

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

**STUDIUM BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ U
PARAZITA - MOTOLICE KOPINATÉ**

(diplomová práce)

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

Hradec Králové, 2006

Markéta Kuběnová

Poděkování:

Děkuji Doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při sestavování mé diplomové práce a Mgr. Michalu Šavlíkovi, Ph.D. za pomoc při práci na experimentu. Dík patří také paní Aleně Pakostové za měření na HPLC. Děkuji i ostatním pracovníkům katedry biochemických věd za ochotu a pomoc.

OBSAH

OBSAH	3
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 Dicrocoelium dendriticum.....	6
2.2 Dikrocelióza	7
2.2.1 Epidemiologie	8
2.2.2 Patogeneze.....	10
2.2.3 Diagnóza.....	11
2.2.4 Profylaxe a léčba	11
2.3 Kinetika enzymových reakcí	12
2.4 Sledované biotransformační enzymy	15
2.4.1 Cytochromy P450.....	16
2.4.1.1 CYP1A	18
2.4.1.2 CYP3A	19
2.4.2 Redukční enzymy	19
2.4.2.1 Metyrapon	21
2.4.2.2 Daunorubicin	22
2.4.2.3 DL-glyceraldehyd.....	23
2.4.2.4 Acenaphtenol.....	23
2.4.2.5 Oracin	24
2.4.3 Konjugační enzymy.....	25
2.4.3.1 UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)	25
2.4.3.2 Glutathion-S-transferasa (GST)	26
2.5 Flubendazol	27
3 CÍL PRÁCE.....	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE	30
4.1.1 Biologický materiál	30
4.1.2 Chemikálie	30
4.1.3 Přístroje	31
4.2 PRACOVNÍ POSTUP.....	32
4.2.1 BCA STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY	32
4.2.2 STANOVENÍ AKTIVITY OXIDAČNÍCH ENZYMŮ	33
4.2.2.1 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)	33
4.2.2.2 Stanovení aktivity benzyloxy-O-dearylasy (BROD)	34
4.2.2.3 Stanovení aktivity testosteronhydroxylasy (TOH).....	36
4.2.3 STANOVENÍ AKTIVITY REDUKČNÍCH ENZYMŮ.....	38
4.2.3.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu	38
4.2.3.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 6,0)	38
4.2.3.3 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu	39
4.2.3.4 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 8,5)	40
4.2.3.5 Stanovení aktivity reduktas acenaftenolu	40
4.2.3.6 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu.....	41
4.2.4 STANOVENÍ AKTIVITY KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ	43
4.2.4.1 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).....	43
4.2.4.2 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST).....	44
4.2.4.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy	45

4.2.5	TESTOVÁNÍ BIOTRANSFORMACE FLUBENDAZOLU	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY	47
5.2	STANOVENÍ AKTIVITY OXIDAČNÍCH ENZYMŮ	48
5.2.1	Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)	48
5.2.2	Stanovení aktivity benzyloxy-O-dearylasy (BROD)	48
5.2.3	Stanovení aktivity testosteronhydroxylasy (TOH).....	48
5.3	STANOVENÍ AKTIVITY REDUKČNÍCH ENZYMŮ.....	49
5.3.1	Stanovení aktivity reduktas metyraponu	49
5.3.2	Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 6,0	49
5.3.3	Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu	50
5.3.4	Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5	50
5.3.5	Stanovení aktivity reduktas acenaftenolu	50
5.3.6	Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu.....	51
5.4	STANOVENÍ AKTIVITY KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ	52
5.4.1	Stanovení aktivity UGT	52
5.4.2	Stanovení aktivity GST	52
5.4.3	Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy	53
5.5	TESTOVÁNÍ BIOTRANSFORMACE FLUBENDAZOLU	54
6	DISKUSE.....	57
7	ZÁVĚR.....	62
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	63
	LITERATURA.....	64

1 ÚVOD

Trematodózy zvířat, choroby parazitárního původu působené motolicemi, jsou neustále v popředí zájmu odborné veřejnosti. Důvodů je mnoho, patří k nim zvláště celosvětová prevalence onemocnění, silně negativní hospodářský dopad na produkční úroveň postižených chovů, omezené spektrum prostředků využitelných k prevenci a léčbě parazitóz, přenosnost původců některých trematodóz na člověka aj. Ve skupině trematodóz zvířat dominuje orientace na fasciolózy a dikroceliózu. Dikrocelióza působená motolicí kopinatou (*Dicrocoelium dendriticum*) je aktuální i v Evropě včetně České republiky.

Dikrocelióza i přes její dlouhodobé studium představuje spolu s ostatními trematodózami stále ne zcela poznanou problematiku. I když se v posledních letech objevují v literatuře studie zaměřené na ještě detailnější poznání vlivu parazitů na hostitelský organismus, na vyvinutí účinnějších diagnostických a preventivních přípravků, na přesnější poznání farmakologických prostředků, stále existují mnohé velmi podstatné aspekty této trematodózy k dalšímu zkoumání. Pro celou skupinu trematodóz platí, že plně využitelných léčivých látek je jen velmi málo a léčiva opakovaným podáním zvířatům mohou ztratit účinnost v důsledku vývoje tzv. lékové helmintorezistence.

Obecně pro biotransformační pochody platí, že mají za cíl co nejrychleji zbavit živý organismus látek tělu cizích. K takovým látkám patří mj. i léčiva farmakologického typu. Biotransformaci léčiv katalyzují komplexy enzymů lokalizovaných na endoplazmatickém retikulu a v cytosolu buněk. Zcela zásadním biotransformačním centrem organismu jsou játra. Bylo také prokázáno, že obdobné biotransformační enzymy jsou přítomny i v buňkách parazitů. Tato práce se zabývá studiem vybraných biotransformačních enzymů motolice kopinaté.

K léčivům s plnou anthelmintickou účinností proti dikrocelióze ovcí patří benzimidazoly, ve své práci jsem se zaměřila na biotransformaci flubendazolu.

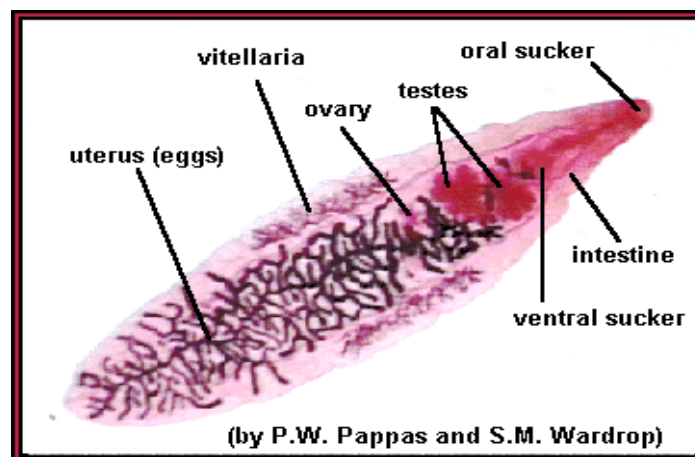
V experimentu byly použity jednotlivé frakce motolice kopinaté, parazit byl získán z jater nemocných muflonů. V těchto frakcích byla sledována aktivita vybraných biotransformačních enzymů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dicrocoelium dendriticum

Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) je celosvětově rozšířený parazit napadající játra, žlučovody a žlučník savců, především přežvýkavců. Parazit může příležitostně nakazit i člověka (B. Revilla – Nuin et al. 2005).

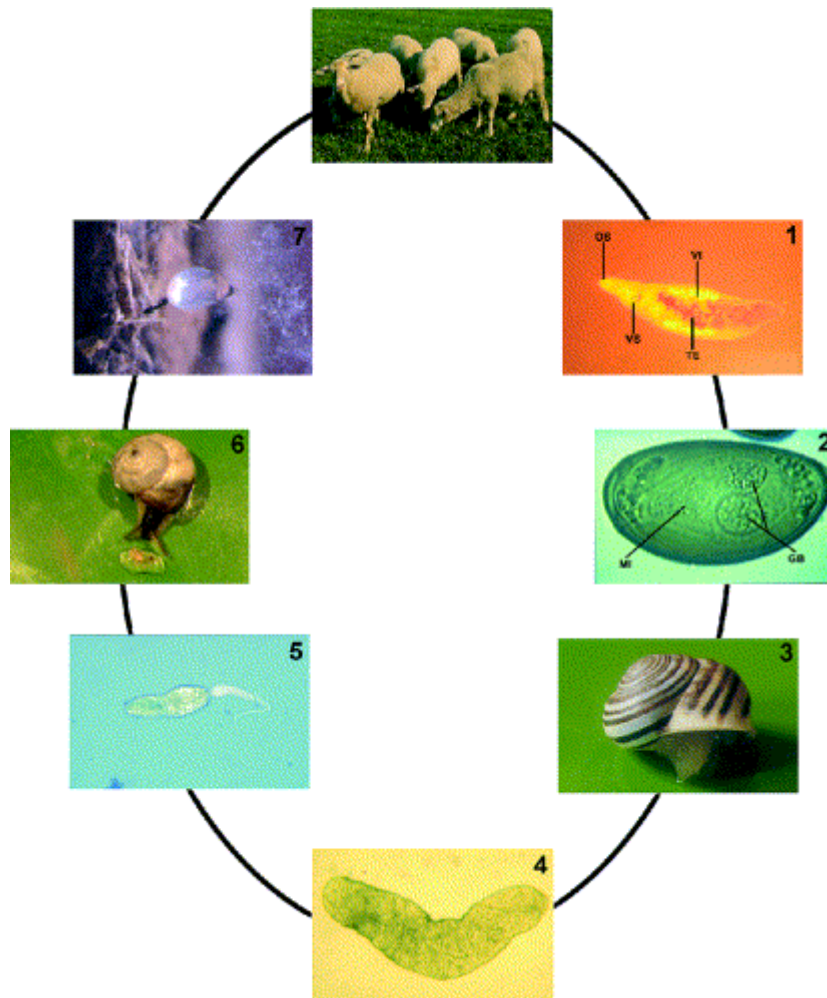
D. dendriticum (Trematoda, Dicrocoeliidae) má kopinatý tvar těla, je 8 – 14 mm dlouhá a 2 – 3 mm široká (obr. 1). Vajíčka jsou oválná, tmavě hnědá a obsahují miracidium.



Obr. 1: *Dicrocoelium dendriticum*

Biologický cyklus motolice trvá asi 6 měsíců a je nepřímý. Některé druhy suchozemských měkkýšů a mravenci jsou primárními a sekundárními meziphostiteli a přežvýkavci jsou definitivní hostitelé. V plžích probíhá nepohlavní vývoj 3 – 4 měsíce, z miracidia, které se dostává do plžů spolu s vajíčky se vyvíjí první a druhá generace sporocyst. Z druhé generace sporocyst se vyvíjí množství cercárií, a když dozrají migrují z hepatopankreatu do plicního vaku. Cercárie jsou vyloučeny plži ve slizových koulích, které jsou pozřeny mravenci (*Formica spp.*) a vyvíjí se během 1 – 2 měsíců v metacerkárie. Jedna nebo dvě cercárie se soustřeďují v suboesofageálním gangliu mravence a způsobují kataleptickou křeč při teplotě pod 15°C, tak je mravenec udržen na vrcholcích rostlin a může být snadněji pozřen pasoucími se přežvýkavci. V definitivním hostiteli metacerkárie excystují z mravenců díky působení duodenálních enzymů a migrují do žlučovodů a žlučníku, dozrávají v dospělce a

pohlavně se rozmnožují. Vajíčka jsou uvolněna do prostředí ve výkalech. Schématické znázornění životního cyklu motolice je na obrázku 2.



Obr. 2: Životní cyklus *D. dendriticum*: dospělý parazit (1), uvolněná vajíčka ve výkalech (2), a miracidium (MI) přechází do hepatopankreatu plže (3), pak se vyvíjí první a druhá generace sporocyst (SP1, SP2) (4), množství cercárií vyvinutých z SP2 migruje do plicního vaku měkkýše (5), cercárie jsou vyloučeny plži ve slizových koulích (6), které jsou pozřeny mravenci (7).

2.2 Dikrocelióza

Dikrocelióza je v současnosti považována za celosvětově významnou, ale zároveň v běžných chovatelských podmínkách podceňovanou helmintózou domácích a volně žijících přežvýkavců, ale i jiných druhů zvířat a člověka. Ačkoliv je

dikrocelióze celosvětově věnována poměrně značná pozornost, stále existují mnohé velmi podstatné aspekty této trematodózy k dalšímu ověření.

2.2.1 Epidemiologie

Dikrocelióza je v současnosti celosvětově rozšířena na pastvinách, které poskytují adekvátní podmínky pro přežití a vývoj suchozemských měkkýšů a mravenců. Byla častěji popsána u ovcí a koz než u skotu (Otranto, Traversa 2002).

Toto onemocnění je běžné v těch regionech Evropy, Severní Afriky, Asie a Ameriky, kde jsou lokální podmínky příznivé pro určité druhy suchozemských měkkýšů a mravenců jako mezihostitelů. Takovými regiony v Evropě jsou např. horské pastviny Alp, Skandinávie, v České Republice se dikrocelióza vyskytuje především ve středních a jižních Čechách a na jižní Moravě (Ducháček, Lamka 2003).

V posledních 50 letech bylo šíření a epidemiologie dikroceliózy značně studováno. Hlavními faktory, které ovlivňují onemocnění jsou:

a) Lokální environmentální a ekologické faktory

Zdá se, že výskyt *D. dendriticum* je vázán na vápenaté a zásadité půdy, které jsou příznivými biotopy pro rozmnožování a přežívání mezihostitelů. Rozšíření vajíček motolice a kontaminace pastev je způsobená domácími a volně žijícími přežvýkavci, ale i králíky a zajíci. Vajíčka, která se dostávají na pastvy ve výkalech, jsou vysoce odolné vůči prostředí, včetně teplotních změn a zůstávají infekční až 20 měsíců.

b) Přítomnost a etologie mezihostitelů

Na rozdíl od *Fasciola* spp. nevyžadují mezihostitelé *D. dendriticum* vlhké prostředí a jsou na pastvinách velmi rozšířeni. Existuje více než 90 druhů měkkýšů, které mohou být mezihostiteli *D. dendriticum*, některé z nich jsou rozšířeny celosvětově (např. *Cochlicopa lubrica*), zatímco jiné jen regionálně (*Helicella corderoi* ve Španělsku, *Helicella obvia* v Německu, *Cerņuella virgata* v Itálii).

Jako druhý mezihostitel byl zkoumán zvláště druh *F. pratensis* a *F. rufibarbis*. Zůstávání mravenců na vrcholcích rostlin způsobené cercárií bylo popsáno jako

desorientační mechanismus a je odvozován od starobylého chování předchůdců mravenců. Tedy je zajímavé, že cercárie encystující v suboesofageálním gangliu mravence se obětuje pro zrání a reprodukci cercárií v mravenčím žaludku, tak se chová jako altruista.

c) Přítomnost definitivního hostitele

Zdá se, že ovce jsou citlivější k *D. dendriticum* než kozy, avšak nebyly zaznamenány podstatné rozdíly v zátěži parazity a množstvím vajíček v jednom gramu výkalů.

Věk nakažených zvířat má pravděpodobně vliv na produkci vajíček, avšak je potřeba na toto téma provést další výzkumy.

Faktory navozující stres jako transport a věznění zvířete, pravděpodobně způsobují snížení imunity, což se projeví zvýšením produkce vajíček motolic.

Campo et al. (2000) se zabývali vztahem mezi parazitární zátěží a produkcí vajíček, který byl stanoven nekropsii a analýzou výkalů u dvou skupin jehňat experimentálně infikovaných různou dávkou metacerkárií (1000 a 3000 metacerkárií). Eliminace vajíček, která začala 2 měsíce po nakažení, byla větší u jehňat infikovaných 3000 metacerkárií.

Podle několika studií má pohlaví vztah k citlivosti zvířete vůči dikrocelióze. Nekroskopické zkoumání 2033 jater skotu přirozeně nakaženého motolicí kopinatou odhalilo prevalenci dikroceliózy 62,5 % u samic a 9,8 % u samců. Důvodem vysokého poměru samic může být fakt, že mléčná plemena se pasou po několik sezón a tak získají infekci. Zatímco býci tráví značnou část svého života ve výkrmnách. Sezónnost infekce je dána pohybem zvířat z nížin do horských pastvin, kde jsou nakažená mravenci, a pak přinášejí infekci během zimy zpět do údolí. Některé druhy mezihostitelů (hlemýžďi *H. obvia* a *C. lubrica*, mravenci *F. pratensis* a *F. cunicularia*) žijí v horských pastvinách ve výškách 1800 – 2600 m.n.m. Zdá se, že migrace predisponuje zvířata k infekci, nejen pro přítomnost mezihostitelů, ale také kvůli vysokému stresu vyvolanému přesunem na pastviny (Otranto, Traversa 2002).

2.2.2 Patogeneze

Je obtížné jasně určit vliv dikroceliózy, protože je často maskován patologickými důsledky způsobenými jinými průvodními parazity (fasciolóza a gastrointestinální nematodózy) (B. Revilla-Nuin et al. 2005).

U nemocných zvířat byla zaznamenána ztráta nebo změna důležitých biomolekul (např. plazmatických proteinů) způsobena gastrointestinálními nebo jaterními parazity. Toto bylo detekováno radioisotopickými technikami k zhodnocení patofyziologie zvířat, které byly přirozeně nakaženy dikroceliózou. Bylo zjištěno, že zátěž do 4000 *D. dendriticum* nezpůsobuje signifikantní ztrátu krevních a plazmatických bílkovin u ovcí a že zaznamenané změny v těchto parametrech jsou dány helminty *Fasciola hepatica* a *Haemonchus contortus* díky jejich větší patogenicitě.

Mladé motolice migrují přímo do systému žlučvodů jater bez průniku střevní stěnou, jaterním pouzdrmem nebo jaterním parenchymem jako je tomu u fasciolózy. Klinické symptomy nejsou obvykle zjevné, dokud není onemocnění v těžkém stádiu, proto rozsáhlé léze jsou zjistitelné jen nekropsii jater. Na utrpení zvířat postižených dikroceliózou ukazuje anémie, edém, vyhublost a v pokročilém stádiu cirhóza, zjizvení povrchu jater a zřetelné rozšíření žlučvodů. Motolice dráždí povrch žlučvodů, což vede k proliferaci a změnám v lobulárních žlučovodech.

Byl zjištěn přímý vztah mezi parazitární zátěží a množstvím lézí u nakažených zvířat a makroskopické jaterní léze byly roztrženy do pěti různých stupňů od normálních jater k ztvrdlým játrům s jizvou, zřetelně roztaženým jaterním vývodům s vážnou fibrózou a těžkým zatížením parazity. U těžkých infekcí je uvnitř žlučvodů a žlučníku zjistitelné velké množství červů, játra jsou zvětšená se zesílenými vývody, cholangitidou, bělavými skvrnami na povrchu, znatelnou jizvou a cirhózou.

U experimentálně infikovaných křečků byly patologické změny charakterizovány proliferací žlučvodu a zvětšením povrchové plochy, infiltrací lymfocytů, makrofágů a eosinofilů do portálního řečiště, infiltrací kolagenu z portálního řečiště a interlobulárního septa, vedoucí k atrofii jater. Antioxidační obranná schopnost jater u těchto křečků vzrůstala 80 – 120 dní po infikování. Zároveň se snižuje aktivita superoxidodismutasy, indikující neúčinnou deaktivaci reaktivních forem kyslíku, což vede k oxidativnímu poškození jater a vzrůstá aktivita alaninaminotransferasy a aspartátaminotransferasy (Otranto, Traversa 2002).

2.2.3 Diagnóza

Dikrocelióza zůstává často klinicky neodhalená a nerozpoznána pro její subklinický charakter. Její diagnóza se provádí především odhalením dospělých parazitů v játrech nekropsii nebo detekcí vajíček koprologickou zkouškou.

Koprologická zkouška je nejběžněji používaná technika pro diagnózu dikroceliózy a může odhalit přítomnost malých, silnostěnných, žlutohnědých vajíček, které obsahují miracidium. Na rozdíl od výsledků získaných z diagnózy fasciolózy a paramphistomózy, nejsou sedimentační techniky výkonné a je preferována flotační zkouška s vysokou hustotou roztoků (Otranto, Traversa 2002). Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití Hgl₂/KI roztoku, zatímco použitím ZnSO₄ a K₂CO₃ flotačních roztoků byly získány horší výsledky.

Negativní koprologický nález není vždy důkazem parazitologické negativity. Při srovnání výsledků získaných zkoumáním výkalů s nekropsii jater, koprologická metoda dokázala objevit přítomnost dikroceliózy jen v jednom ze tří infikovaných zvířat (Ducháček, Lamka 2003).

V posledních 30 letech byly vyvíjeny imunologické metody jako alternativa ke koprologickým zkouškám a postmortální prohlídce jater. K detekci anti-*Dicrocoelium* protilátek bylo použito mnoho imunodiagnostických metod jako je imunofluorescence, precipitace, pasivní hemoaglutinační test, komplementární fixace a ELISA (Otranto, Traversa 2002).

2.2.4 Profylaxe a léčba

Kontrola dikroceliózy je obtížná a nedostatečná kvůli složitosti životního cyklu motolice a epidemiologii. Je založena především na hospodářské praxi kontroly primárního a sekundárního mezipřehoditele a na léčbě zvířat.

Metody kontroly mezipřehoditelů jsou proveditelné jen na malých plochách. Použití chemikálií není z ekologických důvodů snadné. Určitou možností by mohlo být zavedení krocanů, kuřat, hus a kachen na malé pastvy (asi 50 ptáků na ha), kteří by se živili měkkýši a mravenci.

Profylaxe v endemických oblastech je založena na léčbě všech zvířat přímo vystavených infekci. Doporučuje se provést léčbu dvakrát nebo třikrát ročně, a to na začátku jara, před ustájením zvířat na podzim. Mezi používané anthelmintika patří

benzimidazoly (albendazol, triclabendazol, fenbendazol, mebendazol, cambendazol, thiabendazol) a pro-benzimidazoly (thiofanát) ve vyšších dávkách než proti tasemnicím, plicním a gastrointestinálním nematodám. V současnosti nejsou rozvíjeny postupy vakcinace proti dikrocelióze (Otranto, Traversa 2002).

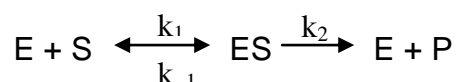
2.3 Kinetika enzymových reakcí

Enzymy jsou katalyzátory, a proto ovlivňují reakční rychlost, avšak nemohou měnit rovnováhu chemických reakcí. Podle srážkové teorie proběhne chemická reakce mezi dvěma částicemi tehdy, srazí-li se obě s dostatečnou energií, která překonává energetickou bariéru – přechodný energetický stav. Čím větší kinetickou energii částice mají, tím častější jsou jejich srážky. Vlivy, které zvyšují kinetickou energii částic, ovlivňují tedy příznivě průběh reakce: vyšší teplota, tlak. Reakce v živých systémech však probíhají za konstantního tlaku a poměrně nízké teploty, takže molekuly mají nízkou kinetickou energii a reakce by probíhaly velmi pomalu. Reakční rychlost je tedy zvyšována přítomností katalyzátorů – enzymů.

Výchozí látky i produkty mají určitý obsah Gibbsovy energie. Vzájemná přeměna vede přes přechodný stav s vyšším obsahem energie než mají oba reaktanty. Enzymy urychlují průběh reakcí tím, že snižují hodnotu energie přechodného stavu – aktivační energii. Je to dáno přechodným vznikem komplexu enzym – substrát v aktivním místě enzymu. Komplex enzym – substrát je nestálý a rozpadá se za vzniku produktu a enzymu, jehož aktivní místo je schopno vázat další molekulu substrátu.

U většiny enzymově katalyzovaných reakcí je reakční rychlost v závislá na koncentraci substrátu $[S]$. Je-li koncentrace enzymu $[E]$ konstantní, pak při nízkých koncentracích substrátu je závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu lineární (obr. 3).

Pro sledování reakční kinetiky enzymově katalyzované reakce vypracovali Michaelis a Mentenová model, který předpokládá přechodnou tvorbu komplexu ES:



Substrát se váže na enzym E rychlostí odpovídající rychlostní konstantě k_1 . Komplex ES se buď může rozpadat zpět na enzym a substrát rychlostí odpovídající konstantě k_{-1} nebo poskytnout produkt P a enzym E rychlostí odpovídající konstantě k_2 . Nepředpokládá se, že by se produkt a enzym mohly zpětně vázat za vzniku komplexu ES.

Při nízkých koncentracích substrátu je rychlost katalyzované reakce úměrná jeho koncentraci: $v = k \cdot [S]$, tj. reakce 1. řádu.

Při vysokých koncentracích substrátu však rychlost enzymové reakce na koncentraci substrátu nezávisí: $v = \text{konst.}$, tj. reakce 0. řádu.

Za nízké koncentrace substrátu nejsou všechny molekuly enzymu vysyceny substrátem a rychlost je úměrná koncentraci ES. Při nadbytku substrátu se vytvoří ES z veškerého přítomného enzymu a rychlost reakce dosáhne maximální hodnoty. Platí vztah:

$$V_{\max} = k \cdot [ES] = k \cdot [E]$$

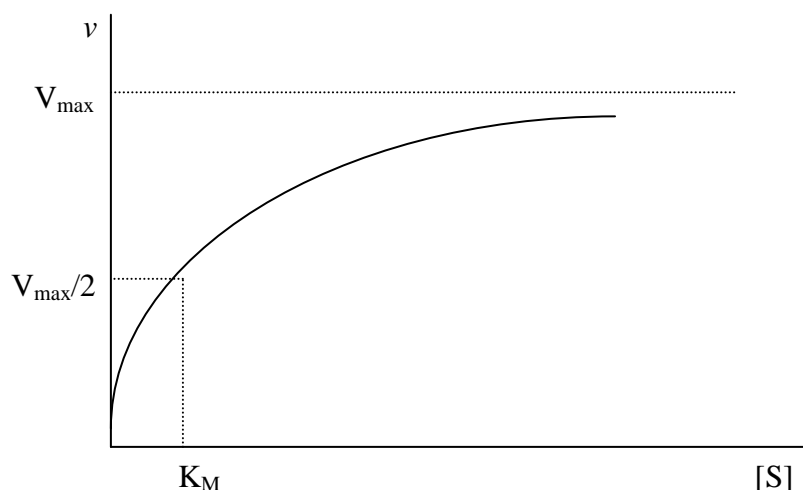
kde V_{\max} je maximální rychlost enzymové reakce.

Poměr rychlostních konstant jednotlivých reakcí můžeme definovat jako novou rychlostní konstantu K_M – Michaelisovu konstantu:

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

Matematickou formulací této teorie kinetiky enzymových reakcí lze odvodit rovnici vyjadřující vztah mezi okamžitou rychlostí enzymové reakce a koncentrací substrátu; rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

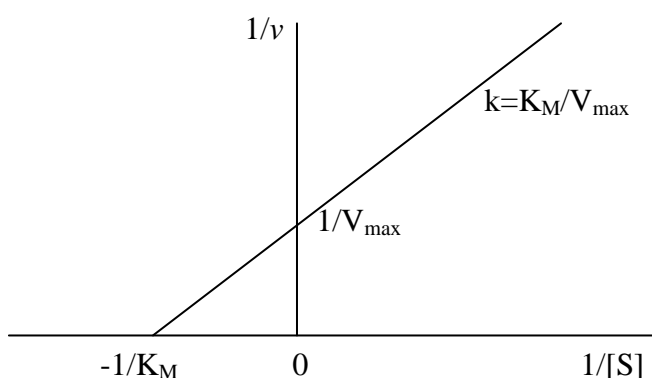


Obr. 3: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.

Je-li $[S] = K_M$, pak reakční rychlost v odpovídá polovině rychlosti maximální ($v = V_{max}/2$). Proto se K_M také definuje jako koncentrace substrátu, při níž je právě dosaženo poloviny maximální reakční rychlosti ($K_M = V_{max}/2$). K_M má rozměr koncentrace substrátu, pro nějž byla odvozena a není rovnovážnou konstantou katalyzované reakce. Vyjadřuje míru afinity enzymu pro substrát. Vazba nastává tím snáze, čím je hodnota K_M nižší. Veličiny K_M a V_{max} podle rovnice Michaelise – Mentenové lze experimentálně zjistit na základě sledování reakčních rychlostí změřených při různých koncentracích substrátu. K_M a V_{max} lze odečíst z grafu závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, ale pro obtížné určování maximální rychlosti, ke které se křivka asymptoticky blíží, je vhodnější použít ke stanovení K_M a V_{max} upravené formy rovnice Michaelise a Mentenové; často se užívá transformace dle Lineweavera a Burka:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

To je rovnice přímky se směrnici K_M/V_{max} a průsečíkem $1/V_{max}$ na svislé ose. Z vynesných hodnot lze určit K_M (přímka protíná vodorovnou osu v bodě, jehož vzdálenost od počátku je rovna $-1/K_M$) (obr. 4).



Obr. 4: Stanovení K_M a V_{max} dle Lineweavera a Burka.

Hodnota K_M pro určitou soustavu enzymu a substrátu závisí na reakčních podmínkách, tj. na prostředí, teplotě, iontové síle prostředí atd. Pro různé substráty reagující s týmž enzymem má K_M různou hodnotu. Hodnota K_M odpovídá koncentraci

substrátu, při které je substrátem obsazena právě polovina všech aktivních míst přítomných molekul enzymu. Hodnota K_M dále odpovídá disociační konstantě komplexu ES. Vysoká hodnota K_M je důkazem slabé vazby mezi enzymem a substrátem (malé afinity enzymu k substrátu), nízká hodnota naopak dokazuje silné vazby (velkou afinitu enzymu k substrátu) (Barnová et al. 1991).

2.4 Sledované biotransformační enzymy

Organismus se snaží cizorodé látky, které se do něho nahodile nebo vědomě dostaly, eliminovat, i když nejsou toxické. Mnohé z xenobiotik, zvláště ty s hydrofobní povahou, se na dlouhou dobu vážou a kumulují v těle. Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních cizorodých látek se děje rozlišnými mechanismy, které označujeme biotransformace. Podléhá jí naprostá většina xenobiotik, jen výjimečně se cizorodá látka vylučuje z těla bez chemické změny. Specializovaný obor, který studuje osud xenobiotik v těle a hlavně jejich biotransformace, se nazývá xenobiochemie.

Cizorodé látky se v těle metabolizují ve dvou fázích: fáze I – též nazývaná biotransformační – je etapa, v níž se do lipofilních látek zabudovávají nové funkční skupiny a fáze II, zvaná též konjugační.

Biotransformační enzymy mají většinou charakter induktivních enzymů, tj. po delším podávání určitého xenobiotika stoupne syntéza příslušného enzymu. Pro enzymy katalyzující biotransformace xenobiotik je dále charakteristická jejich nízká specifita; výhodou toho je pak schopnost podílet se na biotransformaci nových sloučenin, jež se v přírodě dosud vůbec nevyskytly. Enzymy, které se účastní biotransformace xenobiotik, mají své místo i v metabolismu endogenních sloučenin, např. steroidů a neesterifikovaných mastných kyselin.

Nejrozsáhlejší skupinou reakcí I. fáze jsou oxidace, méně časté jsou redukce a hydrolýza xenobiotik (Barnová et al. 1991). Výsledkem těchto reakcí je 1) farmakologická aktivace nebo inaktivace, 2) urychlení eliminace a/nebo 3) dodání reaktivní skupiny (Hines, McCarver 2002).

Hlavní rozdíl fáze II ve srovnání s fází I je její syntetický charakter. K syntéze je zapotřebí určitá endogenní složka. Reakce II. fáze zasahují do endogenního metabolismu a soutěží s endogenními látkami o společný enzym obsazením jeho

aktivního místa. Ze syntetického charakteru konjugací plyne i jejich endergonní charakter a závislost na dodávce energie. Konjugace výrazně zvyšuje polární charakter produktů; ten je obvykle tak vysoký a stupeň ionizace téměř úplný, že konjugát už není schopen pronikat do buněk a je efektivně vylučován (Barnová et al. 1991).

Reakce I. fáze:

- *Oxidační reakce*: C- a N-hydroxylace, N- a S-oxidace, dealkylace, deaminace, sulfoxidace a desulfurace,
- *Redukční reakce*: nitro- a azoredukce, redukce karbonylu, N-oxidů, sulfoxidů, dehalogenace
- *Hydrolytické reakce*: hydrolýza esterů, hydrolýza amidů

Reakce II. fáze:

- *Glukuronidace*:
- *Sulfatace*
- *Konjugace s aminokyselinami*
- *Konjugace s glutathionem*
- *Acetylace*
- *O-, N-, S-methylace* (Barnová et al. 1991)

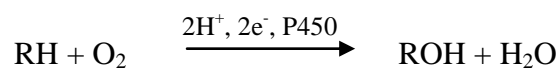
2.4.1 Cytochromy P450

Základním účelem metabolismu xenobiotik v těle je zvýšit rozpustnost látek ve vodě, a tak usnadnit exkreci. Běžná cesta metabolizace xenobiotik zahrnuje změnu funkční skupiny parentní molekuly přes cytochrom P450. Cytochromy P450 jsou monooxygenasy obsahující hem a jsou rozděleny do dvou základních skupin: steroidogenní a xenobiotické. Steroidogenní P450 byly nalezeny jak u prokaryont, tak v mitochondriích a v hladkém endoplazmatickém retikulu eukaryont. Tyto enzymy syntetizují steroidy a další látky nezbytné pro zachování integrity buněčné stěny a pro buněčnou specializaci. Xenobiotické P450 byly nalezeny v hladkém

endoplazmatickém retikulu eukaryont a metabolizují cizorodé biologické látky. Tyto P450 jsou zodpovědné především za oxidativní metabolismus xenobiotik.

Byl vytvořen klasifikační systém, ve kterém je každému cytochromu P450 přidělena rodina, podrodina a číslo (Preskorn, Harvey 2000). Cytochrom P450 se označuje písmeny „CYP“, následuje arabská číslice, písmeno a další arabská číslice (M.J.Cupp, T.S.Tracy 1998). Na příklad CYP2D6 znamená rodinu 2, podrodinu D a gen 6 (Preskorn, Harvey 2000).

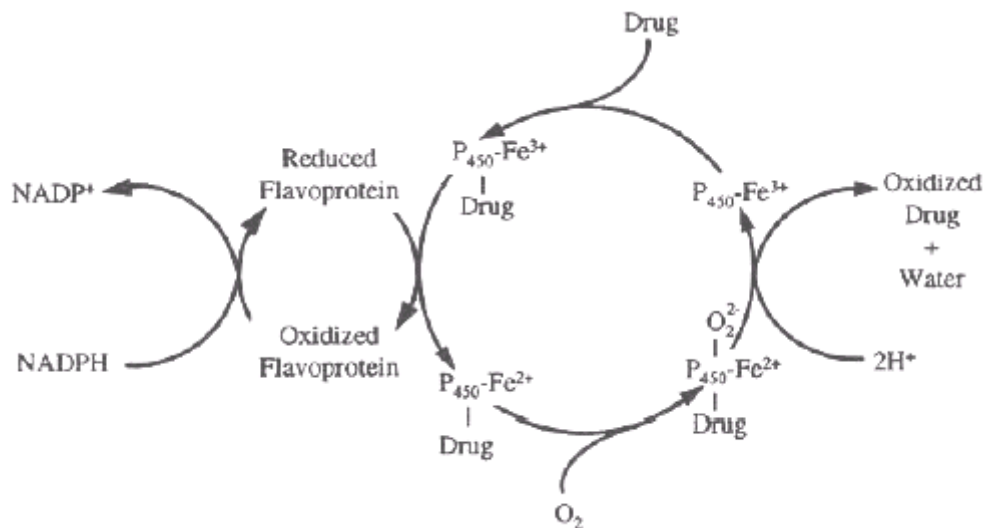
Isoenzymy cytochromu P450 užívají jako redukční činidlo nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) a atmosférický kyslík, kdy jeden atom molekulárního kyslíku vloží do substrátu a současně je druhý atom kyslíku redukován na vodu. Oxidační reakce katalyzované CYP se řídí následující stechiometrií:



kde RH reprezentuje oxidovatelný substrát a ROH je hydroxylovaný metabolit. Zpravidla hydroxylovaný metabolit (ROH) je více hydrofilní než parentní sloučenina (RH) a může být snadněji vyloučena z těla.

Mechanismus CYP katalýzy je složitý a pro oxidační reakci jsou potřebné určité kofaktory a koenzymy. Katalytický cyklus enzymu CYP450 (obr. 5) se skládá z následujících kroků:

1. substrát se reverzibilně váže na aktivní doménu enzymu CYP
2. železitý ion hemu je redukován na železnatý ion elektronem, který vzniká NADPH koenzym CYP reduktasou
3. molekulový kyslík se váže na komplex Fe^{2+}CYP – substrát
4. je rozštěpena vazba O – O druhým elektronem poskytnutým NADPH přes CYP reduktasu nebo cytochrom b_5
5. oxidace substrátu
6. uvolní se produkt z enzymu CYP (Yan, Caldwell 2001).



Obr. 5: Katalytický cyklus enzymu P450.

Enzymy P450 katalyzují oxidaci endogenních a exogenních substrátů u široké řady živočichů a rostlin, u savců představují hlavní obranu proti cizorodým sloučeninám. Avšak zdá se, že cytochrom P450 se u parazitických červů nevyskytuje. Pokusy detekovat cytochrom P450 spektrofotometricky v mikrosomální frakci *Moniezia expansa*, *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus* a *Heligmosomoides polygyrus* byly neúspěšné, stejně jako za použití indukce P450 chemickými induktory (Barrett 1997).

V této práci zaměřené na biotransformační enzymy motolice kopinaté byly měřeny tyto izoenzymy:

2.4.1.1 CYP1A

Tento enzym je nejvýznamnější z hlediska kontaminant životního prostředí. CYP1A1/2 je přítomen v játrech, plicích, kůži, střevní stěně a placentě. Je indukován polycyklickými aromatickými uhlovodíky, které byly nalezeny např. v cigaretovém kouři, dále rifampicinem, omeprazolem aj. léčivy. Inhibitorem je např. naftoflavon a některá léčiva (fluvoxamin, ofloxacin apod.). Nejvýznamnějšími substráty jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, kofein, theofylin, warfarin, ethoxyresorufin.

2.4.1.2 CYP3A

Členové podrodiny CYP3A jsou nejhojnější P450 u člověka, vyskytují se zejména v játrech, ale i ve střevě a ledvinách. Jsou nejvýznamnější v metabolismu léčiv. Substrátů je celá řada, např. acetaminofen, diltiazem, erytromycin, lidokain, testosteron, verapamil. Induktorem je rifampicin, karbamazepin fenobarbital. Inhibiční vliv má ketokonazol, ritonavir, grapefruitová šťáva (M. J. Cupp, T.S.Tracy 1998).

2.4.2 Redukční enzymy

Redukčních enzymů je celá řada, např. alkoholdehydrogenasa, aldo-ketoreduktasy, dihydrodioldehydrogenasy, cytochrom P450, NADPH-cytochrom P450-reduktasa, xantinoxidasa, aldehydoxidasa, glutathionreduktasa, peroxidasy. Tato studie je zaměřena na redukčními enzymy, které redukují karbonylovou skupinu a o těchto enzimech bude dále pojednáno.

Je dobře známo, že různé farmakologicky důležité látky podstupují během biotransformace reduktivní reakce. Reduktasy se také účastní biotransformačních cest několika veterinárních léčiv (např. halothanu, nitroimidazolů, nitrofuranů, chloramfenikolu, atd.). Redukce je také významným krokem 1. fáze biotransformace řady aromatických, alicyklických a alifatických sloučenin nesoucích karbonylovou skupinu (Szotáková et al. 2004).

Karbonylové sloučeniny jsou široce rozšířeny v přírodě a představují opravdovou hrozbu pro žijící organismy, protože jsou schopny reagovat s buněčnými makromolekulami. Aldehydy a ketony jsou škodlivé pro buňku, protože se mohou kovalentně vázat se sekundárními aminoskupinami a thiolovými skupinami proteinů. Určité aldehydy jsou mutagenní díky schopnosti interagovat s DNA.

V buňce je ochrana proti reaktivním karbonylovým sloučeninám zajištěna několika rodinami detoxifikačních enzymů, zahrnující aldo-ketoreduktasy (AKR), aldehyddehydrogenasu, aldehydoxidasu, alkoholdehydrogenasu a glutathion-S-transferasu (O'Connor 1999).

Reduktasy karbonylu jsou enzymy schopné přeměňovat širokou paletu karbonylových sloučenin na odpovídající alkoholy. Existují tři nadrodiny

oxidoreduktas, které katalyzují oxidaci a redukci široké řady alkoholických a aldehydických sloučenin fyziologického nebo farmakologického významu:

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

K MDR se řadí rodina alkoholdehydrogenas (ADH) tvořící komplexní systém seskupený do několika tříd. ADH1 je klasický enzym zodpovědný za metabolismus ethanolu v játrech. ADH2 je jaterní enzym, který přispívá k metabolismu ethanolu a retinoidu. ADH3 je glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa. ADH7 byla popsána jen u kuřecích embryí a ADH8 je NADP(H)-dependentní forma popsána u obojživelníku (Crosas et al. 2001).

SDR jsou rozpustné proteiny, nejčastěji diméry nebo tetramery, obsahující přibližně 270 aminokyselin na monomer a charakterizované katalytickou triádou (Ser, Tyr a Lys) v aktivním místě. AKR jsou většinou monomerní, NAD(P)H dependentní enzymy, o délce asi 320 aminokyselin s aktivním místem obsahujícím tetradu Tyr, His, Asp a Lys.

Karbonyl redukující enzymy dokážou přijímat strukturálně odlišné substráty (jak endogenní látky, tak xenobiotika), ale lze je rozlišit podle substrátů a jejich specifických inhibitorů.

Karbonylové reduktasy byly zjištěny u různých organismů, ale většinou je výzkum prováděn na savčích buňkách a tkáních. Jejich podstatná role spočívá v ochraně proti poškození hromaděním toxických karbonylových sloučenin, tedy tyto enzymy se podílejí na detoxikačních procesech (Combourieu et al. 2004).

Nadrodinu AKR lze na základě sekvenční podobnosti rozdělit do sedmi rodin (AKR1 – AKR7) díky poznatkům získaných z molekulárního klonování. Znalost biochemických vlastností a fyziologických úloh těchto reduktas nedrží krok s pokusy molekulárního klonování. Nejlépe popsané AKR enzymy jsou aldehydreduktasa (AKR1A1) a aldoreduktasa (AKR1B1). AKR1A1 přednostně katalyzuje NADPH-dependentní redukci alifatických aldehydů, aromatických aldehydů a biogenních aminů, kdežto AKR1B1 lépe katalyzuje NADPH-dependentní redukci aldopentos a aldohexos. Méně dobře je porozuměno dihydrodioldehydrogenasám (DD), které

katalyzují oxidaci *trans* – dihydrodiolů polycyklických aromatických uhlovodíků, steroidních hormonů a žlučových kyselin. U člověka existují alespoň čtyři různé izoenzymy DD, a to AKR1C1 (tzv. DD1 nebo-li 20 α -hydroxysteroiddehydrogenasa (HSD)), AKR1C2 (tzv. DD2 nebo žlučové kyseliny vázající protein), AKR1C3 (tzv. typ II 3 α -HSD) a AKR1C4 (DD4 nebo-li typ I 3 α -HSD) (O'Connor et al. 1999).

Nejhojnější rodina (AKR1) obsahuje aldoreduktasy, aldehydreduktasy a hydroxysteroiddehydrogenasy. Ostatní rodiny zahrnují prokaryotické AKR, rostlinné chalkonreduktasy, aflatoxin B1 aldehydreduktasu. Podrodiny jsou rozeznatelné na hladině 60 % aminokyselinové identity. Rodina AKR1 zahrnuje pět podrodin:

A – aldehydreduktasy (savčí), AKR1A

B – aldoreduktasy

C – hydroxysteroiddehydrogenasy

D – Δ^4 -3-ketosteroid-5 β reduktasy

E – aldehydreduktasy (rostlinné)

Označení aldo-ketoreduktas obsahuje základní symbol „AKR“, arabskou číslici představující rodinu, písmeno označující podrodinu a další arabská číslice reprezentuje jedinečnou proteinovou sekvenci (Jez et al. 1997).

Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) je rozsáhlá skupina enzymů s NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasovou aktivitou. Karbonylreduktasy (CR) hrají důležitou roli v metabolismu léčiv, jako např. daunorubicinu, metyraponu, acetoheksamidu.

Monomerní karbonylreduktasy (EC 1.1.1.184) patří k SDR a jsou zahrnuty v metabolických procesech xenobiotik (warfarinu, fenofibrátu, nitrosaminu), prostaglandinů steroidů (Terada T. 2000).

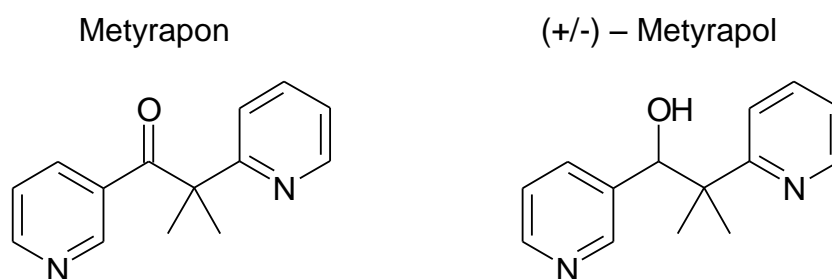
Aktivity reduktas byly testovány použitím následujících substrátů: metyrapon, DL-glyceraldehyd, daunorubicin, acenaphtenol a oracin.

2.4.2.1 Metyrapon

Metyrapon (2-methyl-1,2-di-3-pyridylpropan-1-on) je z farmakologického hlediska diagnostikum. Metyrapon inhibuje syntézu adrenokortikosteroidů inhibicí 11 β -hydroxylace v kůře nadledvin. Zrušení zpětné inhibiční vazby kortisolem má za

následek zvýšenou produkci ACTH hypofýzou. Trvalá blokáda enzymatického kroku, řídícího produkci kortisolu a kortikosteronu, vyvolá výrazné zvýšení adrenokortikální sekrece a jejich bezprostředních prekurzorů, 11-desoxykortikosterolu a desoxykortikosteronu, které jsou jen slabými inhibitory sekrece ACTH. Tomu pak odpovídá zvýšení plazmatických hladin těchto steroidů a jejich metabolitů v moči. Metyrapon je využíván jako diagnostikum latentní nedostatečnosti ACTH; hyperfunkce kůry nadlečin u Cushingova syndromu a jako doplňková terapie onemocnění, která jsou doprovázena nadprodukcí glukokortikoidů a mineralokortikoidů (AISLP).

Metyrapon, aromatický keton, je redukován v jeho ketonické funkční skupině na odpovídající alkoholický metabolit metyrapol (obr. 6). Tato biotransformace je zprostředkována karbonylreduktasou (EC 1.1.1.184) a aldehydreduktasou (EC 1.1.1.2), jak ukazuje použití specifických inhibitorů. Studie redukce metyraponu provedené na klidových buňkách *Mycobacterium aurum* v přítomnosti kvercetrinu nebo fenobarbitalu ukázaly, že oba inhibitory mají vliv na biotransformaci metyraponu. Kvercetrin indikuje značnou spoluúčast karbonylreduktasy (SDR) a fenobarbital indikuje účast aldehydreduktasy při redukci metyraponu. Tvorba metyrapolu se děje v přítomnosti buď NADPH nebo NADH jako kofaktoru (Combourieu et al. 2004).

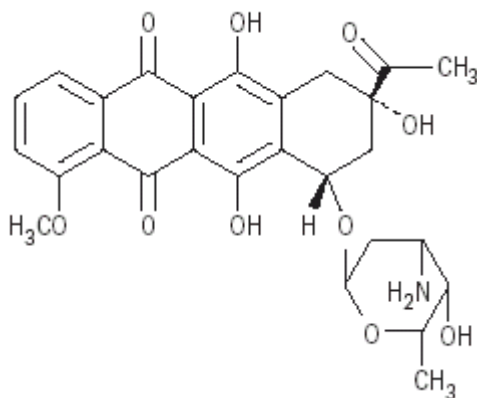


Obr. 6: Struktura metyraponu a jeho metabolitu metyrapolu.

2.4.2.2 Daunorubicin

Daunorubicin (obr. 7) je antracyklinové antibiotikum izolované ze *Streptomyces ceruleorubidus*. Je to červený krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě. Využívá se k terapii akutní leukémie u dětí i dospělých.

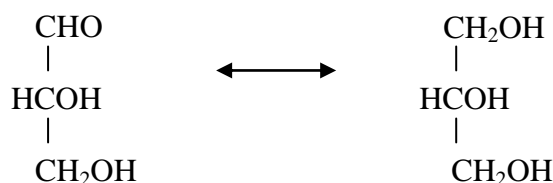
Daunorubicin je metabolizován především cytosolickými reduktasami karbonylu na C13-ol metabolit. Karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184), DD2 (EC 1.3.1.20) vykazují redukční aktivitu při pH 6,0 a aldehydreduktasa ALR1 (EC 1.1.1.2) vykazuje aktivitu při pH 8,5 (Schröterová et al. 2004).



Obr. 7: Struktura daunorubicinu.

2.4.2.3 DL-glyceraldehyd

DL-glyceraldehyd je endogenní substrát redukovaný v cytosolu většiny savčích orgánů na glycerol aldehydreduktasou AKR1A.

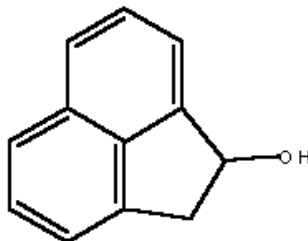


Obr. 8: Redukce DL-glyceraldehydu na glycerol.

2.4.2.4 Acenaphtenol

Acenaphtenol (1,2-dihydroacenaphthylen-1-ol) je substrátem enzymů AKR1C1 AKR1C4. AKR1C mají buď extrémně nízkou nebo nedetekovatelnou reduktasovou aktivitu u většiny dikarbonylů, aromatických a alifatických aldehydů, ketonů. Avšak ukázalo se, že mohou katalyzovat oxidaci 1-acenaphtenolu. Nízká katalytická aktivita AKR1C enzymů a jejich omezené rozšíření v lidských tkáních ukazuje, že snad zaujmají specifické detoxikační reakce, které se odlišují od ostatních členů

nadrodiny AKR. Je možné, že lidské jaterní AKR1C4 a AKR1C1 přítomné v játrech, ledvinách a varlatech inaktivují a udržují správné hladiny steroidních hormonů (O'Connor et al. 1999).



Obr. 9: Struktura acenaphtenolu.

2.4.2.5 Oracin

Oracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin, je slibné cytostatikum pro orální podání, které je již v II. fázi klinického zkoušení. Hlavním metabolitem oracinu je 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5-oxo-11-hydroxy-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin (DHO). Tento chirální metabolit je tvořen redukcí karbonylové skupiny v pozici 11 molekuly.

Xenobiotika obsahující karbonyl jsou u savců redukovány pyridin nukleotid-dependentní reduktasou. Tyto enzymy mohou být funkčně rozlišeny použitím modelových substrátů a jejich citlivosti k specifickým inhibitorům.

Ačkoliv cytochrom P450 je znám především pro monooxygenasovou katalýzu, je také nezbytné vzít v úvahu jeho schopnost katalyzovat redukcí xenobiotik, určité xenobiotika mohou přijímat elektrony z redukčního komplexu $[\text{Fe}^{2+}\text{-P450}]$ v nepřítomnosti kyslíku. Klasické inhibitory P450 jsou také potencionální inhibitory reduktasové aktivity, které buď kompetují s xenobiotiky v katalytickém místě P450 nebo se vážou přímo na kov hemu, tím inhibují tok elektronu ke xenobiotiku.

Několik studií popsalo inhibiční efekt 18 β -glycyrrhetinové kyseliny na enzymy metabolizující steroidy, jako je 5 α -reduktasa, 5 β -reduktasa, 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa, 3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa a odhalily, že 18 β -glycyrrhetinová kyselina silně inhibuje aktivitu těchto enzymů (Szotáková et al. 2000).

11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa (11 β -HSD, EC 1.1.1.146) se účastní u oracinu redukce karbonylu v mikrosomální frakci jater potkana. 11 β -HSD je mikrosomální

enzym, jehož fyziologická úloha spočívá v reversibilní oxidoredukci glukokortikoidů. Navíc se 11 β -HSD ukazuje jako multifunkční enzym, který katalyzuje redukci nesteroidních karbonylových sloučenin, tím se podílí na detoxikaci různých aldehydů a ketonů (Wsól et al. 2004).

Redukce karbonylu biologicky a farmakologicky aktivních karbonylových sloučenin odpovídající alkoholům je především zprostředkována cytosolickými NADPH-dependentními enzymy. Cytosolická karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184) hraje pozoruhodnou úlohu v redukci karbonylu xenobiotik a je specificky inhibována quercetrinem. Karbonylreduktasa je široce rozšířena v tkáních člověka a jiných savců, katalyzuje NADPH-dependentní redukci různých karbonylových sloučenin.

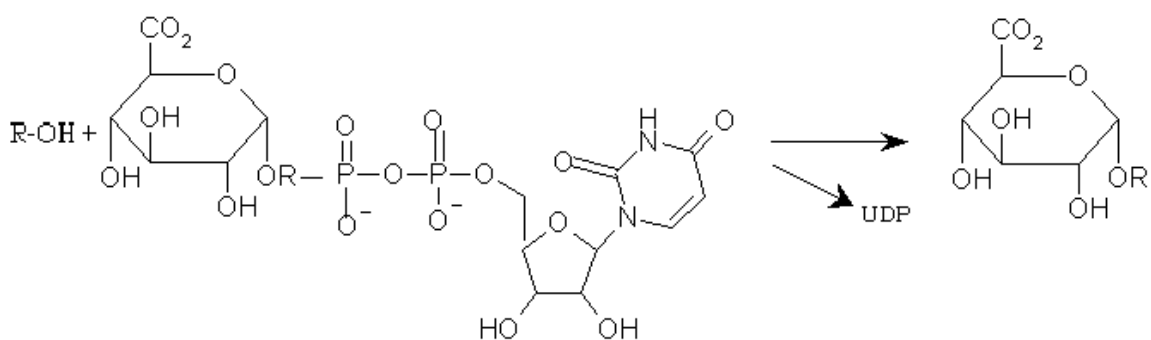
Ve studiích bylo zjištěno, že cytochrom P450 hraje jen nepodstatnou roli v redukci oracinu, což podnítilo hledání jiných NADPH-dependentních enzymů. 18 β -glycyrrhetinová kyselina, inhibitor HSD, byla použita ke zhodnocení zapojení HSD v redukci oracinu. Steroidní sloučenina 18 β -glycyrrhetinová kyselina je silným inhibitorem karbonyl redukce oracinu. Jak lze vidět z chemické struktury kortisonu a 11-dehydrokortisonu, pozice karbonylové skupiny (C 11) je velmi podobná té u oracinu, který má také karbonylovou skupinu na C 11. Z tohoto hlediska se zdá být oracin dobrým substrátem pro 11 β -HSD. Hlavním mikrosomálním enzymem, který katalyzuje karbonyl redukci oracinu, je pravděpodobně 11 β -HSD. Cytosol se také účastní redukce oracinu a zdá se, že enzymem zodpovědným za tvorbu DHO v cytosolické frakci jater potkana, je karbonylreduktasa (Szoťáková et al. 2000).

2.4.3 Konjugační enzymy

2.4.3.1 UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)

UDP-glukuronosyltransferasy jsou integrální proteiny s hlavní částí proteinu obsahující katalytickou doménu lokalizovanou v lumen endoplazmatického retikula. Oblast 15 – 20 aminokyselin C-konce je upevněna v membráně endoplazmatického retikula. Předpokládá se, že aglykon vázající místo je na N-konci polypeptidu UGT, které je v oblasti proteinu, jež vykazuje největší variabilitu mezi UGT isoenzymy. UDP-glukuronovou kyselinu vázající doména je ve vysoce konzervativní polovině C-konce proteinu (Coffman et al. 1997).

UDP-glukuronosyltransferasy jsou rodinou enzymů 2. fáze metabolismu, které katalyzují konjugaci xenobiotik s glukuronovou kyselinou a vznikají glukuronidy (obr. 10). Tyto konjugáty směřují ke snížení biologické aktivity, ke snížení distribuce a zvýšení exkrece z těla (Laura J. Webb et al. 2004). Kofakorem UGT je uridindifosfátglukuronová kyselina. Substrátem jsou xenobiotika, např. dextromorfan, morfin, p-nitrofenol, nesteroidní antiflogistika, ale i eobiotika, např. bilirubin a steroidní hormony. Jsou čtyři skupiny konjugačních reakcí s glukuronovou kyselinou: O-, N-, S- a C- glukuronidace. Vzniklé produkty jsou dobře rozpustné ve vodě a snadno eliminovatelné z organismu (Davit 2001).



Obr. 10: Schéma konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou.

2.4.3.2 Glutathion-S-transferasa (GST)

Glutathion-S-transferasa (GST) je enzym katalyzující konjugaci s glutathionem. Glutathion (GSH) je tripeptid tvořený glycinem, cysteinem a glutamovou kyselinou. Substráty pro konjugaci s glutathionem mohou být sloučeniny se silně elektrofilní skupinou (halogenidová, sulfonová, sulfonátová, fosfátová, nitro skupina), sloučeniny s dvojnou vazbou mezi uhlíky a arenoxidy a epoxidy, kde dochází k adici GSH (Davit 2001).

Glutathion-S-transferasy jsou všudypřítomné, multifunkční proteiny, které se účastní detoxikace endogenních a cizorodých sloučenin. Některé z těchto transferas mají také specifickou úlohu vázat a transportovat ligandy, jako např. žlučové kyseliny, hematin a mastné kyseliny. Glutathion-S-transferasy byly rozsáhle zkoumány u parazitických červů s ohledem na jejich biochemii. Zdá se, že tyto proteiny jsou hlavním detoxikačním systémem II. fáze a není důkaz o přítomnosti na kyslíku závislého P450 systému (obvykle hlavní detoxifikační systém I. fáze v organismu) u

dospělých červů. Hlavní biologická role glutathion-S-transferas helmintů zahrnuje detoxikaci xenobiotik a ligand vázající/transportní funkce. Navíc účinně neutralizují cytotoxické produkty vznikající z reaktivních kyslíkatých sloučenin (ROS), což poskytuje důkaz, že GST mají schopnost chránit parazita proti imunologické odpovědi hostitele.

Seřazení primární aminokyselinové sekvence GST helmintů v porovnání se savčími GST ukázalo, že v parazitech jsou glutathion-S-transferasy reprezentovány nesavčími nadrodinami. Ze sekvenční analýzy bylo usouzeno, že existuje několik nadrodin glutathion-S-transferas červů. Helminté se silně spoléhají na detoxikační systém GST, který má oproti hostiteli strukturální rozdíly a je pravděpodobně důležitý pro rozvinutí chronické infekce (Brophy et al.).

2.5 Flubendazol

Flubendazol je p-fluorovaný analog mebendazolu, tj. methyl-(5-(4-fluorobenzoyl)-1-H-benzimidazol-2-yl)karbamát. Jedná se o anthelmintikum ze skupiny benzimidazolu s širokým spektrem účinku proti hlísticím a tasemnicím. Benzimidazoly jsou relativně pomalu působící anthelmintika. Biologická dostupnost flubendazolu a anthelmintický účinek závisí méně na koncentraci účinné látky, jako spíše na perzistenci hladiny účinné látky v gastrointestinálním traktu a plazmě hostitele. Předpokladem pro úplnou účinnost je také dostatečně dlouhá doba kontaktu s parazitem. U přežvýkavců je účinnost všeobecně vyšší než u monogastrických zvířat, zejména masožravců a to díky delšímu zadržování látky v batoru a slepém střevě. Krátká střevní pasáž u masožravců podmiňuje nízkou biologickou dostupnost.

Účinek benzimidazolů se zakládá na vazbě k tubulinu buněk parazita. Tubulin je bílkovinná podjednotka cytoplazmatických mikrotubul a skládá se z α a β tubulinu. Tato dimerní molekula se formuje do polymerů – mikrotubul. Mikrotubuly jsou rozhodující strukturou buněk helminta. Mezi mikrotubuly a diméry tubulinu existuje dynamická rovnováha, která je kontrolována řadou endogenních regulačních proteinů a kofaktorů. Tato rovnováha může být porušena určitými exogenními látkami, tzv. mikrotubulinovými inhibitory (např. benzimidazoly). Vazbou na volný tubulin bude polymerizace tubulinu na mikrotubuly inhibována. Dochází ke snížení

příjmu a intracelulárního transportu živin a substrátu. Zejména snížený příjem glukózy vede k vyhladovění parazita. Po vyčerpání zásob parazit odumírá a je za 2 – 3 dny vyloučen. Flubendazol má také ovicidní účinek.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je:

- Stanovit aktivity oxidačních enzymů u parazita *Dicrocoelium dendriticum*
- Stanovit aktivity redukčních enzymů u *D. dendriticum*
- Stanovit aktivity konjugačních enzymů u parazita *D. dendriticum*
- Určit kinetiku glutathion-S-transferasy
- Zjistit, zda parazit *D. dendriticum* biotransformuje flubendazol

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL, CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE

4.1.1 Biologický materiál

K pokusům byly použity subcelulární frakce A, B, C z motolic. Motolice byly rozváženy po 3,80 g a bylo přidáno 12 ml 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4, poté byla provedena homogenizace. Homogenát byl přelit do kyvet a provedla se první centrifugace (centrifuga Heraeus, program 3, tj. 20 min. na 5000 g při 4°C). Supernatant byl přelit do čistých kyvet a byla provedena centrifugace na 20 000 g, po dobu 60 min. při 4°C (program 4) v téže centrifuze.

Supernatant z 2. centrifugace byl přelit do centrifugačních kyvet, které byly vloženy do rotoru ultracentrifugy Beckman, přístroj byl naprogramován na 105 000 g na 60 min.

K peletě z 2. centrifugace byly přidány 3 ml sodnofosfátového pufru pH 7,4 a opět byla provedena centrifugace v centrifuze Heraeus, program 4. Peleta byla resuspendována v glycerolovém pufru a takto byla získána **frakce A**. Tato frakce při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje převážně mitochondrie.

Supernatant z centrifugy Beckman je **frakce B**. Tato frakce při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje převážně cytosol. Peleta z této centrifugace byla resuspendována v sodnofosfátovém pufru pH 7,4 a znovu vložena do centrifugy Beckman, supernatant byl vylit a k peletě přidán pufr s 20% (v/v) glycerolu, tj. **frakce C**. Tato frakce při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje převážně mikrosomy.

Tyto frakce byly zmrazeny a uchovávány při -80°C v hlubokomrazícím boxu.

4.1.2 Chemikálie

- 1-chlor-2,4-dinitrobenzen
- Acenaphtenol
- Benzyloxyresorufin (BROD)
- Daunorubicin
- Dimethylsulfoxid

- DL-glyceraldehyd
- Draselno-fosfátový pufr 0,1 M pH 6,0
- Ethoxyresorufin (EROD)
- Flubendazol
- Glutathion redukovaný
- Hovězí sérový albumin (BSA)
- Metyrapon
- Mg Cl₂ 250 mM
- MgCl₂ 0,1 M
- NADPH
- Oracin
- p-nitrofenol
- Testosteron
- Tris pufr 0,1 M pH 8,9
- Tris-HCl pufr 0,1 M pH 7,4
- Tris-HCl pufr 0,2 M pH 8,5
- UDP-glukuronová kyselina

4.1.3 Přístroje

- Laboratorní předvážky OWA Labor
- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Digitální pH – metr Jenway LTD 3020
- Ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus Bandelin HD 2070
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- Ultracentrifuga Sorvall OTD Combi
- Laboratorní magnetická míchačka IKA Color Squid Hytrel HTR 8068
- Čtečka Biorad, Microplate Leader, model 550
- UV – VIS spektrofotometr Unicam Helios β
- Luminiscenční spektrofotometr Perkin Elmer LS 50 B
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC)
- Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf

4.2 PRACOVNÍ POSTUP

4.2.1 BCA STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY

Metoda je založena na reakci aminokyselin vázaných v bílkovinách s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která redukuje BCA (bicinchonovou kyselinu) za vzniku fialového zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství bílkoviny a měří se spektrofotometricky pomocí čtečky Biorad při 562 nm. Koncentrace bílkoviny ve vzorku se získá z kalibrační přímky.

Byly připraveny roztoky:

Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1M NaOH

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

Roztok C: připraven smícháním 50 dílů roztoku A s 1 dílem roztoku B

Kalibrační křivka:

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). V den potřeby byl připraven 1% roztok (0,25025 g BSA se doplnilo do 25 ml redestilovanou vodou). Z tohoto základního roztoku bylo naředěním připraveno šest roztoků (viz tabulka 1), které byly použity pro sestavení kalibrační křivky.

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

	Koncentrace BSA [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Roztok 1% BSA [μl]	Destilovaná voda [μl]
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Pro vlastní stanovení bílkoviny byly jednotlivé subcelulární frakce naředěny 10x redestilovanou vodou. Byla připravena dvě ředění a z každého ředění byly připraveny čtyři paralelní vzorky, tedy osm paralelních měření pro každou frakci.

Do každé jamky na destičce bylo pipetováno 10 µl vzorku bílkoviny (roztok BSA nebo naředěné frakce A, B, C) a 200 µl pracovního roztoku C. Do první jamky byla napipetována pouze redestilovaná voda. Po promíchání se inkubovalo při 37°C po dobu 30 minut. Pak byla na fotometrické čtečce Biorad změřena absorbance při 562 nm proti destilované vodě. Od hodnot absorbance vzorků byl odečten průměr hodnot absorbance slepých vzorků.

4.2.2 STANOVENÍ AKTIVITY OXIDAČNÍCH ENZYMŮ

4.2.2.1 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)

Metoda EROD se využívá ke stanovení aktivity isoformu CYP1A. Je založena na přidání substrátu ethoxyresorufinu, relativně specifického pro tuto podrodinu, k mikrosomální frakci. CYP1A oxidačně dealkyluje tento substrát na fluoreskující produkt – resorufin a přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru.

Reakční směs:

- 885 µl pufr 0,1 M Tris-HCl pH 7,4
- 50 µl kofaktor 0,1 M MgCl₂
- 5 µl substrát 0,5 mM v DMSO (dimethylsulfoxid)
- 10 µl NADPH 50 mM v Tris pufru (0,4 mg NADPH/vzorek)
- 50 µl frakce C
- 10 µl standardní přídavek resorufinu 0,34 µM

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml.

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

Vlnová délka excitační: 530 nm

Vlnová délka emisní: 585 nm

Excitační štěrbina: 10nm

Emisní štěrbina: 20 nm

Teplota: 37°C

Délka inkubace: 180 s

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

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

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

Pro výpočet aktivity platí vzorec:

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

a...aktivita

k...směrnice

A...intenzita fluorescence na začátku přídávku resorufinu

B...intenzita fluorescence na konci přídávku resorufinu

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

D...zředění

60..přepočet na minuty

Vztažením aktivity na 1 mg bílkoviny lze získat specifickou aktivitu enzymu [pmol/mg/min].

4.2.2.2 Stanovení aktivity benzyloxy-O-dearylasu (BROD)

Metoda BROD se využívá ke stanovení aktivity isoformem CYP3A, CYP2B. Je založena na přidání substrátu benzyloxyresorufinu, relativně specifického pro isoformu CYP3A a CYP2B, k mikrosomální frakci. CYP3A, CYP2B oxidují tento substrát na fluoreskující produkt – resorufin. a přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru.

Reakční směs:

- 885 µl pufr 0,1 M Tris-HCl pH 7,4
- 50 µl kofaktor 0,1 M MgCl₂
- 5 µl substrát 0,5 mM v DMSO (dimethylsulfoxid)
- 10 µl NADPH 50 mM v Tris pufru (0,4 mg NADPH/vzorek)
- 50 µl frakce C
- 10 µl standardní přídavek resorufinu 0,34 µM

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml.

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

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

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

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

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

Pro výpočet aktivity platí vzorec:

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

a...aktivita

k...směrnice

A...intenzita fluorescence na začátku přidavku resorufinu

B...intenzita fluorescence na konci přidavku resorufinu

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

D...zředění

60..přepočet na minuty

Vztažením aktivity na 1 mg bílkoviny lze získat specifickou aktivitu enzymu [pmol/mg/min].

4.2.2.3 Stanovení aktivity testosteronhydroxylasy (TOH)

Metoda je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s testosteronem a následné extrakci a HPLC stanovení metabolitů testosteronu.

Inkubace:

- 370 μ l fosfátového pufru 0,1 M pH 7,4
- 10 μ l $MgCl_2$ 250 mM
- 100 μ l frakce B, resp. C
- 10 μ l NADPH 15 mM

Do označených mikrozkušavek byly napipetovány jednotlivé složky reakční směsi a poté byla provedena preinkubace při 37°C po dobu 5 minut za stálého třepání (byl použit termoblok s nástavcem na 1,5 ml mikrozkušavky). Reakce se startuje přidavkem 10 μ l testosteronu v methanolu (původní koncentrace 50 mM). Mikrozkušavky byly ihned promíchány a inkubovány 15 min. při 37°C. Bylo nutné dodržovat přesný čas inkubace. Reakce byla zastavena přidáním 0,7 ml chlazeného CH_2Cl_2 (-24°C) a promícháním. Dále bylo ke vzorku přidáno 10 μ l 0,9 mM kortikosteroidu v methanolu jako vnitřní standard. Po intenzivním třepání v Thermobloku (3 minuty, stupeň 5) a centrifugaci (10 min. při 5000 ot./min.) byla odebrána organická (spodní) vrstva a přenesena do vialky. K vodné fázi bylo přidáno 0,5 ml CH_2Cl_2 a znovu provedeno třepání a centrifugace. Organická fáze (spodní) byla odebrána a přenesena do vialky. Organická fáze ve vialce byla odpařena na

koncentrátoru při 60°C. Po odpaření byly vialky zavíčkované a uschovány v chladu a temnu do doby než byly použity k měření na HPLC.

HPLC podmínky:

Autosampler: Hewlett-Packard 1100
Kolona: ODS Hypersil C18 (4 x 125 mm)
Detektor: SPD – 10A VP Schimadzu
Detekce: při 254 nm
Nástřik: 20 µl
Čas: 40 min.
Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
Mobilní fáze: A: 75 ml THF
600 ml MeOH
325 ml H₂O
B: 75 ml THF
925 ml H₂O

Průtok mobilní fáze: 30 % A + 70 % B, lineární změna poměru na 100:0

Probublávat heliem.

Pro výpočet aktivity platí vztah:

$$a = (x / 15) * D$$

a...aktivita

x...množství metabolitu ve vzorku

15..doba inkubace (min)

D...zředění

Převedením aktivity na 1 mg bílkoviny lze získat specifickou aktivitu enzymu [nmol/mg/min]

4.2.3 STANOVENÍ AKTIVITY REDUKČNÍCH ENZYMŮ

4.2.3.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP^+ $\epsilon=6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas.

Reakční směs v kyvetě: 930 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,0)
10 μl substrátu (1 mM)
10 μl NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM
50 μl enzymu

Po přidání každé složky do kyvety byla reakční směs promíchána. Pro stanovení byl použit draselno-fosfátový pufr připravený sléváním jednotlivých složek (300 ml 0,1 M K_2HPO_4 a 300 ml 0,1 M KH_2PO_4) při laboratorní teplotě za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru do požadované hodnoty pH pufru. Zásobním roztokem substrátu byl vodný 0,1M roztok metyraponu ($M_r = 226$). První tři složky tvořily slepý vzorek (bez enzymu), na který byl spektrofotometr Helios β vynulován. Reakce byla odstartována přidáním enzymu, je nutno směs promíchat. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Helios β při 340 nm vždy v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.3.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 6,0)

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP^+ $\epsilon=6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas.

Reakční směs v kyvetě: 930 μ l draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
10 μ l substrátu (0,01 mM)
10 μ l NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM
50 μ l enzymu

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1 ml. Zásobním roztokem substrátu byl 1mM vodný roztok daunorubicinu ($M_r = 564$).

Vždy po přidání jedné ze složek do kyvety byla reakční směs promíchána několikerým převrácením kyvety uzavřené parafinem a protřepáním. První tři složky tvořily slepý vzorek na který byl Helios β vynulován. Reakce byla odstartována přidáním enzymu. Hodnoty absorbance se odečítaly v čase 0 minut a 4 minuty při 340 nm. Stanovení bylo provedeno ve třech paralelních měřeních.

4.2.3.3 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno, podobně jako u výše uvedených, na proměření poklesu absorbance při 340nm způsobeném přeměnou NADPH na $NADP^+$.

Reakční směs v kyvetě: 930 μ l draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
10 μ l substrátu (10 mM)
10 μ l NADPH (0,3 mM) – zásobní roztok 30 mM
50 μ l enzymu

Objem reakční směsi byl vždy 1 ml. Zásobním roztokem substrátu byl 1M roztok DL-glyceraldehydu ($M_r = 90,08$) v dimethylsulfoxidu. Po přidání každé složky byl obsah kyvety řádně promíchán. První tři složky tvoří slepý vzorek (pufr, substrát, NADPH), na který byl spektrofotometr Helios β nulován. Reakce byla odstartována přidáním enzymu. Hodnoty absorbance byly odečítány v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.3.4 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 8,5)

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP⁺ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP⁺ $\epsilon=6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas.

Reakční směs v kyvetě: 930 μl TRIS – HCl pufru (0,2 M; pH 8,5)
10 μl substrátu (0,01mM)
10 μl NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM
50 μl enzymu

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1 ml. Pro stanovení byl použit TRIS-HCl pufr (0,2M; pH 8,5) připravený sléváním jednotlivých složek (100 ml TRISu a 22,4 ml 0,2M HCl) při laboratorní teplotě za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru do požadované hodnoty pH pufru. Zásobním roztokem substrátu byl 1mM vodný roztok daunorubicinu ($M_r = 564$).

Pufr, substrát a NADPH tvořily slepý vzorek, na který byl spektrofotometr vynulován. Po přidání každé ze složek byla reakční směs řádně promíchána. Reakce byla vždy odstartována přidáním enzymu. Hodnoty absorbance byly odečítány v čase 0 minut a 4 minuty, stanovení bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.3.5 Stanovení aktivity reduktas acenaphtenolu

Stanovení aktivity acenaphtenolreduktas je založeno na měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP⁺ na NADPH ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty.

Reakční směs v kyvetě: 930 μl TRIS pufru (0,1 M; pH 8,9)
10 μl substrátu (1mM)
10 μl NADP⁺ (1 mM) – zásobní roztok 100 mM
50 μl enzymu

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml. Pro stanovení byl použit TRIS pufr (0,1 M; pH 8,9) připravený sléváním jednotlivých složek (100 ml TRISu a 0,1M HCl) při laboratorní teplotě za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru. Zásobním roztokem substrátu byl 0,1 M roztok acenaphtenolu ($M_r = 170,2$) v DMSO.

První tři složky (pufr, substrát, NADP^+) tvořily slepý vzorek, na který byl spektrofotometr vynulován. Po přidání každé ze složek byla směs řádně promíchána. Reakce byla odstartována přidáním enzymu. Hodnoty absorbance byly odečítány v čase 0 minut a 4 minuty, stanovení bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

Získané rozdíly absorbancí v čase 0 a 4 minuty u výše uvedených enzymů byly převedeny na změny absorbancí za minutu. Vztažením aktivity na mg bílkoviny byla získána specifická aktivita.

4.2.3.6 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu

Metoda je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s oracinem a následné extrakci a HPLC stanovení jeho metabolitu dihydrooracinu.

Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala:

- 0,4 μmol (0,15 mg) oracinu
- 0,6 μmol NADPH
- 0,1 ml frakce B, resp. C

Do označených mikrozkušavek bylo napipetováno

- 0,1 ml zásobního roztoku oracinu
- 0,05 ml roztoku NADPH nebo redestilované vody (slepý vzorek)
- 0,05 ml redestilované vody

Směs byla preinkubována 5 minut při 37°C . Poté bylo do mikrozkušavek připipetováno 0,1 ml frakce B, příp. C a reakční směs byla promíchána. Inkubace (při 37°C) byla ukončena po 30 minutách ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni a přidáním 30 μl amoniaku naředěného 1:3 redestilovanou vodou o pH 10,5 – 10,8. Ke směsi bylo přidáno 0,7 ml octanu ethylnatého a intenzivně třepáno 2 minuty

na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách, poté byla horní vrstva byla přenesena do připravené vialky. Vytřepávání bylo zopakováno a spojené extrakty byly odpařeny v koncentrátoru. Suché vzorky byly uschovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí HPLC.

HPLC podmínky:

Autosampler:	Hewlett Packard 1100
Kolona:	ODS Hypersil C18 (4 x 250 mm)
Detekce:	Ex 340 nm Em 418 nm
Průtok mobilní fáze:	1,5 ml min ⁻¹
Tlak:	21 MPa
Mobilní fáze:	hexasulfonátový pufr (pH 3,27) a acetonitril (75:25)

Výpočet aktivity byl proveden na základě množství dihydrooracinu ve vzorku, byla zohledněna doba inkubace a zředění.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = x/30 * D \quad [\text{nmol/ml/min}]$$

a..... aktivita

x..... množství dihydrooracinu ve vzorku

30....doba inkubace

D.... zředění

Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny, což je specifická aktivita enzymu [nmol/mg/min].

4.2.4 STANOVENÍ AKTIVITY KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ

4.2.4.1 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)

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

Reakční směs:

- Substrát: 30 μ l p-nitrofenol (0,556 mM). Navážka 1,16 mg byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna v 15,00 ml redestilované vody.
- Konjugační činidlo: 30 μ l UDP-glukuronová kyselina. Navážka 1,05 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.
- 20 μ l TRIS pufr pH 7,4. Navážka 0,5 g byla rozpuštěna v 10 ml redestilované vody a pomocí 1 M HCl bylo upraveno pH na 7,4 a objem doplněn vodou do 15 ml.
- 20 μ l enzymu
- Detergent: neionogenní detergent pro aktivaci UGT, pipetovaný objem byl vypočten podle koncentrace proteinu ve vzorku. Byl zvolen poměr detergent : protein (w/w) 1 : 2

Ze známých hodnot koncentrace proteinu bylo vypočteno množství detergentu, který byl přidán k frakci B, resp. frakci C. 100 μ l rozmraženého vzorku frakce B, resp. C s roztokem detergentu se inkubovalo při 4°C po dobu 20 min. Reakční směs byla připravena do mikrozkušavek umístěných v ledové lázni. Byly připraveny čtyři paralelní vzorky a dva paralelní slepé vzorky (bez UDP-glukuronové kyseliny). Do mikrozkušavek byl napipetován TRIS pufr, p-nitrofenol, UDP-glukuronová kyselina a reakce byla zahájena přidáním frakce B nebo C s detergentem. Poté byly mikrozkušavky uzavřeny, reakční směs promíchána a mikrozkušavky se inkubovaly při 37°C 30 minut. Reakce byla ukončena vložením zkumavek do ledu a přidáním 50 μ l kyseliny trichloroctové. Pak byl deproteinizovaný roztok centrifugován 3 minuty při 5000 ot./min, 50 μ l supernatantu se přidalo k 50 μ l 1 M NaOH už připraveného v jamkách mikrotitrační destičky a po zbarvení se měřila na čtečce (BioRad) absorbance nezreagovaného p-nitrofenolu při 415 nm. Hodnota absorbance vzorků se odečetla od hodnot absorbance slepých vzorků.

Výpočet aktivity byl proveden pomocí molárního extinkčního koeficientu p-nitrofenolu.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = (A / \epsilon) * 1000 * D / 30 \quad [\text{nmol/ml/min}]$$

a..... aktivita

A..... absorbance

ϵ extinkční koeficient pro p-nitrofenol ($18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

D..... zředění ve vzorku

30..... doba inkubace (min)

Hodnota aktivity byla převedena na specifickou aktivitu enzymu [nmol/mg/min].

4.2.4.2 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu za minutu za použití 0,1 M 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu a 0,1M glutathionu a enzymové katalýzy glutathion-S-transferasy.

Reakční směs:

- Substrát: 10 μl 0,1 M 1-chlor-2,4-dinitrobenzen ($M_r = 202,56$). Navážka 30,4 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml 95% ethanolu.
- Konjugační činidlo: 10 μl 0,1 M redukovaný glutathion ($M_r = 307,33$). Navážka 46,1 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.
- 0,1 M fosfátový pufr pH 6,5
- 5 – 20 μl frakce B

Objem reakční směsi v kyvetě byl vždy 1 ml. Byl napipetován pufr, glutathion a frakce B, směs byla protřepána na třepačce a byl připipetován substrát. Po promíchání byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios β při 340 nm. Byly měřeny 3 paralelní vzorky. Frakci B bylo nutné naředit, protože absorbance přesahovala hodnotu 0,800. Byla sledována linearita měření a hodnota absorbance se odečítala po 30, 60, 90 a 120 sekundách. Pro výpočet aktivity enzymu byl použit

rozdíl absorbancí naměřených v 30 a 90 sekundách. Od tohoto rozdílu byla odečtena hodnota absorbance slepého vzorku. Pro výpočet aktivity byl použit extinční koeficient S-2,4-dinitrofenylglutathionu.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = (A/\epsilon) * D \quad [\mu\text{mol/ml/min}]$$

a..... aktivita

A..... absorbance

ϵ extinční koeficient pro S-2,4-dinitrofenylglutathion ($9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

D..... zředění

Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny a tím se získala specifická aktivita enzymu [$\mu\text{mol/mg/min}$].

4.2.4.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy

Metoda je založena na sledování tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu v závislosti na koncentraci substrátu 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu.

Reakční směs:

- 1-chlor-2,4-dinitrobenzen 0,1 M
- Redukovaný glutathion 0,1 M
- Fosfátový pufr 0,1 M pH 6,5
- Frakce B

Objem reakční směsi v kyvetě byl vždy 1 ml. Byl napipetován pufr, glutathion a frakce B, směs byla protřepána na třepačce a byl připipetován substrát ve vzrůstající koncentraci (0,2 – 3,8 mM). Po promíchání byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios β při 340 nm. Byly měřeny dva paralelní vzorky.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = (A/\epsilon) * D \quad [\mu\text{mol/ml/min}]$$

a..... aktivita

A..... absorbance

ϵ extinční koeficient pro S-2,4-dinitrofenylglutathion ($9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

D..... zředění

Pro sestrojení grafu a vypočtení kinetických parametrů byl použit program GraphPadPrism 3.

4.2.5 TESTOVÁNÍ BIOTRANSFORMACE FLUBENDAZOLU

Frakce B byla inkubována s flubendazolem a NADPH. Po následné extrakci inkubátu bylo množství parentní látky a dvou hlavních metabolitů, konkrétně redukovaného flubendazolu a desethylkarboxyflubendazolu kvantifikováno pomocí HPLC.

Inkubace:

- 147 μl fosfátový pufr 0,1 M pH 7,4
- 3 μl flubendazol ($M_r = 313,3$). Navážka 3,134 mg byla rozpuštěna v 1 ml dimethylsulfoxidu (10 mM)
- 100 μl frakce B
- 50 μl NADPH. Navážka 4,74 mg byla rozpuštěna v 1 ml redestilované vody

Do označených mikrozkuvek byla napipetována uvedená množství jednotlivých složek inkubační směsi a inkubace probíhala při 37°C po dobu 30 minut. Reakce byla zastavena přidáním 36 μl koncentrovaného amoniaku a protřepáním. Poté bylo přidáno 1,8 ml t-butylmethyletheru a mikrozkuvky intenzivně protřepány 1 minutu na vortexu. Po odpaření byly vzorky uschovány v chladu a temnu a později použity pro HPLC stanovení.

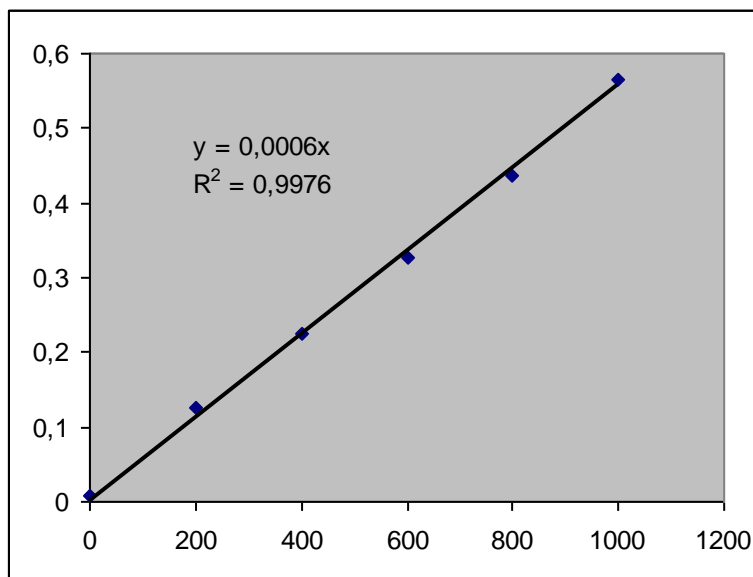
5 VÝSLEDKY

5.1 STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY

Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích získaných z motolic byla stanovena pomocí metody BCA stanovení (viz kapitola 4.2.1). Nejprve byla sestrojena kalibrační přímka pomocí standardního roztoku hovězího sérového albuminu. Kalibrační přímka byla sestrojena metodou lineární regrese (obr. 11).

Kalibrační křivka:

konc µg/ml	0	200	400	600	800	1000
po odečtení	0,0075	0,1255	0,2255	0,3255	0,4355	0,5645



Obr. 11: Kalibrační přímka

U jednotlivých vzorků byla proměřena absorbance, od těchto naměřených hodnot odečtena absorbance slepého vzorku a z kalibrační přímky zjištěny hodnoty koncentrace bílkoviny ve frakci A, B, C (tab. 2).

Tab. 2: Koncentrace bílkoviny ve frakci A, B, C získaných z motolic (rovnice kalibrační přímky je $y = 0,0006x$).

Frakce	Konc. bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]
A	3927,083
B	5837,5
C	2429,167

5.2 STANOVENÍ AKTIVITY OXIDAČNÍCH ENZYMŮ

5.2.1 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)

Ke stanovení aktivity cytochromu CYP1A byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídávkem resorufinu (viz kapitola 4.2.2.1). Aktivita enzymů byla stanovována ve frakci C.

Aktivita ethoxyresorufindeethylasy (EROD) ve frakci C nebyla nalezena.

5.2.2 Stanovení aktivity benzyloxy-O-dearylasy (BROD)

Ke stanovení katalytické aktivity CYP 3A a CYP 2B byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídávkem resorufinu (viz kapitola 4.2.2.2). Aktivita enzymů byla stanovována ve frakci C.

Aktivita benzyloxydearylasy (BROD) ve frakci C motolic nebyla nalezena.

5.2.3 Stanovení aktivity testosteronhydroxylasy (TOH)

Po inkubaci jednotlivých frakcí s testosteronem a následné extrakci bylo množství vzniklých metabolitů testosteronu zjišťováno pomocí HPLC (viz kapitola 4.2.2.3). Byly použity frakce B a C. Vzhledem k omezenému množství biologického materiálu bylo provedeno pouze jedno měření každého vzorku.

V inkubátech frakce B i C nebyly nalezeny žádné metabolity testosteronu.

5.3 STANOVENÍ AKTIVITY REDUKČNÍCH ENZYMŮ

Ke stanovení aktivit reduktas metyraponu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu při pH 6,0 a 8,5, acenaftenolu byla použita spektrofotometrická metoda měření absorbance vždy ve třech paralelních vzorcích. K měření byla použita frakce B (viz kapitola 4.2.3). Aktivita byla vyjádřena v nmol/ml/min a vztažením na mg bílkoviny jako specifická aktivita.

V následujících tabulkách (tab. 3 – 6) jsou uvedeny aktivity reduktas vůči jednotlivým substrátům.

5.3.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu

Aktivita DD4 (EC 1.1.1.213) a CR (EC 1.1.1.184) vůči metyraponu (1mM) byla měřena spektrofotometricky ve frakci B při pH 6,0.

Tab. 3: Specifická aktivita reduktas metyraponu ve frakci B

	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek 1	5,1
Vzorek 2	6,9
Vzorek 3	6,5
průměr	6,2
smodch	0,8

5.3.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 6,0

Aktivita DD2 (EC 1.3.1.20) a CR (EC 1.1.1.184) vůči daunorubicinu (0,01mM) byla měřena při pH 6,0 na spektrofotometru ve frakci B. Aktivita byla vztažena na mg bílkoviny.

Tab. 4: Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 6,0 ve frakci B

	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek 1	1,7
Vzorek 2	1,2
Vzorek 3	1,3
průměr	1,4
smodch	0,2

5.3.3 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

Aktivita reduktas DL-glyceraldehydu (10mM) byla měřena spektrofotometricky při pH 6,0. Ve frakci B nebyla nalezena aktivita DL-glyceraldehydreduktas.

5.3.4 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5

Aktivita aldehydreduktasy (EC 1.1.1.2) vůči daunorubicinu (0,01mM) byla měřena v prostředí pH 8,5. Naměřené hodnoty jsou zaneseny v tabulce 5.

Tab. 5: Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 8,5 ve frakci B

	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek 1	3,9
Vzorek 2	4,9
Vzorek 3	4,1
průměr	4,3
smodch	0,4

5.3.5 Stanovení aktivity reduktas acenaftenolu

Aktivita reduktas acenaftenolu byla stanovena spektrofotometricky v prostředí pH 6,0. Metoda je založena na měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP⁺ na NADPH (viz kap.4.2.3.5).

Tab. 6: Specifická aktivita reduktas acenaphtenolu ve frakci B

	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek 1	14,4
Vzorek 2	14,6
Vzorek 3	14,6
průměr	14,5
smodch	0,1

5.3.6 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu

Metoda je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s oracinem a následné extrakci a HPLC stanovení jeho metabolitu dihydrooracinu (viz kapitola 4.2.5). Byla použita frakce B a frakce C.

Ve frakci B byla sledována aktivita karbonylreduktasy a ve frakci C aktivita 11 β -HSD vůči oracinu.

V následujících tabulkách (tab. 7, 8) jsou průměrné hodnoty aktivit s příslušnými směrodatnými odchylkami.

Tab. 7: Specifická aktivita reduktas oracinu ve frakci B

Frakce B	Aktivita [nmol/min/mg]
vzorek 1	1,88
vzorek 2	1,77
průměr	1,82
smodch	0,05

Tab. 8: Specifická aktivita reduktas oracinu ve frakci C

Frakce C	Aktivita [nmol/min/mg]
vzorek 1	0,036
vzorek 2	0,025
průměr	0,03
smodch	0,005

5.4 STANOVENÍ AKTIVITY KONJUGAČNÍCH ENZYMŮ

5.4.1 Stanovení aktivity UGT

Ke stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid ve frakci B a C (viz kapitola 4.2.4.1).

V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty aktivity UGT, průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou.

Tab.9: Specifická aktivita UGT ve frakci C

Frakce C	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek 1	0,069
Vzorek 2	0,099
Vzorek 3	0,081
průměr	0,083
smodch	0,015

Ve frakci B nebyla detekovaná žádná aktivita UGT vůči p-nitrofenolu.

5.4.2 Stanovení aktivity GST

Ke stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu. Aktivita GST byla stanovována ve frakci B (viz kapitola 4.2.4.2).

V tabulce 10 je uvedena průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou aktivity GST.

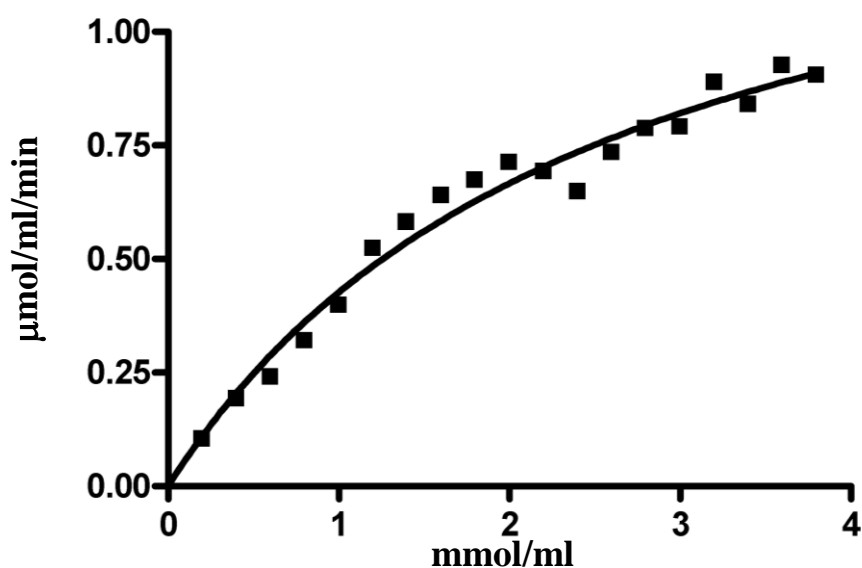
Tab.10: Specifická aktivita GST ve frakci B

Frakce B	Aktivita [μmol/min/mg]
Vzorek 1	1,7
Vzorek 2	1,4
Vzorek 3	1,4
průměr	1,5
smodch	0,1

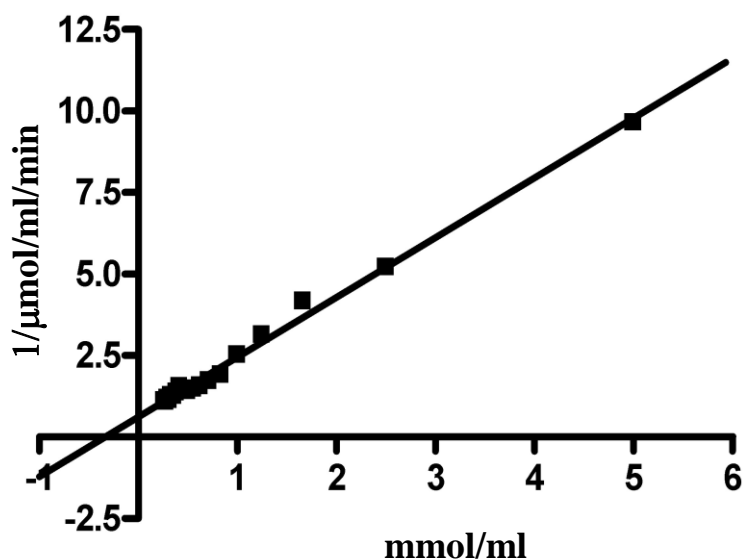
5.4.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy

Ke stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu. Aktivita GST byla stanovována ve frakci B (viz kapitola 4.2.4.3).

Kinetika glutathion-S-transferasy ve frakci B byla studována v rozmezí koncentrací substrátu 0,2 – 3,8 mM. Zdánlivá Michaelisova konstanta (K_m) a maximální rychlost (V_{max}) byly vypočteny podle rovnice Michaelise a Mentenové. Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu je na obr. 12. Avšak pro odečtení hodnot K_m a V_{max} je vhodnější užít transformace dle Lineweara a Burka (obr. 13). Z grafu byla odečtena hodnota V_{max} $1,64 \pm 0,25 \mu\text{mol/ml/min}$ a hodnota K_m je $2,57 \pm 0,38 \text{ mM}$.



Obr. 12: Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.



Obr. 13: Stanovení K_m a V_{max} dle Lineweavera a Burka.

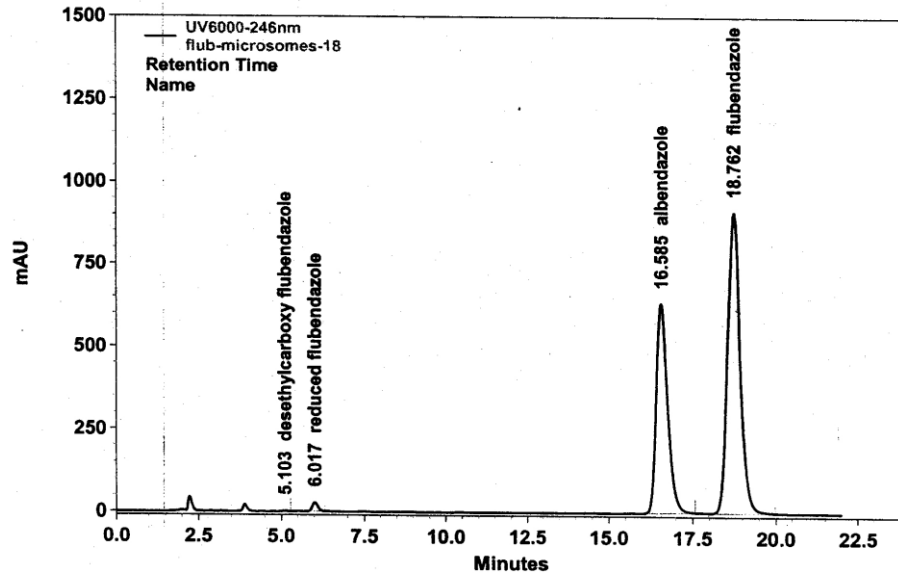
5.5 TESTOVÁNÍ BIOTRANSFORMACE FLUBENDAZOLU

Frakce B byla inkubována s flubendazolem a NADPH. Po následné extrakci inkubátu bylo pomocí HPLC stanoveno množství parentní látky a dvou hlavních metabolitů (viz kapitola 4.2.6).

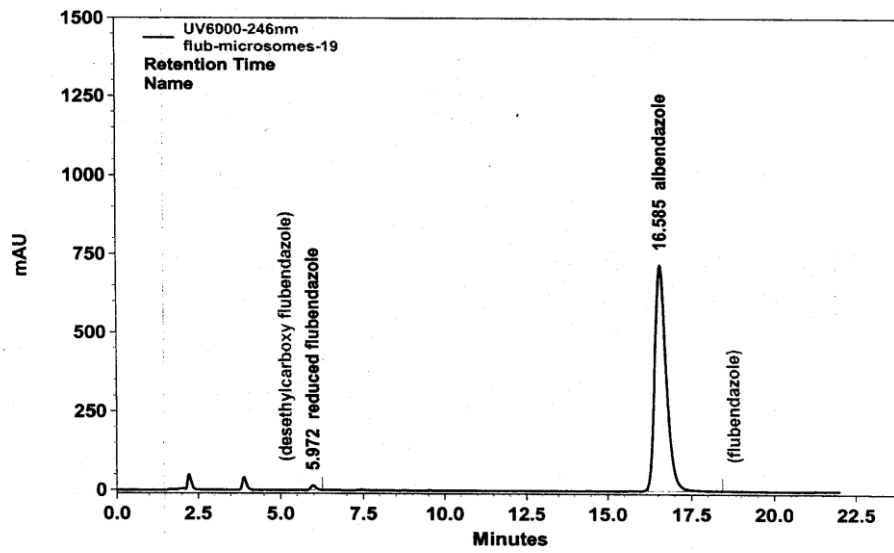
Ve frakci B byl nalezen pouze redukovaný flubendazol (tab.11), množství druhého metabolitu – desethylkarboxyflubendazolu bylo po odečtení slepého vzorku nulové. Ukázka chromatogramů jsou na obr. 14. Byla vypočtena specifická aktivita enzymu, který redukuje flubendazol.

Tab. 11: Specifická aktivita enzymu, metabolizujícího flubendazol na redukovaný metabolit ve frakci B

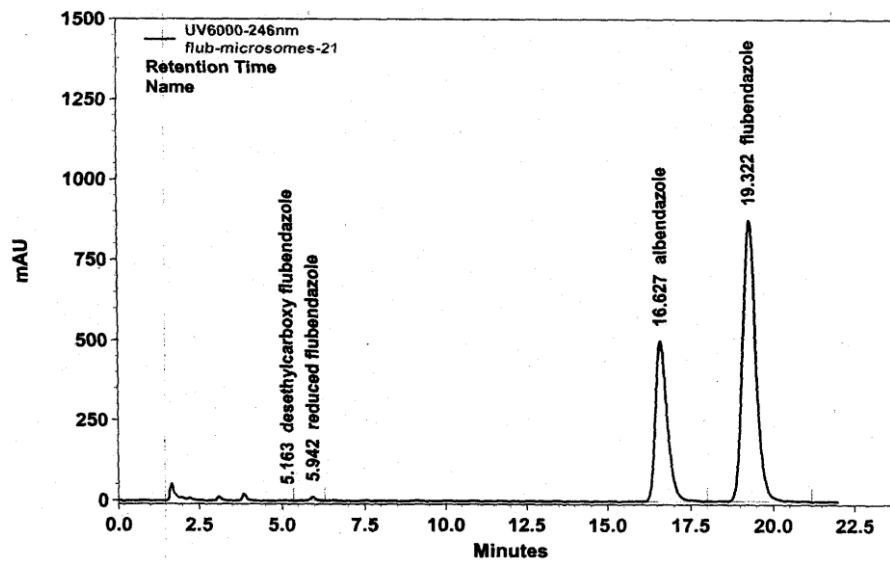
Frakce B	Aktivita [nmol/min/mg]
Vzorek1	4,45
Vzorek2	5,53
průměr	4,49
smodch.	0,5



a)



b)



c)

Obr. 14: HPLC stanovení flubendazolu a jeho metabolitů (redukovaného flubendazolu, desethylkarboxyflubendazolu) s použitím albendazolu jako vnitřního standardu. Byla provedena analýza ve vzorku frakce B (obr. a), slepého vzorku (b) a vzorku, který obsahoval flubendazol, albendazol a pufr (c).

6 DISKUSE

Cílem této práce bylo zjistit, zda motolice kopinatá je schopna biotransformovat xenobiotika. Testování probíhalo *in vitro* v subcelulárních frakcích homogenátu motolic. Sledovány byly oxidační přeměny xenobiotik, redukce karbonylové skupiny xenobiotik a konjugace xenobiotik s kyselinou glukuronovou a glutathionem. Jako modelové substráty byly využity látky, jejichž metabolické přeměny se běžně používají k testování aktivit určitých biotransformačních enzymů u lidí, laboratorních a hospodářských zvířat. Škála obvyklých modelových substrátů byla rozšířena o potenciální cytostatikum oracin (pro sledování redukční aktivity) a anthelmintikum flubendazol (pro testování redukce a hydrolýzy).

K pokusům byly použity subcelulární frakce A, B, C motolic. Izolace jednotlivých frakcí je založena na ultracentrifugaci homogenátu motolic v 0,1 M sodnofosfátovém pufru pH 7,4. Frakce A při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje především mitochondrie, frakce B převážně cytosol a frakce C především mikrosomy.

Nejprve byla stanovena koncentrace bílkoviny ve frakci A, B, C metodou BCA. Nejvyšší hodnota koncentrace proteinu byla zjištěna ve frakci B, nejmenší ve frakci C.

Ve frakci C motolic byla stanovována aktivita ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD) spektrofluorimetry. Tato metoda se u savců využívá ke stanovení aktivity isoformem CYP1A. Aktivita EROD ve frakci C nebyla nalezena.

Dále byla ve frakci C stanovována aktivita benzyloxydearylasy (BROD) rovněž spektrofluorimetry. Tato metoda slouží ke stanovení aktivity isoformem CYP3A, CYP2B. Ani aktivita BROD ve frakci C nebyla nalezena.

Ve frakci B a C byla stanovována aktivita testosteronhydroxylasy (TOH). Ke stanovení byla použita metoda inkubace jednotlivých frakcí s testosteronem a následného HPLC stanovení metabolitů testosteronu (6 α , 7 α , 6 β , 16 α , 16 β , 2 α , 2 β -hydroxytestosteronu). Bylo provedeno pouze jedno měření každého vzorku.

V inkubátu frakce C s testosteronem bylo detekováno určité množství hydroxylovaných metabolitů testosteronu, avšak srovnatelné množství těchto metabolitů bylo nalezeno i ve slepém vzorku, který neobsahoval žádnou enzymovou

frakci. Pro definitivní potvrzení či vyvrácení aktivity by bylo potřeba experiment zopakovat, což z důvodu nedostatku biologického materiálu nebylo možné.

Savci v obraně proti xenobiotikům využívají především skupinu oxidačních enzymů závislých na cytochromu P450. Byly hledány enzymy P450 u některých druhů helmintů, avšak tyto pokusy byly neúspěšné. Výsledky této práce korespondují s poznatky několika málo studií (Barrett 1998), že enzymy P450 se u helmintů nevyskytují. Avšak byla zjištěna oxidace albendazolu u motolic, dále v menší míře u tasemnic a obličných červů (Solana 2001). Je tedy pravděpodobné, že P450 monooxygenasy jsou u helmintů do jisté míry nahrazeny jinými oxidačními enzymy.

Dalším cílem práce bylo stanovit aktivity enzymů redukcí karbonylovou skupinu xenobiotik. Byly zjišťovány aktivity reduktas metyraponu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu při pH 6,0 a 8,5, acenaphtenolu ve frakci B a aktivita reduktas vůči oracinu ve frakci B a C.

Seznam sledovaných enzymů a jednotlivých substrátů je uveden v tabulce 12.

Tab. 12: Zkoušené enzymové aktivity

	Specifické pro člověka/potkana
Metyraponreduktasa	AKR1C4, CR, AKR1A
DL-glyceraldehydreduktasa	AKR1A
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0)	CR, DD2
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5)	AKR1A
Acenaphtenolreduktasa	AKR1C
Oracinreduktasa	11 β -HSD, CR

AKR – aldo-ketoreduktasa, HSD – hydroxysteroiddehydrogenasa,
CR – karbonylreduktasa

Pro stanovení reduktas metyraponu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu (pH 6,0 a 8,5) a acenaphtenolu byla použita metoda spektrofotometrického stanovení poklesu absorbance způsobeného přeměnou NADPH na NADP⁺. Specifické aktivity vybraných enzymů jsou uvedené v tabulce 13.

Nejvyšší aktivita byla nalezena u acenaphtenolreduktasy. Naopak se zdá, že DL-glyceraldehyd není vhodným substrátem a motolice jej nemetabolizuje. Poměrně vysoká aktivita byla nalezena u reduktas metyraponu ve frakci B, aktivita je srovnatelná s aktivitou metyraponreduktas u kozy v mikrosomální frakci jater,

cytosolická frakce vykazuje asi třikrát nižší hodnoty. Při srovnání specifických aktivit metyraponreduktasa a daunorubicinreduktasa (pH 8,5) v jaterních cytosolických frakcích některých hospodářských zvířat a ve frakci B motolic bylo zjištěno, že motolice vykazují několikrát (3 – 10x) vyšší aktivity.

Tab. 13: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakci B

	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Metyraponreduktasa	6,2 ± 0,8
DL-glyceraldehydreduktasa	—
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0)	1,4 ± 0,2
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5)	4,3 ± 0,4
Acenaphtenolreduktasa	14,5 ± 0,1

Metoda stanovení reduktas oracinu je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s oracinem a HPLC stanovení metabolitu dihydrooracinu. Aktivita reduktasy karbonylu oracinu ve frakci B byla signifikantně větší než aktivita reduktas karbonylu oracinu ve frakci C. Specifická aktivita reduktasy karbonylu oracinu v cytosolu byla $1,82 \pm 0,05$ nmol/min/mg a specifická aktivita mikrosomální reduktasy oracinu byla $0,03 \pm 0,005$ nmol/min/mg.

Substráty použité pro stanovení aktivity reduktas se vyznačují nižší specifitou než je tomu u CYP. Řada AKR, CR, HSD se může podílet na redukci karbonylové skupiny. Tyto enzymy jsou poměrně dobře prostudované u člověka a laboratorních zvířat, ale studie reduktas u helmintů v podstatě chybí. Tyto výsledky ukazují, že reduktasy u motolice vykazují značnou schopnost redukovat karbonylovou skupinu a jsou dominantními reakcemi první fáze metabolismu.

Dále byly stanoveny aktivity konjugačních enzymů, konkrétně UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a glutathion-S-transferasy (GST).

Aktivita UGT byla stanovována ve frakci B a C. K tomuto stanovení byla použita spektrofotometrická metoda. Ve frakci C byla zjištěna aktivita UGT vůči p-nitrofenolu, hodnota specifické aktivity je $0,083 \pm 0,015$ nmol/min/mg. Tato aktivita je nepatrná ve srovnání se specifickou aktivitou měřenou v mikrosomálních frakcích jater některých hospodářských zvířat (tab. 14). Konjugace s glukuronovou kyselinou u jiných

parazitických červů nebyla prozatím dokázána (Barrett 1997). Ve frakci B nebyla detekována žádná aktivita UGT.

Aktivita GST byla stanovena ve frakci B motolic pomocí metody spektrofotometrického stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu. V experimentu byla zjištěna aktivita GST ($1,5 \pm 0,1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) vůči 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu. Předpokládalo se, že tato aktivita bude nalezena, neboť studie na helmitech prokázaly, že se tento enzym vyskytuje u parazitických červů a je pravděpodobně jejich hlavním detoxikačním mechanismem. Vysoká aktivita byla také nalezena u tasemnic, nižší pak u oblých červů. Zdá se, že aktivita je vyšší u intestinálních červů než u krevních a tkáňových parazitů. Hodnota aktivity GST motolice je srovnatelná s hodnotami v cytosolické frakci hospodářských zvířat, jak je uvedeno v tabulce 14.

U GST byla také sledována kinetika konjugace ve frakci B v rozmezí koncentrací 0,2 – 3,8 mM. Důležitým kinetickým parametrem je maximální rychlost (V_{max}) a Michaelisova konstanta (K_M). K_M je koncentrace substrátu, při které je reakční rychlost rovna polovině maximální rychlosti. Hodnota K_M kolísá s druhem enzymu a povahou substrátu, a je také funkcí teploty a pH. Hodnoty kinetických parametrů GST pro substrát 1-chlor-2,4-dinitrobenzen byly vypočteny podle rovnice Michaelise a Mentenové. Za daných podmínek byla zjištěna hodnota $V_{\text{max}} = 1,64 \pm 0,25 \mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ a $K_M = 2,57 \pm 0,38 \text{ mM}$.

Tab. 14.: Srovnání specifické aktivity mikrosomální UGT a cytosolické GST u hospodářských zvířat a UGT ve frakci C a GST ve frakci B u motolice kopinaté

	Prase	Koza	Ovce	Kráva	Motolice
UGT(nmol/min/mg)	7,0±0,3	6,9±0,1	11,0±0,2	7,6±0,2	0,083±0,015
GST(μmol/min/mg)	0,6±0,1	1,5±0,1	1,4±0,4	1,4±0,4	1,5±0,1

V poslední části práce byla testována biotransformace flubendazolu, důležitého anthelmintika, inkubací frakce B s flubendazolem a NADPH a následným HPLC stanovením metabolitů. Z HPLC analýzy vyplývá, že flubendazol byl metabolizován na redukovaný flubendazol. Druhý měřený metabolit – desethylkarboxyflubendazol byl nalezen ve stejném množství ve vzorku i ve slepém vzorku, tedy frakce B se nepodílí na tvorbě desethylkarboxyflubendazolu. Tato *in-vitro* studie dokázala, že motolice jsou schopny účinně biotransformovat flubendazol, což může být jeden

z důvodů proč není toto anthelmintikum účinné při léčbě trematodózy způsobené *D. dendritikum*.

Ze získaných výsledků vyplývá, že parazit motolice kopinatá využívá k biotransformaci xenobiotik redukční enzymy a konjugační enzymy. Nebyly nalezeny žádné oxidační přeměny xenobiotik. Z redukčních enzymů u tohoto parazita byly zjištěny aktivity reduktas metyraponu; daunorubicinu při pH 6,0; daunorubicinu při pH 8,5; acenaphtenolu; oracinu i flubendazolu. U motolice také byly nalezeny aktivity enzymů konjugujících xenobiotika s kyselinou glukuronovou a s glutathionem. Parazit disponuje značnou aktivitou glutathion-S-transferas a tyto enzymy jsou tedy pravděpodobně jeho důležitým detoxikačním systémem. GST neutralizují cytotoxické produkty, a tak jsou mocnou ochranou parazita proti imunologické odpovědi hostitele a mohou přispívat k rozvinutí chronické infekce.

7 ZÁVĚR

Byla provedena *in-vitro* studie biotransformačních přeměn vybraných xenobiotik u parazita *Dicrocoelium dendriticum*. Z výsledků vyplývají následující závěry:

- U motolice kopinaté nebyly nalezeny oxidační transformace vybraných xenobiotik.
- Enzymy motolice kopinaté vykazují významnou schopnost redukce řady xenobiotik s karbonylovou skupinou.
- U motolice kopinaté byly nalezeny aktivity enzymů konjugujících xenobiotika s kyselinou glukuronovou a s glutathionem.
- *D. dendriticum* biotransformuje flubendazol.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	bicinchonová kyselina
BROD	benzyloxydearylasa
BSA	hovězí sérový albumin
CR	karbonylreduktasa
CYP	cytochrom P450
DD	dihydrodioldehydrogenasa
DMSO	dimethylsulfoxid
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylasa
GST	glutathion-S-transferasa
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
K_M	Michaelisová konstanta
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
V_{max}	maximální rychlost enzymové reakce

LITERATURA

- Barnová, E. et al.: Lékařská chemie a biochemie, Praha: Avicenum 1991. 661 s. ISBN 80-201-0114-4.
- Barrett J.: Helminth detoxification mechanisms. *Journal of Helminthology* 1997, 71, 85 – 89.
- Brophy B. M., LaCourse J., Mophew R., Moxon J., Barrett J.: Parasite glutathione-S-transferases, www.aber.ac.uk
- Coffman et al.: Drug metabolizing enzymes, *Drug. Metab. Dispos.* 1997, 25: 1 – 4.
- Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Maser E., Delort A. M.: Evidence of metyrapone reduction by two *Mycobacterium* strains by ¹H NMR. *Biodegradation* 2004, 15: 125 – 132.
- Crosas B., Cederlund E., Torres D., Jörnvall H., Farres J., Parés X.: A vertebrate aldo-keto reductase active with Retinoids and ethanol. *The Journal of Biological Chemistry* 22, 2001, 19132 – 19140.
- Cupp M. J., Tracy T. S.: Cytochrome P450: new nomenclature and clinical implications, *American Family Physician* 1, 1998.
- Davit B. M.: Biotransformation of xenobiotics, Office of generic drug, FDA, published 2001, www.med.howard.edu
- Ducháček L., Lamka J.: Dicrocoeliosis – the present state of knowledge with respect to wildlife species, *Acta Vet. Brno* 2003, 72: 613 – 626.
- Hines R. N., Gail McCarver M.: The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: Phase I oxidative enzymes, *Pharmacology and experimental therapeutics* Issue 2, 2002 335 – 360.

- Jez J. M., Flynn T. G., Penning T. M.: A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem Pharmacol.* 1997, 54(6): 639 – 47.
- O'Connor T., Ireland L. S., Harrison D. J., Hayes J. D.: Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members, *Biochem. J.* 343, 1999, 487 – 504.
- Otranto D., Traversa D.: A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment, *Veterinary parasitology*, Volume 107, Issue 4, 2002, 317 – 335.
- Preskorn S. H., Harvey A. T.: Cytochrome P450 enzymes and psychopharmacology 2000, www.acnp.org
- Revilla – Nuín B., Manga – González M. Y., Minambres B., González – Lanza C.: Partial characterization isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* of adults, *Veterinary Parasitology* 2005, 10; 134 (3-4): 229 – 40.
- Schröterová L., Kaiserová H., Baliharová V., Velík J., Geršl V., Kvasničková E.: The effect of new lipophilic chelators on the activities of the cytosolic reductases and P450 cytochromes involved in the metabolism of antracycline antibiotics: studies in vitro, *Physiol. Res.* 2004, 55: 683 – 691.
- Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Nožinová E., Wsól V., Velík J., Machala M., Neča J., Souček P., Šusová S., Skálová L.: Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep, *Research in Veterinary Science* 76, 2004, 43 – 51.

- Szotáková B., Skálová L., Wsól V., Kvasničková E.: Reduction of potential anticancer drug oracin in the rat liver in-vitro, J. Pharm. Pharmacol. 2000, 52: 495 – 500.
- Terada T., Sugihara Y., Nakamura K., Sato R., Inazu M., Masamoto M.: Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO – K1 cells, Eur. J. Biochem. 267, 2000, 6849 – 6857.
- Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Maser E.: The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, Toxicology 197, 2004, 253 – 261.
- Yan Z., Caldwell G. W.: Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug delivery, Current Topics in medicinal chemistry 1, 2001, 403 – 425.