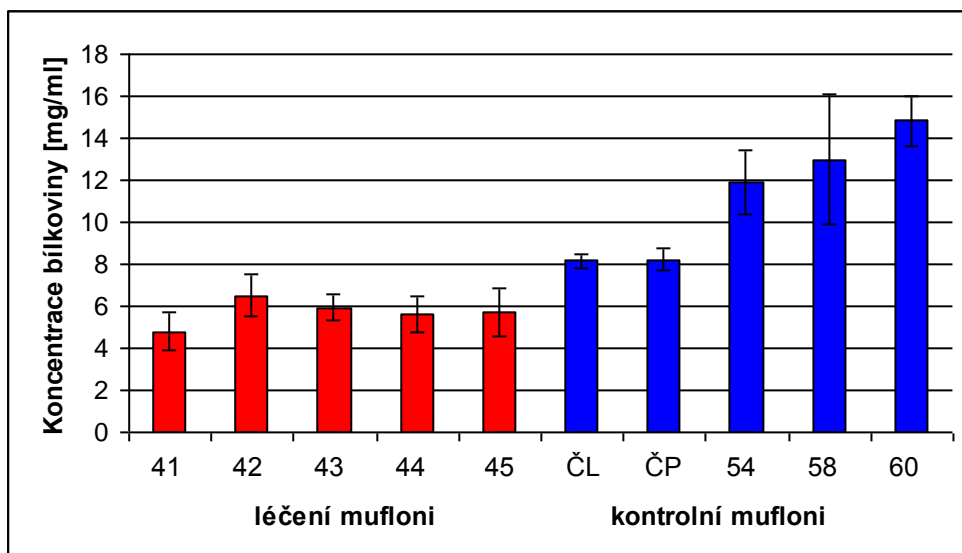
Naměřené koncentrace proteinů v 1 ml cytosolické frakce jsou uvedeny v tabulce 9 a na obrázku 11 a 12. Obrázek 11 graficky znázorňuje koncentraci bílkoviny v jaterní cytosolické frakci jednotlivých zvířat, obrázek 12 znázorňuje totéž v cytosolu střev. Je zde možné porovnat koncentraci proteinů u léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře).

Tab.9 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v cytosolické frakci jater a střev léčených a kontrolních muflonů.

Cytosolická frakce		Konc.bílkoviny [mg/ml]	
		játra	střeva
Léčení mufloni	41	7,9 ± 1,2	4,8 ± 0,9
	42	12,5 ± 5,1	6,5 ± 1,0
	43	8,7 ± 0,4	6,0 ± 0,6
	44	8,2 ± 3,9	5,6 ± 0,9
	45	8,6 ± 3,4	5,8 ± 1,2
	Průměr	9,2 ± 1,7	5,7 ± 0,6
Kontrolní mufloni	ČL	7,0 ± 3,9	8,2 ± 0,3
	ČP	9,4 ± 1,8	8,2 ± 0,5
	54		11,9 ± 1,5
	58		13,0 ± 3,1
	60		14,8 ± 1,2
	Průměr	8,2 ± 1,2	11,2 ± 2,6



Obr.11 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] v **jaterní** cytosolické frakci léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)



Obr.12 Koncentrace bílkoviny [mg/ml] ve **střevní** cytosolické frakci léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

V tabulce 9 jsou vidět koncentrace proteinů v cytosolu jater a střev jednotlivých zvířat, zároveň zde jsou vypočteny koncentrace průměrné.

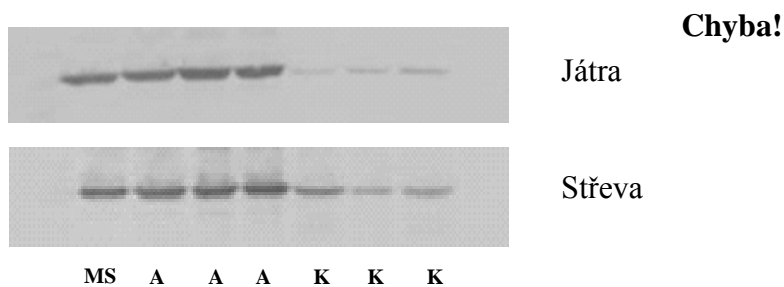
Průměrná koncentrace proteinů v cytosolu jater léčených zvířat je 9,2 mg/ml. Při statistickém hodnocení program vyloučil z průměru odlehlou hodnotu koncentrace bílkoviny u zvířete 42 (12,5 mg/ml), takže průměrná koncentrace proteinů ve skutečnosti je 8,4 mg/ml. Kontrolní skupina má průměrnou koncentraci proteinů v cytosolu jater 8,2 mg/ml. Statisticky zde nebyl prokázán významný rozdíl množství proteinů mezi skupinou léčenou a kontrolní.

Průměrná koncentrace proteinů v cytosolu střev léčených zvířat je 5,7 mg/ml, u kontrolní skupiny je tato koncentrace 11,2 mg/ml. V tomto případě byl studentovým t – testem prokázán rozdíl mezi oběma skupinami. Kontrolní skupina zvířat má ve střevním cytosolu větší množství proteinů než skupina léčených zvířat.

#### 4.3.2. Western blotting (kvantifikace indukce CYP1A1/2)

Elektroforézou bílkovin na gelu, imunoblottingem na membránu a inkubací s protilátkami, následnou densitometrickou kvantifikací se zjišťovalo množství CYP1A1 a CYP1A2 v mikrosomech jater i střev ze zvířat léčených albendazolem a ze zvířat kontrolních. Procentuální nárůst density odpovídá nárůstu proteinů CYP1A1/2. Postup viz. kapitola 4.2.4.

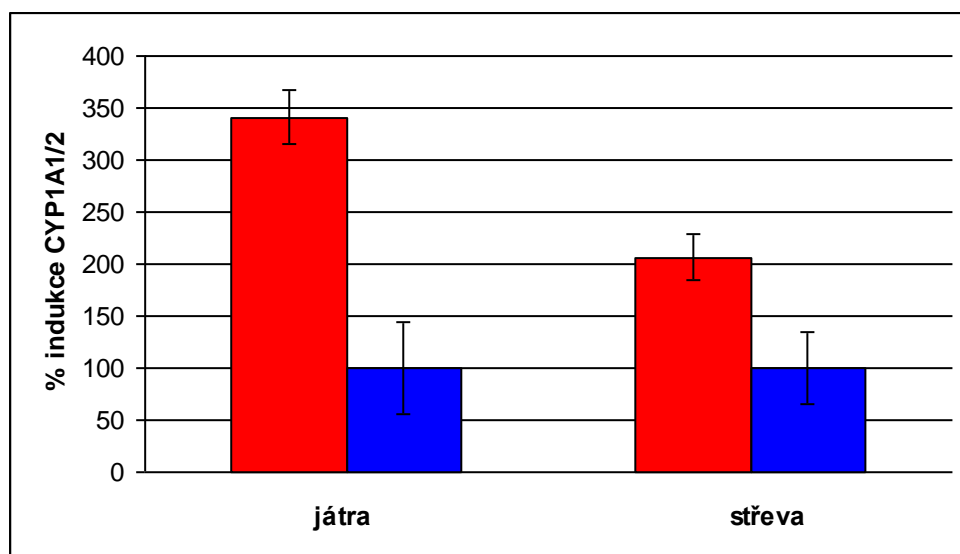
Obrázek 13 ukazuje membránu, kde je názorně vidět výrazné zvýšení množství proteinu CYP1A1/2 léčených zvířat oproti kontrolním. Tabulka 10 uvádí kvantifikaci této indukce. Kvantifikace proběhla densitometricky a pro porovnání byla za 100 % považována densita kontrolní skupiny. Na obrázku 14 je porovnání množství proteinu CYP1A1/2 v kontrolní a léčené skupině zvířat znázorněno graficky.



Obr.13 Membrána po imunodetekci proteinů CYP1A1/2 protilátkou. **A** značí vzorky muflonů léčených ABZ, **K** kontrolní muflony, **MS** je molekulární standard (linie 50kD)

Tab.10 Procentuální nárůst density CYP1A1/2 u léčených muflonů oproti kontrolním

	% density	
	Játra	Střeva
<b>Léčení mufloni</b>	341 ± 26	206 ± 22
<b>Kontrolní mufloni</b>	100 ± 45	100 ± 34



Obr.14 Procentuální nárůst density léčených muflonů (červeně) oproti kontrolním (modře) a tomu odpovídající indukce CYP1A1/2 léčených muflonů oproti kontrolním.

Jak je z tabulky 10 a obrázku 14 vidět, imunoblottingem bylo zjištěno, že podání albendazolu zvířeti výrazně zvyšuje množství proteinů odpovídající CYP1A1 a 1A2 a to v játrech přibližně 3,5x a ve střevě přibližně 2x.

### 4.3.3. Aktivita EROD, MROD, PROD, BROD

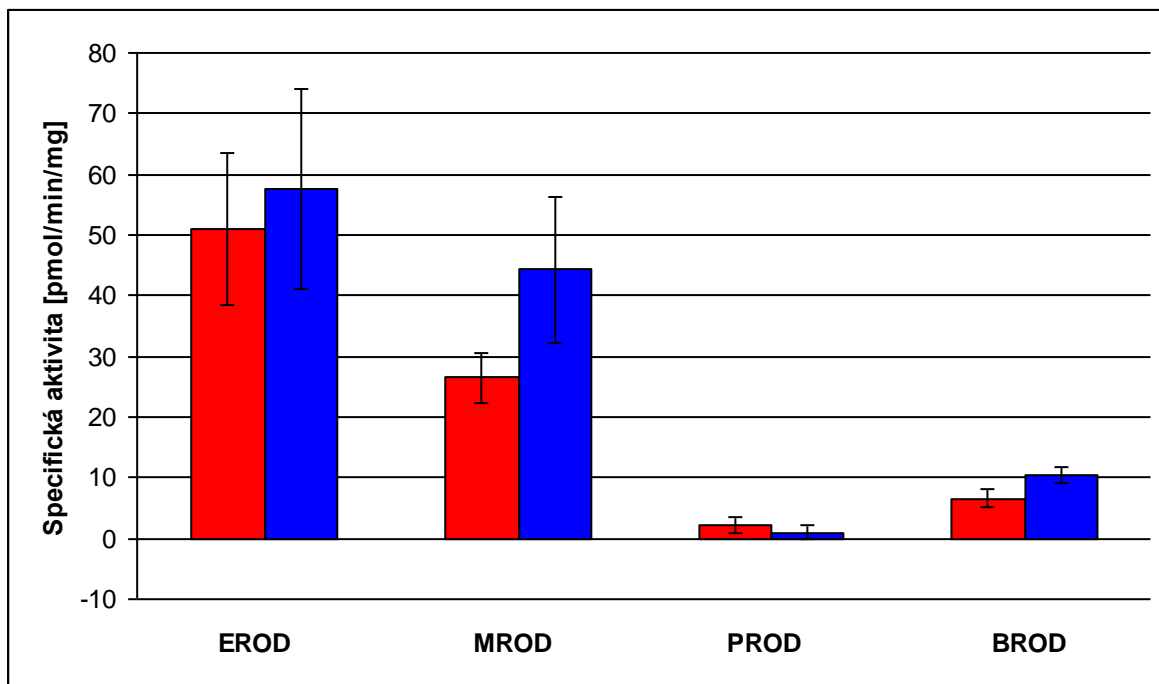
Spektrofluorimetrickým stanovením se standardním přidavkem resorufinu (viz. kapitola 4.2.5.) se získala aktivita ethoxyresorufindeethylasy (EROD), která má katalytickou aktivitu CYP1A1 a částečně CYP1A2; methoxyresorufindemethylasy (MROD) s katalytickou aktivitou CYP1A2 a částečně CYP1A1; pentoxyresorufindepentylasy (PROD) s aktivitou CYP2B; benzyloxydearylasy (BROD) s aktivitou CYP3A a 2B.

#### Játra

Stanovené aktivity EROD, MROD, PROD, BROD v jaterních mikrosomech jednotlivých léčených a kontrolních muflonů jsou uvedeny v tabulce 11. Jsou zde uvedeny i vypočtené průměrné aktivity, jejichž porovnání mezi skupinou léčenou a kontrolní je názorně vidět v grafu na obrázku 15.

Tab.11 Specifická aktivita EROD, MROD, PROD, BROD v mikrosomech jater léčených a kontrolních muflonů

Mikrosomální frakce jater		Specifická aktivita [pmol/min/mg]			
		EROD	MROD	PROD	BROD
Léčení mufloni	<b>41</b>	72,1	33,7	0,9	5,9
	<b>42</b>	47,2	24,1	0,8	4,3
	<b>43</b>	56,2	28,7	3,3	7,9
	<b>44</b>	43,3	23,6	2,1	6,2
	<b>45</b>	36,1	22,7	3,9	8,6
	<b>Průměr</b>	51,0 ± 12,4	26,6 ± 4,1	2,2 ± 1,3	6,6 ± 1,5
Kontrolní mufloni	<b>ČL</b>	51,7	50,2	0,3	8,7
	<b>ČP</b>	30,8	23	0,3	9,2
	<b>54</b>	77,8	57,7	3,4	12,5
	<b>58</b>	71,5	40,1	0	11,4
	<b>60</b>	55,9	50,4	1,1	10,1
	<b>Průměr</b>	57,5 ± 16,5	44,3 ± 12,0	1,0 ± 1,2	10,4 ± 1,4



Obr.15 Porovnání průměrných specifických aktivit EROD, MROD, PROD, BROD v mikrosomech jater léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

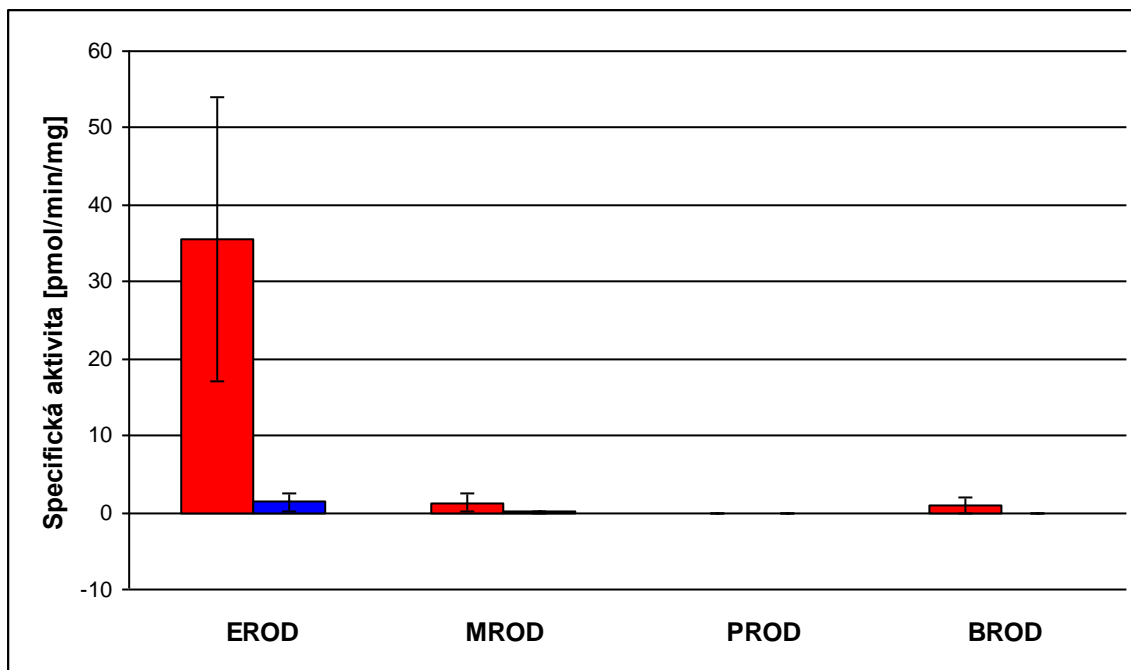
Jak je z tabulky 11 a grafu na obrázku 15 patrné, v jaterních mikrosomech byla naměřena významná aktivita EROD, MROD a BROD. Aktivita PROD byla velmi nízká. Ve všech případech významných aktivit byla aktivita léčených zvířat nižší než aktivita zvířat kontrolních. Statisticky významná inhibice byla prokázána v případě aktivity MROD.

### Střeva

Stanovené aktivity EROD, MROD, PROD, BROD ve střevních mikrosomech jednotlivých léčených a kontrolních muflonů jsou uvedeny v tabulce 12. Jsou zde uvedeny i vypočtené průměrné aktivity, jejichž porovnání mezi skupinou léčenou a kontrolní je názorně vidět v grafu na obrázku 16.

Tab.12 Specifická aktivita EROD, MROD, PROD, BROD v mikrosomech střev léčených a kontrolních muflonů

Mikrosomální frakce střev		Specifická aktivita [pmol/min/mg]			
		EROD	MROD	PROD	BROD
Léčení mufloni	41	55,8	1	0	1,9
	42	23,6	0,7	0	0,6
	43	27,4	1,2	0	0
	44	58,7	3,6	0	2,6
	45	12,1	0	0	0
	Průměr	35,5 ± 18,5	1,3 ± 1,2	0	1,0 ± 1,0
Kontrolní mufloni	ČL	2,4	0	0	0
	ČP	0	0	0	0
	54	0,4	0	0	0
	58	3,1	0,4	0	0
	60	1,1	0	0	0
	Průměr	1,4 ± 1,2	0,1 ± 0,2	0	0



Obr.16 Porovnání průměrných specifických aktivit EROD, MROD, PROD, BROD v mikrosomech střev léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

Ve vzorcích střevních mikrosomů byla zaznamenána výrazná aktivita pouze v případě skupiny léčených muflonů u aktivity EROD (viz obr.16 a tab.12). Tato aktivita byla oproti vzorku kontrolních muflonů 25x zvýšena. Aktivity MROD, PROD a BROD byly ve střevech zanedbatelné.

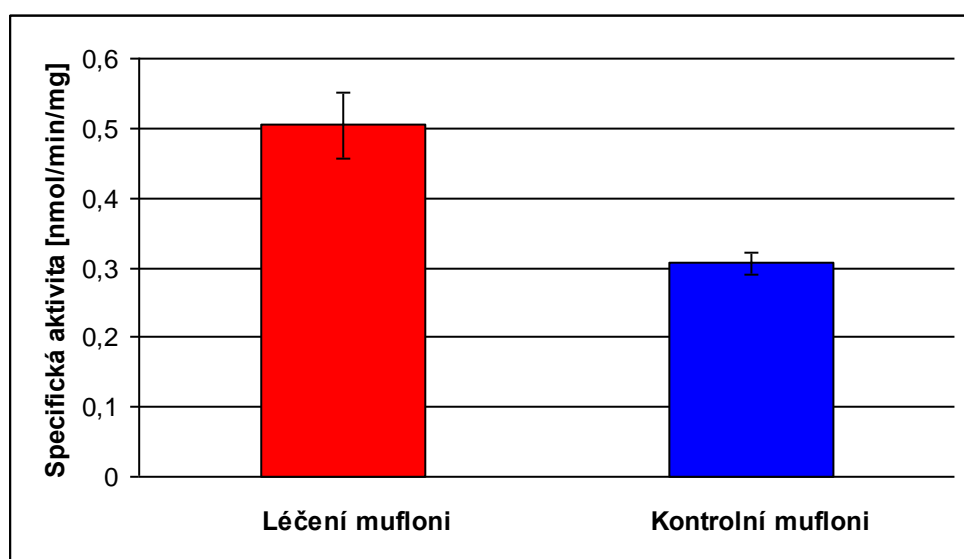
#### 4.3.4. Aktivita TBSO

Metodou stanovení aktivity thiobenzamid-S-oxidasy se zjišťovala aktivita FMO, která má u laboratorních zvířat a člověka její katalytickou aktivitu (viz. kapitola 4.2.6.).

Tato aktivita byla měřena pouze ve vzorku jaterních mikrosomů. Tabulka 13 ukazuje aktivity u jednotlivých zvířat a jejich vypočtený průměr v obou skupinách. Průměry jsou také pro porovnání vyobrazeny v grafu na obrázku 17.

Tab.13 Specifická aktivita TBSO v jaterní mikrosomální frakci léčených a kontrolních muflonů

Mikrosomální frakce jater		Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Léčení mufloni	41	0,2 ± 0,1
	42	0,9 ± 0,1
	43	0,3 ± 0,04
	44	0,2 ± 0
	45	0,9 ± 0
	Průměr	0,5 ± 0,05
Kontrolní mufloni	ČL	0,2 ± 0
	ČP	0,3 ± 0,04
	54	0,2 ± 0
	58	0,2 ± 0
	60	0,6 ± 0,04
	Průměr	0,3 ± 0,02



Obr.17 Průměrná specifická aktivita TBSO v jaterní mikrosomální frakci léčených (červeně) a kontrolních muflonů (modře)



Aktivita TBSO v jaterní tkáni je nízká. Z grafu na obrázku 17 se zdá, že je aktivita u léčených muflonů v porovnání s kontrolními vyšší, ale tato domněnka nebyla Studentovým nepárovým t-testem s hladinou spolehlivosti 0,95 prokázána.

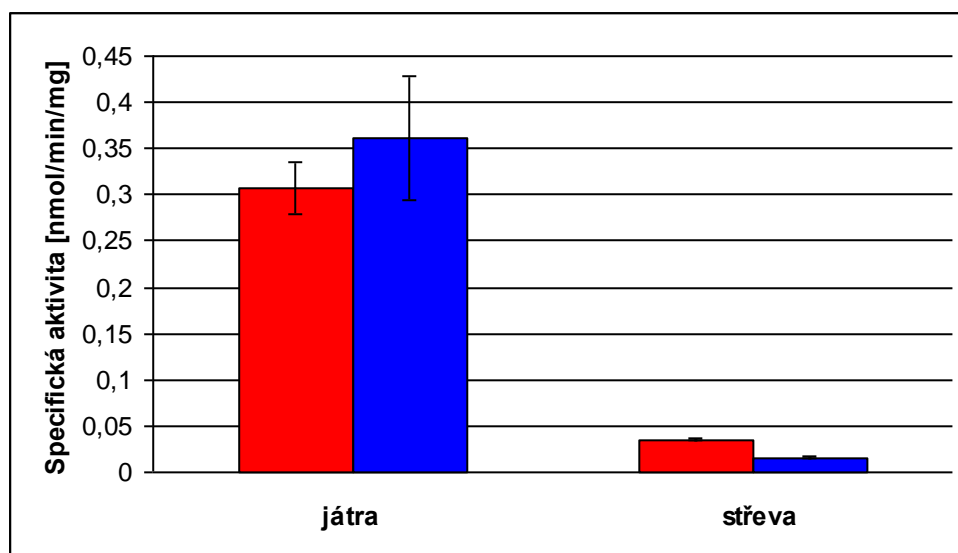
#### 4.3.5. Aktivita 6 $\beta$ -TOH

Metodou stanovení aktivity 6 $\beta$ -testosteronhydroxylázy byla zjišťována aktivita CYP3A, která má u laboratorních zvířat a člověka její katalytickou aktivitu (viz. kapitola 4.2.7.).

Aktivita získané ze směsných vzorků jsou uvedeny v tabulce 14. Obrázek 18 ukazuje tyto hodnoty v grafu.

Tab.14 Specifická aktivita 6 $\beta$ -TOH

Příslušné mikrosomy		Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Játra	léčení mufloni	0,31 $\pm$ 0,03
	kontrolní mufloni	0,36 $\pm$ 0,07
Střeva	léčení mufloni	0,04 $\pm$ 0,002
	kontrolní mufloni	0,02 $\pm$ 0,002



Obr.18 Specifická aktivita 6 $\beta$ -TOH léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře) v mikrosomální frakci jater a střev

Aktivita 6 $\beta$ -TOH se v případě jaterních mikrosomů léčených a kontrolních muflonů statisticky neliší, v případě střev byla indukce statisticky prokázána, ale aktivita je zde velmi nízká (asi 10x nižší než v jaterních mikrosomech).

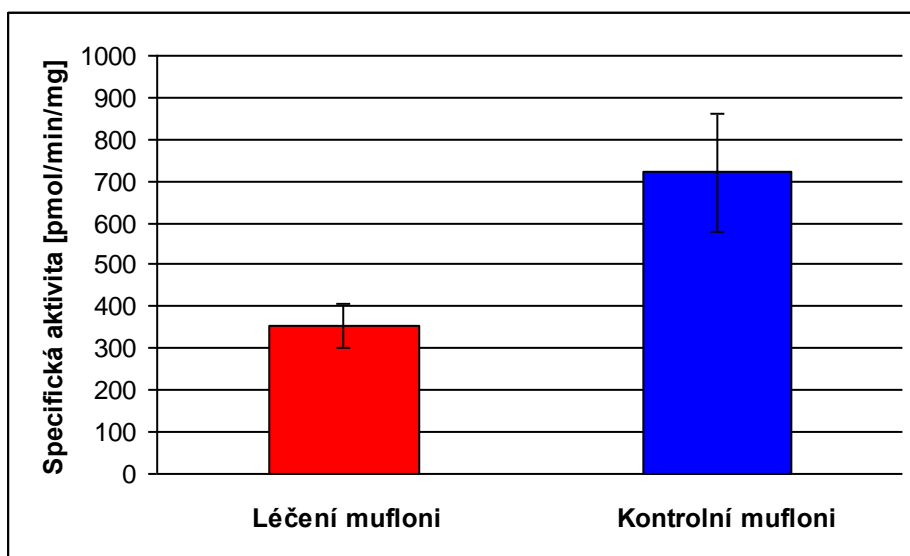
#### 4.3.6. Aktivita MFCD

Metodou stanovení aktivity methoxyfluorkumarindemethylasy se stanovovala aktivita CYP2C9, která vykazuje její katalytickou aktivitu (viz. kapitola 4.2.8.).

Aktivita byla stanovována pouze v jaterních mikrosomálních vzorcích jednotlivých zvířat, aktivity jsou uvedeny v tabulce 15. Na obrázku 19 je vidět sestrojený graf z průměrných specifických aktivit obou skupin muflonů.

Tab.15 Specifická aktivita MFCD jaterních mikrosomů léčených a kontrolních muflonů

Mikrosomální frakce jater		Specifická aktivita [pmol/min/mg]
Léčení mufloni	41	344 ± 22
	42	299 ± 4
	43	426 ± 36
	průměr	356 ± 53
Kontrolní mufloni	ČL	777 ± 24
	54	854 ± 110
	58	484 ± 48
	60	765 ± 237
	průměr	720 ± 140



Obr.19 Průměrná specifická aktivita MFCD v jaterní mikrosomální frakci léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

Stanovená aktivita MFCD je u léčených muflonů nižší než u kontrolních zvířat. Tato inhibice byla prokázána Studentovým nepárovým t-testem s hladinou spolehlivosti 0,95.

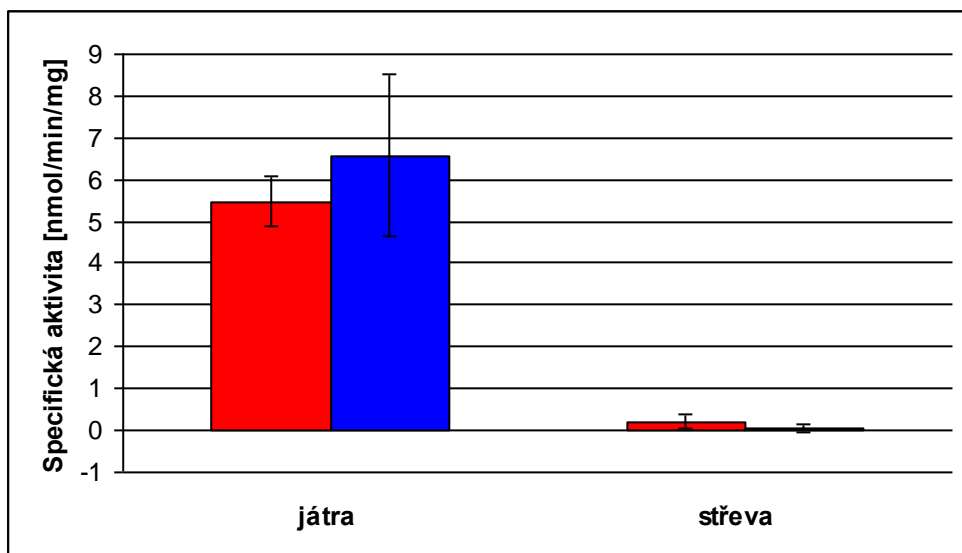
### 4.3.7. Aktivita UGT

Ke stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid (viz kapitola 4.2.9.).

Aktivita tohoto konjugačního enzymu byla stanovována v jaterní i střevní mikrosomální frakci léčených a kontrolních muflonů. Aktivity enzymu u jednotlivých zvířat uvádí tabulka 16. Graf na obrázku 20 ukazuje průměrné aktivity enzymů jater a střev s možností porovnání jednotlivých skupin zvířat i porovnání dle orgánu biotransformace.

Tab.16 Specifická aktivita UGT jaterních a střevních mikrosomů léčených a kontrolních muflonů

Mikrosomální frakce		Specifická aktivita [nmol/min/mg]	
		játra	střevo
Léčení mufloni	41	6	0,3
	42	5,6	0,4
	43	5,4	0,3
	44	5,9	0
	45	4,5	0,1
	<b>Průměr</b>	5,5 ± 0,6	0,2 ± 0,2
Kontrolní mufloni	ČL	5,1	0
	ČP	3,9	0
	54	7,7	0,3
	58	7,8	0
	60	8,4	0
	<b>Průměr</b>	6,6 ± 1,9	0,05 ± 0,1



Obr.20 Specifická aktivita UGT léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře) v mikrosomální frakci jater a střev

Tabulka 16 a graf na obrázku 20 ukazují, že glukuronidace u muflona probíhá převážně v játrech, střevní mikrosomy aktivitu tohoto enzymu nevykazují. Rozdíl v aktivitě UGT mezi skupinou léčených a kontrolních muflonů nebyl statisticky prokázán.

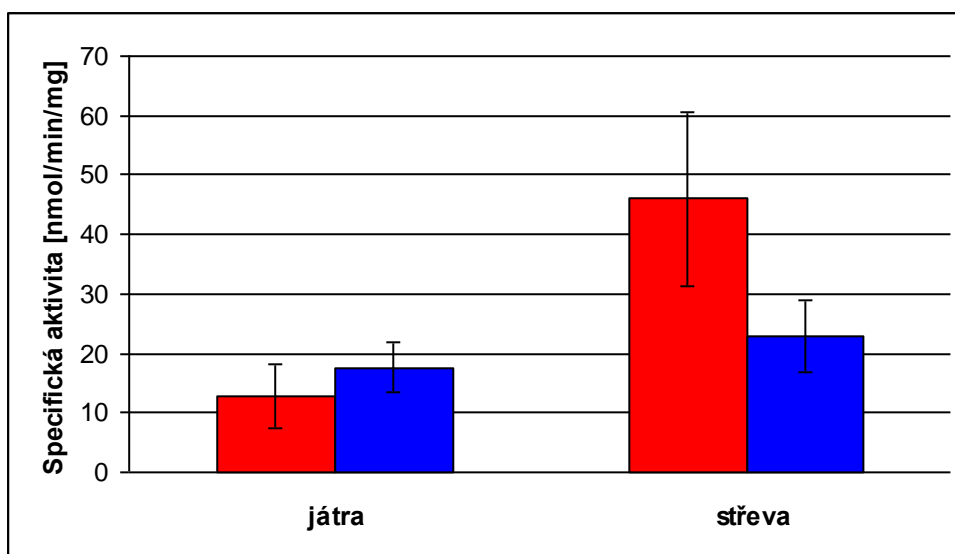
#### 4.3.8. Aktivita GST

Ke stanovení aktivity glutathion-S-transferasy byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu (viz. kapitola 4.2.10.).

Aktivita byla stanovována v cytosolické frakci jater i střev léčených a kontrolních muflonů. Hodnoty aktivit enzymu jednotlivých zvířat s vypočteným průměrem uvádí tabulka 17. Porovnání skupiny léčených a kontrolních zvířat, stejně tak jako rozdíly v místě vyšší aktivity je dobře patrné z grafu na obrázku 21.

Tab.17 Specifická aktivita GST v jaterní a střevní cytosolické frakci léčených a kontrolních muflonů

Cytosolická frakce		Specifická aktivita [nmol/min/mg]	
		játra	střevo
Léčení mufloni	41	7,0 ± 1,7	25,2 ± 6,2
	42	20,0 ± 13,6	48,7 ± 21,0
	43	18,4 ± 17,3	66,7 ± 24,9
	44	8,5 ± 6,3	35,0 ± 10,4
	45	10,1 ± 7,2	54,8 ± 12,6
	Průměr	12,8 ± 5,3	46,1 ± 14,6
Kontrolní mufloni	ČL	13,5 ± 12,7	18,1 ± 9,0
	ČP	21,8 ± 17,8	33,8 ± 25,5
	54		18,2 ± 6,4
	58		25,4 ± 11,4
	60		18,8 ± 7,1
	Průměr	17,7 ± 4,1	22,9 ± 6,1



Obr.21 Průměrná aktivita GST v jaterní a střevní cytosolické frakci léčených (červeně) a kontrolních muflonů (modře)

Z tabulky 17 a grafu na obrázku 21 je vidět, že vyšší aktivitu konjugace s glutathionem vykazují střevní vzorky. Rozdíl v aktivitě léčených a kontrolních zvířat u jater nebyl statisticky prokázán. Naopak střevo léčených muflonů vykazují 2x vyšší aktivitu tohoto konjugačního enzymu. Toto tvrzení je podloženo statistickým zhodnocením.

### 4.3.9. Výsledky HPLC analýzy inkubace mikrosomů s albendazolem

Postupy inkubace a vytřepávání mikrosomů jsou uvedeny v kapitole 4.2.11.

Kvůli zjištění množství ABZ a jeho metabolitů přítomných v mikrosomech, byly tyto vytřepány s acetonitrilem a analyzovány jako slepé vzorky (viz tabulka 18).

Tab.18 Množství ABZ, ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> vázaných v membránách mikrosomů před inkubací (ND=nedetekováno)

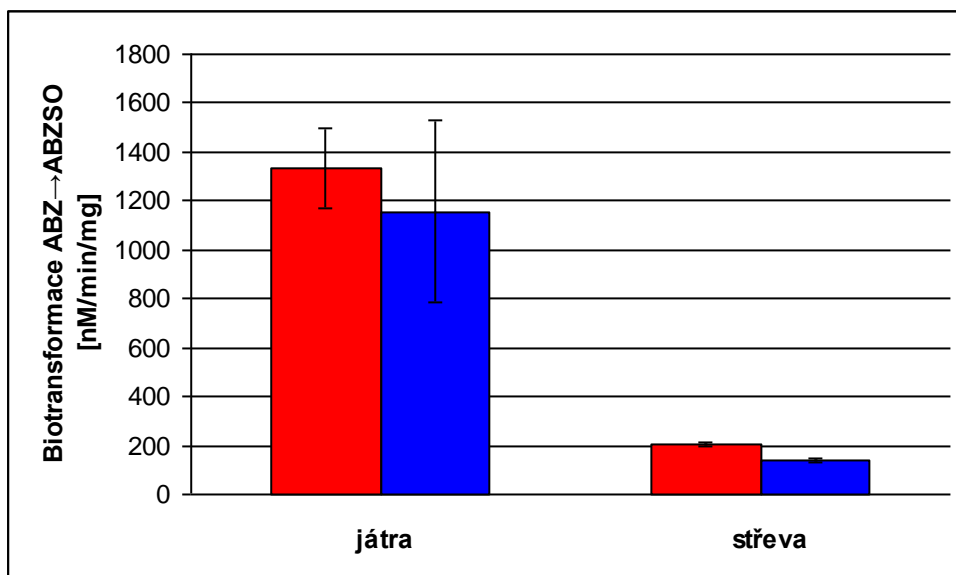
	Množství látky přítomné v mikrosomech [nmol/mg proteinu]		
	ABZ	ABZSO	ABZSO <sub>2</sub>
<b>Játra</b>	0,97	0,42	0,18
<b>Střeva</b>	ND	0,25	0,003

Mikrosomy byly inkubovány 30 min s 100  $\mu$ M ABZ, následně bylo pomocí HPLC změřeno množství metabolitů a vypočtena rychlost tvorby metabolitů ABZSO a ABZSO<sub>2</sub>.

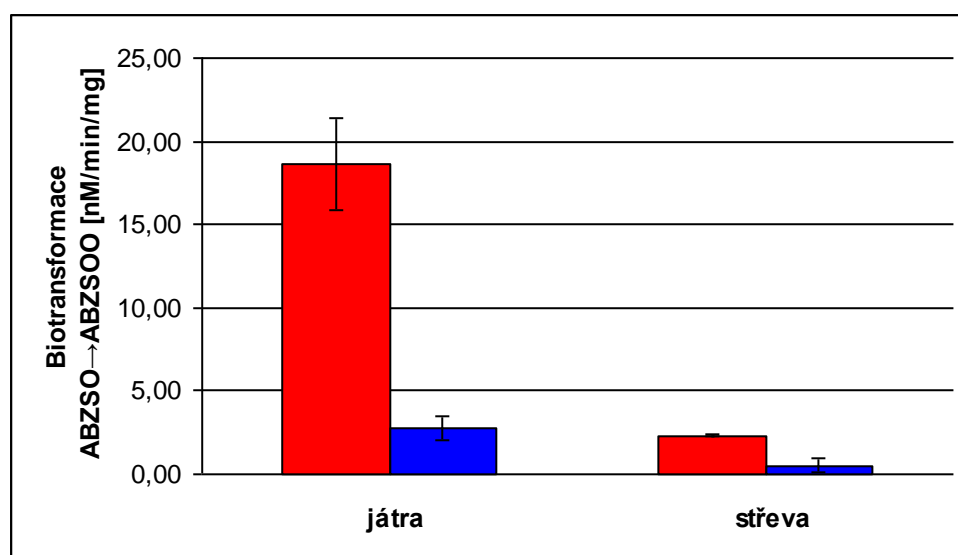
Výsledky inkubace (rychlost tvorby metabolitů) jsou uvedeny v tabulce 19. Grafy na obrázcích 22 a 23 ukazují porovnání 1. a 2. fáze sulfoxidace albendazolu v jaterní a střevní suspenzi mikrosomů.

Tab.19 Rychlost tvorby metabolitů ABZ in vitro

		V <sub>max</sub> [nM/min/mg] tvorby:	
		ABZSO	ABZSO <sub>2</sub>
<b>Játra</b>	léčení mufloni	1335 $\pm$ 161	18,6 $\pm$ 2,7
	kontrolní mufloni	1156 $\pm$ 371	2,7 $\pm$ 0,7
<b>Střeva</b>	léčení mufloni	205 $\pm$ 7	2,3 $\pm$ 0,04
	kontrolní mufloni	137 $\pm$ 9	0,53 $\pm$ 0,46



Obr.22 Rychlost přeměny ABZ na ABZSO (první fáze oxidace ABZ) při inkubaci jaterních a střevních mikrosomů léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře) s ABZ

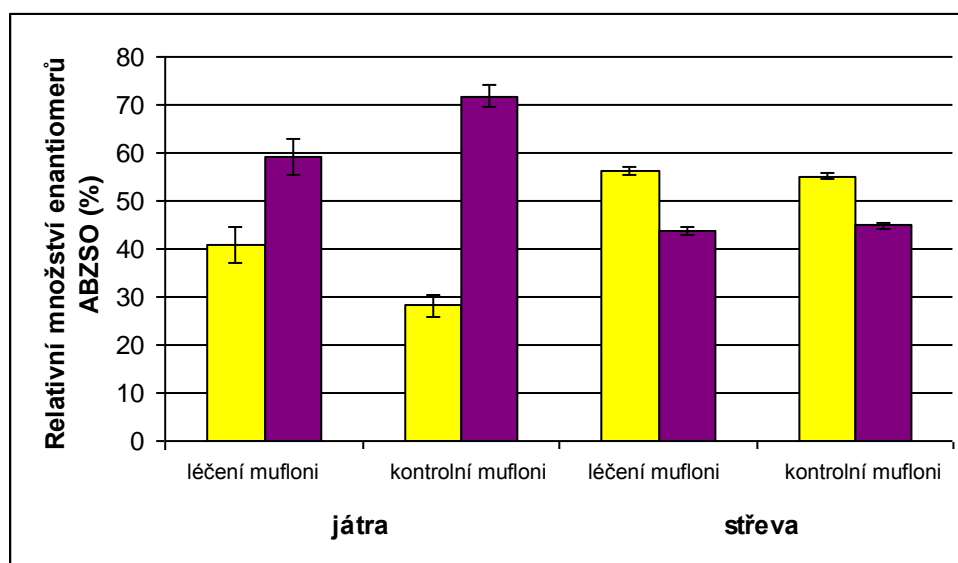


Obr.23 Rychlost přeměny ABZSO na ABZSO<sub>2</sub> (druhá fáze oxidace ABZ) při inkubaci jaterních a střevních mikrosomů léčených muflonů (červeně) a kontrolních muflonů (modře) s ABZ

Zároveň byla sledována stereospecifita přeměny ABZ na (+) a (-) enantiomery ABZSO. Relativní množství vytvořených stereoizomerů ABZSO uvádí tabulka 20. Z grafu na obrázku 24 je vidět preferenční tvorba jednotlivých enantiomerů podle skupin zvířat a orgánu metabolizace.

Tab.20 Poměrné množství vytvořených enantiomerů ABZSO při inkubaci mikrosomů s ABZ

		Relativní množství enantiomerů (%)	
		(-)-ABZSO	(+)-ABZSO
<b>Játra</b>	léčení mufloni	40,9 ± 3,7	59,2 ± 3,8
	kontrolní mufloni	28,2 ± 2,3	71,9 ± 2,3
<b>Střeva</b>	léčení mufloni	56,2 ± 0,9	43,9 ± 0,9
	kontrolní mufloni	55,1 ± 0,6	44,9 ± 0,6



Obr.24 Poměrné množství vytvořených enantiomerů (-)-ABZSO (žlutě) a (+)-ABZSO (fialově) při inkubaci jaterních a střevních mikrosomů léčených a kontrolních muflonů s ABZ

Z tabulky 19 a obrázků 22 a 23 je vidět, že mnohem výrazněji je podáním albendazolu ovlivněna tvorba ABZSO<sub>2</sub> než ABZSO. Při *in vitro* tvorbě ABZSO z ABZ sice je vyšší aktivita mikrosomů léčených zvířat, ale ne tak výrazně jako při tvorbě ABZSO<sub>2</sub>. Prvního stupně sulfoxidace ABZ se účastní CYP3A a FMO, druhou zajišťuje CYP1A. Tato druhá oxidace je v jaterních mikrosomech asi 7x vyšší u léčených zvířat oproti kontrolním, u střev je indukce asi pětinašobná. Zvýšení tvorby ABZSO je u střevních vzorků asi o 50%, což je také statisticky významné.

Porovnáním stereospecifity (tab. 20 a obr. 24) je vidět, že jaterní mikrosomy ve větší míře vytvářejí (+)-ABZSO, střevní mikrosomy naopak (-)-ABZSO. Největší rozdíl v preferenční tvorbě (+) enantiomeru je u jaterních kontrolních mikrosomů. Podávání ABZ muflonům vedlo k signifikantnímu posunu v poměru vzniklých enantiomerů ABZSO v játrech ve prospěch (-)-ABZSO. Poměr enantiomerů ABZSO ve střevech se významně nelišil u kontrolní a léčené skupiny zvířat.



## 5. DISKUSE

Podávání farmakologicky aktivních substancí může modulovat (indukovat nebo inhibovat) biotransformační enzymy. Indukce způsobuje vzestup metabolické aktivity enzymů, inhibice naopak její pokles v závislosti na přítomnosti xenobiotika. Modulace aktivity biotransformačních enzymů ovlivní účinek a plazmatický poločas současně podávaných léčiv s jejich farmakologickými a toxikologickými důsledky. Může dojít k vzestupu plazmatické hladiny léčiva s rizikem toxického působení nebo k snížení plazmatické koncentrace se snížením terapeutického efektu léčiva pod terapeutickou mez, rovněž se zvyšuje riziko nežádoucích účinků (Velík et al., 2004). Zmíněné důsledky indukce a inhibice biotransformačních enzymů ukazují, že je nezbytné modulaci monitorovat.

Biotransformační enzymy, u kterých byla v práci stanovována aktivita, byly vybrány na základě těchto kritérií: 1) účast na metabolismu albendazolu – CYP1A, CYP3A, FMO, UGT; 2) jejich indukovatelnost albendazolem u laboratorních druhů a u člověka – hlavně CYP1A, dále CYP3A, UGT; 3) jejich důležitost v lékových interakcích ve veterinární medicíně – CYP3A, CYP2C, UGT, GST (Velík et al., 2005). Jednotlivé enzymové aktivity byly stanovovány metodami, které jsou popsány pro stanovení daných biotransformačních enzymů u člověka a potkana.

Aktivity byly stanovovány v mikrosomech (v případě GST v cytosolu) nejen jater, ale i střev, protože účast biotransformačních enzymů střev byla též na metabolismu albendazolu prokázána (Velík et al., 2005).

Protože existují velké mezidruhové rozdíly v indukovatelnosti jednotlivých biotransformačních enzymů po podání léčiva, je potřebné toto stanovení provést na cílovém živočišném druhu, v této práci jím byl muflon. Muflonům se podal albendazol jednorázově v dávce 30 mg/kg ž.hm.

Albendazol je v prvním kroku své biotransformace oxidován na albendazolsulfoxid díky CYP3A a FMO, následuje oxidace na albendazolsulfon katalyzovaná CYP1A (obr.2). Zatímco albendazol a hlavně albendazolsulfoxid mají anthelmintickou aktivitu, albendazolsulfon již ne. V této práci je sledován hlavně CYP1A, který byl u muflona indukovatelný opakovaným podáním albendazolu (viz. Velík et al., 2005) a také proto, že transformuje účinný albendazolsulfoxid na neúčinný albendazolsulfon. Jeho indukci může dojít k tomu, že nebude dosažena potřebná plazmatická koncentrace účinných látek.

Aktivita podrodiny CYP1A (isoforem CYP1A1 a CYP1A2) byla stanovována prostřednictvím aktivit EROD a MROD. V případě jater nebyla EROD ani MROD aktivita léčených muflonů vyšší než aktivita muflonů kontrolních. Tím se zdánlivě nepotvrdila domněnka o indukci CYP1A. Již však existuje studie (Baliharová et al., 2005), která dokumentuje, že v přítomnosti albendazolu může být indukce maskována inhibičním efektem albendazolu. Přítomnost albendazolu v membránách jaterních mikrosomů byla pomocí HPLC prokázána (téměř 1 nmol/mg proteinu, tab.18). Na maskování indukce CYP1A inhibicí

příslušných aktivit ukazuje zvýšené množství CYP1A proteinů detekované imunoblottingem. V jaterních mikrosomech léčených zvířat byl nárůst CYP1A1/2 proteinů 3,5x oproti kontrole.

Ve střevech byla zaznamenána výrazná indukce EROD léčených muflonů oproti kontrolním – asi 25x. V membránách mikrosomů střev nebyla detekována přítomnost albandazolu. To koreluje s výše uvedeným tvrzením o inhibičním efektu albandazolu na aktivitu EROD. Mohla se zde tedy plně prokázat a projevit indukce CYP1A. Aktivita MROD nebyla ve střevních mikrosomech detekována. Při imunoblottingu bylo ve střevech zaznamenáno 2x více CYP1A proteinů.

Indukci CYP1A potvrzují i výsledky *in vitro* inkubace, kdy bylo HPLC analýzou metabolitů zjištěno výrazné zrychlení tvorby albandazolsulfonu z albandazolsulfoxidu (druhá fáze sulfoxidace) u léčených muflonů oproti kontrolním. U jaterních mikrosomů z léčených zvířat byla rychlost tvorby albandazolsulfonu oproti kontrole vyšší 7x, u střevních 5x.

Při *in vitro* inkubaci byla rychlost tvorby albandazolsulfoxidu (první fáze sulfoxidace) v jaterních mikrosomech jen asi o 15% zvýšena oproti kontrole (indukce nevýznamná), ve střevních mikrosomech bylo zvýšení rychlosti větší – asi o 50%, to již je statisticky významná indukce.

Porovnáním stereospecifity *in vitro* přeměny albandazolu na albandazolsulfoxid je vidět, že jaterní mikrosomy ve větší míře vytvářejí (+)-ABZSO (tvorbu tohoto enantiomeru zprostředkovává FMO), střevní mikrosomy naopak (-)-ABZSO (tvorbu zprostředkovává CYP3A). Podávání ABZ muflonům vedlo k signifikantnímu posunu v poměru vzniklých enantiomerů ABZSO v játrech ve prospěch (-)-ABZSO. Poměr enantiomerů ABZSO ve střevech se významně nelišil u kontrolní a léčené skupiny zvířat

Aktivita enzymů první fáze oxidace, tj. FMO a CYP3A, byla měřena prostřednictvím aktivit TBSO a 6 $\beta$ -TOH, u obou byla naměřená aktivita velice nízká. U FMO nebylo zvýšení aktivity u léčených zvířat statisticky významné, stanovení bylo provedeno pouze v jaterních mikrosomech. Aktivita CYP3A v jaterních mikrosomech se statisticky nelišila od aktivit kontrolních zvířat. Ve střevních mikrosomech byla naměřena asi 10x nižší aktivita CYP3A než v jaterních. Přes velmi nízkou aktivitu CYP3A ve střevech byl její nárůst u léčených muflonů statisticky prokázán. Katalytickou aktivitu CYP3A má též BROD. Zde v jaterních mikrosomech nebylo žádné zvýšení zaznamenáno. Střevní mikrosomy nevykazují žádnou BROD aktivitu.

Obecně lze říci, že naměřené aktivity 6 $\beta$ -TOH a TBSO jsou nízké jak ve skupině léčených, tak kontrolních muflonů. Z těchto výsledků však nelze usuzovat, že mufloni mají nízkou aktivitu CYP3A a FMO. Je totiž možné, že použité metody stanovení enzymových aktivit u člověka a laboratorních zvířat neodpovídají týmž enzymovým aktivitám muflona. Obdobně lze vysvětlit i nesoulad v posunu poměrů vytvořených enantiomerů ABZSO při inkubaci mikrosomů s albandazolem v jaterních mikrosomech z léčených muflonů oproti kontrole. Ačkoli vlivem léčby se poměr vzniklých enantiomerů ABZSO signifikantně posunul směrem k (-) izomeru, aktivita 6 $\beta$ -TOH v játrech nebyla zvýšená a ani naopak nedošlo

k snížení aktivity TBSO. Na rozdíl od lidských vzorků se tedy enzymy, které katalyzují 6 $\beta$ -TOH a TBSO aktivitu u muflona zřejmě nepodílejí na tvorbě ABZSO.

U aktivity MFCD, která u člověka odpovídá aktivitě CYP2C9, byla statisticky potvrzena inhibice u léčených zvířat oproti kontrolním (v jaterních mikrosomech).

Porovnání aktivit konjugčních enzymů, tj. UGT a GST, ukazuje že v játrech probíhá přednostně konjugace s glukuronovou kyselinou (střeva nevykazují žádnou aktivitu tohoto enzymu), ve střevech převažuje konjugace s glutathionem. GST je jediný sledovaný enzym, který se nachází volně v cytosolu. Již bylo zmíněno, že jeho aktivita v játrech je nižší než ve střevech a zároveň zde nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi aktivitou u léčených a kontrolních zvířat. Naopak střevní GST je u léčených zvířat dvojnásobná oproti kontrolním, zde bylo zvýšení aktivity statisticky potvrzeno.

Vlivem jednorázového podání albendazolu muflonům tedy byla prokázána výrazná indukce CYP1A jak v jaterních mikrosomech, tak ve střevních. Toto tvrzení je podloženo western blottingem, *in vitro* inkubací mikrosomů s albendazolem a v případě střev i měřením aktivit EROD a MROD. Dále došlo vlivem léčby albendazolem k signifikantnímu nárůstu 6 $\beta$ -TOH (CYP3A), aktivity GST a tvorbě ABZSO ve střevních mikrosomech. Naopak v jaterní aktivitě MFCD (CYP2C9) byla prokázána inhibice u léčených zvířat oproti kontrolním.

## 6. ZÁVĚR

Jednorázové podání dávky 30 mg/kg ž. hm. albendazolu muflonu významně moduluje řadu jaterních i střevních biotransformačních enzymů. Nejvýraznější je indukce CYP1A jak v játrech, tak i střevech muflonů. Tato indukce urychluje tvorbu neúčinného albendazolsulfonu. Podání albendazolu tak způsobuje zrychlení jeho vlastní metabolické degradace v játrech i ve střevech, což může vést až k selhání anthelmintické léčby. Zároveň se indukce může podílet na vzniku helmintorezistence nebo ovlivnit metabolismus současně podávaných léčiv, která jsou biotransformována stejným enzymem. CYP1A se účastní metabolismu i jiných anthelmintik a některých dalších veterinárních léčiv, navíc tato podrodina cytochromu P450 je známa především pro svoji úlohu v biotransformaci organických kontaminant životního prostředí. Vysoká CYP1A aktivita navíc může tedy vést ke zvýšené aktivaci určitých prekarcinogenů, např. polycyklických aromatických uhlovodíků nebo chlorovaných bifenyly (Velík et al., 2005).

Z hlediska indukce především CYP1A se nezdá být výhodnější podávat muflonům jednorázově dávku 30 mg/kg ž. hm. oproti dávkovacímu schématu 7,5 mg/kg ž. hm. po pět po sobě následujících dní (srovn. Velík et al., 2005).

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABZ	albendazol
ABZSO	albendazolsulfoxid
ABZSO <sub>2</sub>	albendazplsulfon
CYP	cytochrom P450
FMO	flavinová monooxygenasa
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
UGT	UDP – glukuronosyltransferasa
GST	glutathion–S-transferasa
GSH	redukovaný glutathion
AhR	aryl hydrocarbon receptor
Arnt	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
HAH	halogenované aromatické uhlovodíky
Hsp90	90kDa heat-shock proteins
XRE	xenobiotic-responsive elements
BCA	bicinchonic acid
SDS	dodecylsulfát sodný
AP-protilátka	protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatasou
EROD	ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylasa
MROD	methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylasa
PROD	pentoxyresorufin- <i>O</i> -depentylasa
BROD	benzyloxyresorufin- <i>O</i> -dearylase
DMSO	dimethylsulfoxid
TBSO	thiobenzamid-S-oxidasa, S-oxid thiobenzamidu
TB	thiobenzamid
6β-TOH	6β-testosteronhydroxylasa
THF	tetrahydrofuran
MFC	methoxyfluorkumarindemethylasa
MFC	7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin
HFC	7-hydroxy-4-trifluoromethylkumarin
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
CDNB	1- chloro-2,4-dinitrobenzen

## 8. LITERATURA

ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4

BALIHAROVÁ, V., et al. *Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro*. *Pharmacological Reports* 57, 2005, s. 97-106. ISSN 1734-1140

BALIHAROVÁ, V., et al. *The effect of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat*. *Research in Veterinary Science* 75, 2003, s. 231-239.

BALIHAROVÁ, V., et al. *The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells*. *Research in Veterinary Science* 75, 2003, s. 61-69.

BOUCNER, M., BERGER, Z. *Lovná zvěř*. Aventinum, 1991. 223 s. ISBN 80-85277-08-5

CONNAY, A. H. *Induction of Drug-Metabolizing Enzymes: A Path to the Discovery of Multiple Cytochromes P450*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, s. 1-30.

DAUJAT, M. et al. *Induction of CYP1A1 gene by benzimidazole derivatives during Coco-2 cell differentiation. Evidence for an aryl-hydrocarbon receptor-mediated mechanism*. *Eur. J. Biochem.* 237, 1997, s. 642-652.

DENISON, M. S., NAGY, S. R. *Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 2003, s. 309-334.

DVOŘÁK, J., KAMLER, J. *Vybrané kapitoly z myslivosti (doplňkový učební text pro posluchače FLD MZLU)*. Brno, 1998.

DOSTÁLEK, M. *Enzymatický systém cytochromu P450*. *Postgraduální medicína*, 1/2006, roč. 8, s. 46-54.

FUJII-KURIYAMA, Y., MIMURA, J. *Molecular mechanisms of AHR functions in the regulation of cytochrome P450 genes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 2005, s. 311-317.

JAVŮREK, J. *Myslivost. Severografie*, n.p.,závod 1, Liberec, 1961. 481 s.

KVASNIČKOVÁ, E. *Xenobiochemie*. Karolinum, 1995. 49 s.

LAMKA, J., DUCHÁČEK, L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Karolinum, 1998. 164 s. Kapitola 1, Léčiva infekčních chorob, s. 18-93.

LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8.

MURRAY, R. K. et al. *Harperova biochemie*. H+H, 2001. 872 s. ISBN 80-7319-003-6

SZOTÁKOVÁ, B., et al. *Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep*. Research in Veterinary Science 76, 2004, s. 43-51.

ŠTORKÁNOVÁ, L. *Vliv dikroceliózy na aktivitu biotransformačních enzymů muflona*. Hradec Králové, 2004. 75 s. Rigorózní práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře biochemických věd. Vedoucí rigorózní práce Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

VELÍK, J., et al. *Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes*. J. vet. Pharmacol. Therap. 26, 2003, s. 297-302.

VELÍK, J., et al. *Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes*. Research in Veterinary Science 76, 2004, s. 95-108.

VELÍK, J., et al. *Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon*. Research in Veterinary Science 78, 2005, s. 255-263.

ŽALMAN, V. *Základy mysliveckého chovu, péče a ochrany zvěře*. Albert, 1997. 128 s. ISBN 80-85834-47-2