

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

**Vliv flubendazolu na aktivitu vybraných biotransformačních
enzymů u parazitujících červů *Haemonchus contortus***

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2009

Martina Babíková

Touto cestou by som sa chcela poďakovať Doc. RNDr. Lenke Skálovej, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a predovšetkým cenné rady pri riešení diplomovej práce. Rovnako sa chcem poďakovať Mgr. Veronike Krížovej za ochotu a pomoc. Ing. Kubíčkoví, CSc za prevedenie HPLC analýzy a všetkým na katedre biochemických vied za vytvorenie príjemného prostredia. Ďakujem.

Tiež prehlasujem, že táto práca je mojím vlastným autorským dielom, ktoré som sama vypracovala. Všetka literatúra, z ktorej som čerpala, je uvedená v zozname použitej literatúry.

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá úlohou biotransformačných enzýmov v navodení rezistencie parazitujúcich červov na benzimidazolové anthelmintika. Liečba infekcií spôsobených helmintmi sa stala problematickou kvôli častej liekovej rezistencii parazitických červov. Rozvoj rezistencie môže byť podporený činnosťou enzýmov metabolizujúcich xenobiotikum. Ako model bol vybraný *Haemonchus contortus*, ktorý je jedným z najpatogénnejších parazitov domácich a voľne žijúcich prežúvavcov. Dospelci *H. contortus* boli izolovaní z nakazených oviec, ktoré boli liečené rôznymi sub-terapeutickými dávkami anthelmintika flubendazolu, alebo z oviec neliečených. V subcelulárnych frakciách homogenátu červov boli experimentálne zistené špecifické aktivity vybraných biotransformačných enzýmov prvej a druhej fázy. Porovnaním hodnôt enzymatickej aktivity u rôznych skupín červov som sa snažila zistiť jej možné ovplyvnenie predošlým kontaktom s flubendazolom.

ABSTRACT

This diploma thesis treats of biotransformation enzymes issue in development of resistance of parasitic helminths on benzimidazole anthelmintics. The treatment of helminthic infections has become problematic because of frequent drug resistance of helminth parasites. The development of drug resistance can be facilitated by the action of xenobiotic metabolizing enzymes. Experimental model was represented by *Haemonchus contortus* which is one of the most pathogenic parasites of domestic and wild ruminant species. Adults of *H. contortus* were isolated from infected sheep; these were treated by sub-therapeutic doses of anthelmintic flubendazole. And were also isolated from infected sheep but with no treatment applied. There were determined specific activities of selected biotransformation enzymes of the first and second phase in subcellular fractions of the helminth homogenate. Comparing enzymatic activity values among examined groups of helminths I was evaluating possible influence on enzymatic activities if there was flubendazole applied in the past.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČASŤ	7
2.1 Haemonchus contortus	7
2.1.1 Vývojový cyklus	7
2.1.2 Ochorenie spôsobené <i>H. contortus</i>	8
2.2 Anthelmintiká	8
2.2.1 Benzimidazolové anthelmintiká	9
2.2.2 Agonisti nikotínu	10
2.2.3 Makrocyclické laktóny	10
2.2.4 Praziquantel	11
2.2.5 Rezistencia	11
2.3 Biotrasformácia xenobiotík u helmintov	12
2.3.1 Biotransformačné enzýmy	13
2.3.1.1 Redukčné enzýmy	14
2.3.1.2 Cytochromy P450	17
2.3.1.3 Glutathion-S-transferasa	18
2.3.1.4 UDP-glukuronosyltransferasa	19
2.3.2 Oplyvnenie biotrasformačných enzýmov ich indukciou alebo inhibíciou	19
3. CIEĽ PRÁCE	22
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
4.1 Biologický materiál	23
4.2 Chemikálie, prístroje a pomôcky	24
4.3 Pracovný postup /metodika/	25
4.3.1 Príprava subcelulárnych frakcií z homogenátu vlasoviek	25
4.3.2 Stanovenie koncentrácie bielkoviny metódou s BCA	25
4.3.3 Stanovenie aktivity reduktas/dehydrogenas karbonylovej skupiny ...	27
4.3.3.1 Redukcia D,L-glyceraldehydu	28
4.3.3.2 Redukcia 4-pyridinkarboxaldehydu	28
4.3.3.3 Dehydrogenácia acenaftenolu	29
4.3.4 Stanovenie aktivity glutathiontransferasy (GST)	30
4.3.5 Stanovenie aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glucosyltransferasy (UGlcT) v mikrotitračných doštičkách	31
4.3.6 Stanovenie aktivity reduktáz flubendazolu	33
Štatistické hodnotenie	33
5. VÝSLEDKY	34
5.1 Stanovenie bielkoviny	34
5.2 Stanovenie aktivity reduktas	35
5.2.1 4-pyridinkarboxaldehyd	36
5.2.2 DL-glyceraldehyd	37
5.2.3 Acenaftenol	38
5.3 Stanovenie GST	39
5.4 Stanovenie UGT	40
5.5 Stanovenie špecifických reduktas flubendazolu	42
6. DISKUSIA	44

7. ZÁVER	48
Zoznam použitej literatúry	49

1. ÚVOD

Ochorenia spôsobené parazitujúcimi červami (helmintózy) majú stále silný negatívny dopad na produkčnú úroveň postihnutých chovov, chovateľom pôsobia značné ekonomické straty a samotným zvieratám zdravotné problémy alebo i smrť. Pre túto prácu bol vybraný *Haemonchus contortus*, ktorý je jedným z najpatogénnejších parazitov domácich a voľne žijúcich prežúvavcov. Pôsobí nematózy tráviaceho traktu, ktorých liečba je skomplikovaná predovšetkým častou rezistenciou *H. contortus* na bežné anthelmintiká. Rozvoj rezistencie môže zaisťovať činnosť enzýmov metabolizujúcich dané liečivo, ktorá dokáže anthelmintikum deaktivovať a ochrániť parazita pred toxickým efektom liečiva.

V každom živom organizme tieto biotransformačné enzýmy slúžia ako efektívna ochrana pred negatívnymi vplyvmi xenobiotík. Pri enzymatickej premene cudzorodých látok vznikajú metabolity, ktoré majú väčšinou (ale nie vždy) nižšiu biologickú aktivitu a sú ľahšie eliminované z organizmu.

Samozrejme, pôsobenie enzýmov a xenobiotík nie je jednostranné, ale vzájomné, teda aj aktivita enzýmov je ovplyvňovaná rôznymi faktormi (vek, pohlavie, potrava, životné prostredie, atď.), ale aj, čo som sa snažila dokázať touto prácou, samotnými xenobiotikami. Aktivita enzýmov je ovplyvňovaná v zmysle ich inhibície alebo indukcie.

Zatiaľ boli skúmané hlavne indukcie oxidačných a konjugačných enzýmov (Robinson et al. 2004), ale ako sa ukazuje i redukčné enzýmy a ich indukcia by mohla hrať podstatnú úlohu v obrannej stratégii helmintov proti účinkom niektorých liečiv.

V rámci tejto práce boli sledované a porovnávané aktivity vybraných cytosolických a mikrosomálnych enzýmov na úrovni ich katalytickej aktivity voči špecifickým substrátom. Cieľom bolo zistiť mieru ovplyvnenia enzymatickej aktivity chemickým stresom, t.j. vystavením organizmu pôsobeniu xenobiotika a to v rôznych koncentráciách. Teda potvrdiť hypotézu, že kontakt parazitického červa s anthelmintikom (v sub-letálnej dávke) môže vyvolať indukciu biotransformačných enzýmov červa a tým zvýšiť šancu červa prežiť ďalšiu expozíciu anthelmintikom.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 *Haemonchus contortus*

2.1.1 Vývojový cyklus

Haemonchus contortus (Vlasovka slezová) bol prvýkrát popísaný Karlom Rudolphom (Soulsby 1982). Je jedným z najdôležitejších patogénov malých prežúvavcov v rozvojových krajinách. Patrí do triedy *Secernatea*, radu *Strongylida*, čeľade *Trychostrongylidae* a rodiny *Haemonchidae*.

H. contortus má zub alebo tzv. lancet vo svojej ústnej dutine, ktorým dokáže perforovať žalúdočnú sliznicu svojho hostiteľa a cicať krv. Samičky sú veľké 18-30 mm a samčeky merajú 10-20 mm. Dospelé jedince žijú v abomase (sleze) prežúvavcov. Samičky sú veľmi plodné a denne nakladú až 5000 vajíčok, ktoré sú vylúčené do prostredia vo výkaloch hostiteľa. *Haemonchus* má priamy vývojový cyklus bez medzihostiteľa. Časť preživa vo vonkajšom prostredí, kde sa vyvíja z vajíčka cez prvé (L1), druhé (L2) až po infekčné larválne štádium (L3). Vtedy je spasený spolu s trávou a dostáva sa do slezu zvierateľa, kde sa larva vyvíja na sexuálne zrelého jedinca.

Podmienky životného prostredia majú veľký dopad na populáciu parazita. Všeobecne možno povedať, že *H. contortus* je dobre prispôsobený na teplé a vlhké klimatické podmienky. Mnohé štúdie skúmali environmentálne ukazovatele, ktoré rozhodujú o úspechu v procese vývoja parazita od vajíčok až do štádia L3. Ako spodné environmentálne limity pre haemonchózu u oviec boli označené priemerné teploty 18°C a minimálne mesačné zrážky 50mm. Optimálne podmienky pre vývojový proces je teplota 28°C s vlhkosťou vyššou ako 70%, vývoj je obmedzený alebo vôbec žiadny pri teplote pod 9°C. Na tomto základe sú podmienky životného prostredia, ktoré by dovolili *H. contortus* dokončiť svoj vývojový cyklus, obmedzené v studenom a miernom pásme. Ale dospelé parazity, v dôsledku rôznych faktorov (nepriaznivé mikro- a makro-environmentálne podmienky, imunitná reakcia hostiteľa, atď.) dokážu minimalizovať svoj metabolizmus, zastaviť svoj vývoj a ostať vo vnútri

žalúdočnej žľazy v stave, ktorý sa nazýva hypobiosa. Tento stav je adaptáciou parazita v zimnom období v miernom podnebí a počas suchého obdobia v suchých oblastiach sveta.

Dospelé jedince vylučujú vajíčka, ktoré odchádzajú z tela hostiteľa v exkrementoch. Z nich sa vyvinú larvy, ktoré prežívavce spasia spoločne s trávou.

2.1.2 Ochorenie spôsobené *H. contortus*

Hlavnými patogénnymi mechanizmami *H. contortus* sú priame lézie na žalúdočnej sliznici a hematofágy. Účinky patogénnych mechanizmov a následné reakcie hostiteľa majú za následok funkčné morfológické zmeny najmä v abomase a krvi. Výsledkom je zhoršené trávenie, vstrebávacie syndrómy, edémy a anémia.(Angulo-Cubillan et al. 2007). Haemonchóza spôsobuje hypoalbuminémiu a často vedie k zníženiu obsahu bielkovín. Môže taktiež viesť k rýchlejšiemu úhynu mladých oviec oproti iným helmintózam (Alvarez et al 2000). Dobytok s ťažkou infekciou *H. contortus* stráca odolnosť, má bledé ďasná a spojivky (výsledok ťažkej anémie). Hlavným problémom pre hospodárov sú straty spôsobené poklesom hmotnosti, rastu vlny, znížením produkcie mlieka alebo redukciou rastu zvierat, ktoré následne vedú k nemalým ekonomickým stratám (Waller et al 2004).

2.2 Anthelmintiká

Dnes máme k dispozícii bezpečné a širokospektré anthelmintiká, ktoré pomáhajú redukovať výskyt veľkého počtu ochorení spôsobené parazitujúcimi červami. Moderné anthelmintiká sú vysoko účinné proti dospelým i nedospelým jedincom viac-menej všetkých dôležitých gastroenterálnych nematód ako aj ostatným parazitujúcim červom (Köhler 2001).

Benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktóny sú najdôležitejšími chemickými rodinami, ktoré sa používajú na kontrolu infekcií spôsobených helmintmi. Sila väčšiny anthelmintík závisí na ich afinite ku špecifickému receptoru a tiež na kinetických vlastnostiach látky, aby pôsobila na organizmus v efektívnej koncentrácii.

2.2.1 Benzimidazolové anthelmintiká

Zlúčeniny s benzimidazolovým základom sú prakticky najpoužívanejšie anthelmintiká. Príbeh tejto veľkej skupiny úspešných a účinných liečiv sa začal predstavením thiabendazolu v roku 1961 ako prvého širokospektrého anthelmintika.

Predchádzajúce štúdie týchto zlúčenín u helmintov ukázali, že spôsobujú ultraštruktúrne zmeny v intestinálnych bunkách oblých červov a tegumentálnych bunkách pásomníc. Na základe miznutia cytoplazmatických mikrotubúl bolo usúdené, že benzimidazoly (BZD) vedú k inhibícií mikrotubulmi sprostredkovanému transportu sekrečných vezikúl v absorpčnom tkanive helmintov. Tieto liečivom navodené fyziologické reakcie boli podporené pozorovaním, keď letálny účinok flubendazolu na *H. contortus* bol spojený s inhibíciou transportu sekrečných vezikúl v črevách a následným rozptýlením ich obsahu do cytoplazmy. Dnes je jasné, že biochemickým základom pôsobenia BZD je ich schopnosť viazať sa s vysokou afinitou na podjednotku mikrotubulu, na proteín tubulín, čím sa poruší štruktúra mikrotubulu i jeho funkcie.

Štúdie s kolchicínom ukazujú, že táto zlúčenina sa viaže na tubulín prednostne pri polymerizácií. Tubulín, nesúci kolchicín, na konci rastúceho mikrotubulu spôsobuje stratu schopnosti tejto podjednotky prijať ďalšiu molekulu tubulínu pre budúci rast mikrotubulu. Informácie získané z fluorescenčnej spektroskopie ukazujú, že kolchicín viažuce miesto je na monomére β -tubulínu. Podobný mechanizmus môže byť zodpovedný za inhibíciu polymerácie tubulínu u BZD a zdá sa, že viažuce miesto týchto látok je taktiež na β -tubulíne.

Mikrotubuly sú dynamické, všadeprítomné bunkové organely, ktoré slúžia rôznym vitálnym funkciám ako mitóza, pohyb a transport vo všetkých eukaryotických bunkách. Existuje dynamická rovnováha spojovania a rozpojovania podjednotiek. V takomto systéme interakcia liečivo-tubulín spôsobí posun tohto rovnovážneho stavu kedy dôjde k strate siete mikrotubulov a kumuluje sa voľný tubulín. Mikrotubuly hrajú kľúčovú rolu v rade dôležitých bunčných procesov a ich liečivom navodená deštrukcia môže viesť k zániku organizmu. Princíp vysokej selektívnej toxicity benzimidazolových anthelmintík nie je úplne jasný, ale zdá sa, že pri interakcií liečiva s helmintom je väzba omnoho sivejšia a ireverzibilná oproti väzbe na cicavčí tubulín (Köhler 2001).

Flubendazol je zástupcom BZD použitý v tejto práci. Mechanizmus účinku je totožný s ostatnými BZD. Chemicky, ekvivalent pre flubendazol je methyl-(5-(4-fluorobenzoyl)-1-H-benzimidazol-2-yl)karbamát. Je to širokospektrálne antiparazitikum účinné proti hlístam a pásomniciam a má tiež ovocidný účinok. Biologická dostupnosť flubendazolu je samozrejme závislá na dobe jeho kontaktu s parazitom v účinnej koncentrácii. U prežúvavcov je účinnosť všeobecne vyššia ako u monogastričných zvierat, vďaka dlhšiemu zdržiavaniu liečiva v gastrointestinálnom trakte.

2.2.2 Agonisti nikotínu

Sú najlepšie komerčne dostupné antinematóda, účinkujú na nervový systém parazita. Zástupci tejto skupiny pôsobia ako agonisti acetylcholínu spolu s levamizolom, terahydropyrimidinmi a niektorými ďalšími štrukturálne podobnými zlúčeninami. Pomocou elektrofyziologickej techniky boli odhalené nikotínové acetylcholínové receptory na povrchu somatických svalových buniek nematód. Tie môžu byť otvorené pomocou nikotínových anthelmitík, ktoré sa naviažu na rekogničné miesto excitačného receptora a spôsobia depolarizáciu a v konečnom dôsledku spastickú paralýzu svalov parazita a jeho vypudenie.

Selektívna toxicita týchto zlúčenín je založená na unikátnych vlastnostiach nikotínových receptorov nematód, ktoré sú farmakologicky odlišné od tých u vyšších cicavcov (Köhler 2001).

2.2.3 Makrocyclické laktóny

Táto skupina zlúčenín zahŕňa avermektiny (napr. ivermektin, doramektin) a nedávno objavené milbemyciny (moxidektin), ktorým chýba glykosidická substitúcia. Zástupcami oboch tried antiparazitík sú veľmi účinné antinematoda, insekticídy a akaricídy.

Štúdium efektu ivermektinu a moxidektinu na faryngeálnu pumpu u *H. contortus* dokázala, že obe látky majú rovnaký mechanizmus účinku, ale zdá sa, že sú jemné rozdiely v odpovedi cieľových skupín na jednotlivé liečivá. Antiparazitiká tejto skupina spôsobujú paralýzu somatickej svaloviny červa a inhibujú príjem potravy blokovaním faryngeálnej pumpy. Prerušenie stravovacej aktivity a vyhladovanie červa je skutočným nematocídnym účinkom

týchto zlúčenín. Fyziologickým miestom pôsobenia týchto látok je rodina glutamátových receptorov spojených s chloridovými kanálmi, ktorá je špecifická pre bezstavovce. Chloridové kanáli sú ionotropné inhibičné membránové proteíny, komplexy fylogeneticky súvisiace s GABA_A chloridovými kanálmi u stavovcov. Takže vo vyšších koncentráciách môže ivermektin interagovať nielen s chloridovými kanálmi nematod, ale tiež s GABA receptorom spojeným s chloridovým kanálom stavovcov, čo ukazuje, že tieto látky môžu byť toxické pre stavovce s poškodenou hematoencefalickou bariérou.

Zdá sa, že ivermektin pôsobí ako agonista glutamátu a predlžuje otvorenie receptora. Po naviazaní ivermektinu dôjde k ireverzibilnému prúdu chloridových iónov, a teda hyperpolarizácií membrány, čo spôsobí paralýzu svalstva (Köhler 2001).

2.2.4 Praziquantel

Praziquantel je voľbou pre liečbu schistosomiázy. Posledných 20 rokov skúmania potvrdilo, že poskytuje bezpečnú a efektívnu liečbu nielen schistosomiázy, ale pôsobí aj na infekcie spôsobené oblými červami. Praziquantel predstavuje úplne novú štruktúru v liečbe anthelmintikami, ktorá nie je podobná žiadnej štruktúre ostatných liečiv pre liečbu parazitóz. Jeho pôsobenie na parazity spôsobuje okamžitú kontrakciu svalov a vakuolizáciu tegumentu. Tieto zmeny súvisia s pohybom kalcia cez membránu tegumentu, takže sa predpokladá, že miestom účinku tohto liečiva je vápnikový kanál membrán (Köhler 2001).

A ostatné anthelmintiká

2.2.5 Rezistencia

Rezistenciou chápeme, keď väčšie množstvo jedincov v populácií je schopné tolerovať takú dávku liečiva, ktorá by bola pre normálnu populáciu rovnakého druhu smrteľná (Prichard et al. 1980).

Rozšírené používanie a nevhodné dávkovanie anthelmintik vedie v spojení s ďalšími faktormi k liekovej rezistencii, ktorá znamená hrozbu

v liečbe helmintóz. Znalosť mechanizmu účinku anthelmintika a rozvoja rezistencie môže byť využitá pri hľadaní ciest k prekonaniu parazitárnej rezistencie alebo pri vývoji nových liečiv (Köhler 2001).

Liečba infekcií spôsobených helmintami začala byť problematickou práve kvôli častej rezistencii parazitov. Vývoj rezistencie na liečivá môže byť uľahčená činnosťou enzýmov metabolizujúcich xenobiotiká.

2.3 Biotrasformácia xenobiotík u helmintov

Behom svojho životného cyklu prichádza parazit ako aj iné organizmy do kontaktu s množstvom rozličných látok, tie, ktoré však neplnia žiadnu fyziologickú funkciu a môžu byť i toxické, nazývame xenobiotiká. Pre parazitov sú takýmito látkami predovšetkým anthelmintiká, sekundárne metabolity z hostiteľskej stravy, zložky imunitnej odpovede hostiteľa alebo polutanty (Precious, Barrett 1989).

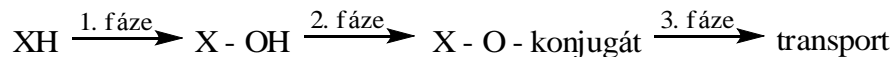
Po absorbovaní je xenobiotická zložka buď vylúčená bez zmeny, alebo môže byť zmenená neenzymaticky. To sa napríklad stane, keď je xenobiotikum vystavené určitým fyziologickým podmienkam ako vysoké alebo nízke pH, alebo dôjde ku kontaktu s reaktívnou molekulou (Barrett J. 1997). V organizme, je ale väčšina týchto xenobiotík metabolizovaná špecifickými enzýmami na polárnejšie zlúčeniny, ktoré sú potom ľahšie vylúčené von. Xenobiotiká sú metabolizované v troch fázach.

V prvej fáze hydrolytické, oxidačné alebo redukčné enzýmy zavedú reaktívne skupiny ako napr. hydroxylové, karboxylové, aminoskupiny alebo thiolové skupiny do molekuly xenobiotika.

V druhej fáze je molekula konjugovaná s nízkomolekulárnou zlúčeninou napr. aminokyselinou, cukrom, glutathionom, anorganickým (sulfát, fosfát) alebo organickým iónom (acetát, propionát). Konjugácia normálne zvyšuje rozpustnosť zlúčeniny vo vode a znižuje jej chemickú reaktivitu (hoci u molekúl typu proliečiva to neplatí, dochádza k tzv. aktivácii liečiva. (Barrett 1997)).

Aktívny transport zlúčeniny, metabolitov alebo konjugátov cez membrány pomocou špeciálnych proteínových transportérov je teraz považovaný za tretiu fázu metabolizmu xenobiotík (Cvilink et al. 2008).

Xenobiotiká líšiace sa polaritou majú odlišnú cestu biotransformácie. Pokiaľ je xenobiotikum dostatočne polárne, je z organizmu eliminované bez zmeny, prípadne len reaguje za vzniku konjugátu, ktorý je následne z organizmu vylúčený. Pokiaľ však xenobiotikum vykazuje vyššiu lipofilitu, musí byť enzymaticky „upravené“ v prvej a druhej fáze, aby mohlo byť následne vylúčené. Schematicky znázornený priebeh biotransformácie:



Obr.č.1 : Schéma biotransformácie xenobiotík

Hlavný rozdiel fázy 2 oproti fázy 1 je jej syntetický charakter. Konjugácia má endogénny charakter a je závislá na dodávke energie. Reakcie 2. fázy tak výrazne zvyšujú polárny charakter molekuly a stupeň ionizácie je už takmer úplný, takže konjugát už nie je schopný prenikať do buniek a je efektívne vylúčený (Barnová et al. 1991) pomocou špecifických proteínových prenášačov. ABC (ATP-binding cassette) prenášače hrajú kľúčovú úlohu vo vylučovaní xenobiotík ako aj organizmu vlastných látok.

Všetky tri systémy – enzýmy prvej fázy, konjugačné enzýmy a transportéry, slúžia na detoxikáciu potenciálne nebezpečných xenobiotík. Mechanizmy detoxikácie u parazitujúcich červov neboli doteraz rozsiahle študované, navzdory ich obrovskému významu pre vývoj liekov a liekovú rezistenciu (Cvlink et al 2008).

2.3.1 Biotransformačné enzýmy

Alkoholy, aldehydy a ketóny sú často metabolizované prostredníctvom činnosti reduktas (dehydrogenas). Substrátom týchto enzýmov nie sú len xenobiotiká, ale aj množstvo endogénnych zlúčenín. Biotransformácia redukciami je menej častá ako oxidácia, ale v prípade ketónov, aldehydov, chinónov, nitrozlúčenín, N- alebo S-oxidov, redukcia predstavuje hlavnú cestu ich metabolizmu.

Asi najdôležitejšie enzýmy zapojené do prvej fázy biotransformácie sú cytochromy P450. Tisíce týchto heme proteínov odlišnej štruktúry bolo identifikovaných a zaradených do niekoľkých rodín a podrodín podľa podobnosti

sekvencie génov. Cytochromy obvykle katalyzujú mono-oxidáciu substrátov, ale sú tiež schopné chovať sa ako peroxidasy alebo reduktasy.

Favin obsahujúce monooxygenasy sprostredkovávajú oxidáciu veľkého množstva xenobiotík. Preferujú substráty s nukleofilným dusíkom alebo atómom síry.

Peroxidasý, monoamínové a xantínové oxidasy predstavujú ďalšiu skupinu enzýmov, ktoré dokážu katalyzovať oxidáciu xenobiotík.

Niektoré xenobiotiká vo forme esterov, amidov alebo epoxidy spadajú pod hydrolytickú biotransformáciu. Primárnou funkciou hydrolas je predovšetkým endogénny metabolizmus, aj keď niektoré sa môžu podieľať na hydrolýze xenobiotík.

Glukuronidácia je najbežnejšia cesta konjugácie cicavcov. Enzýmy zapojené v tomto procese sú UDP-glukurové transferasy dvoch genových rodín. Typickými substrátmi sú xenobiotické alebo eubiotické alkoholy, fenoly a karboxylové kyseliny.

Elektrofilné zlúčeniny sú väčšinou konjugované s glutathionom prostredníctvom činnosti glutathion-S-transferas. Tieto všadeprítomné enzýmy chránia biomolekuly pred škodlivými elektrofilmi (Cvilink et al. 2008).

2.3.1.1 Redukčné enzýmy

Na rozdiel od oxidas, reduktasy a hydrolasy boli veľa rokov považované za dôležité biotransformačné enzýmy xenobiotík u červov (Barrett 1997).

Redukcia reprezentuje dôležitý spôsob metabolizmu zlúčenín obsahujúcich karbonylovú skupinu. Karbonylové zlúčeniny sú v prírode veľmi rozšírené a predstavujú pre organizmus vážnu hrozbu, pretože sa dokážu kovalentne viazať so sekundárnymi aminoskupinami a thiolovými skupinami proteínov. Niektoré aldehydy môžu byť mutagénne vďaka ich schopnosti interagovať s DNA bunky.

V bunke je ochrana proti reaktívnym karbonylovým zlúčeninám zaistená niekoľkými rodinami detoxikačných enzýmov, zahrňujúcich aldo-ketoreduktasy (AKR), aldehyddehydrogenasu, aldehydoxidasu, alkoholdehydrogenasu a glutathion-S-transferasu (O'Connor 1999).

Redukčné enzýmy radíme do troch nadrodín:

- Dehydrogenasy/reduktasy s krátkym reťazcom (SDR)
- Dehydrogenasy/reduktasy so stredne dlhým reťazcom (MDR)
- Aldo-ketoreduktasy (AKR)

Nadrodina SDR je rozsiahla skupina NAD(P)H-dependentných oxidoreduktas. A aj keď majú s AKR úplne odlišnú trojrozmernú štruktúru, katalytické mechanizmy týchto dvoch nadrodín sa zdajú byť analogické.

Nadrodinu AKR tvorí viac než 120 proteínov, sú väčšinou monomérne o dĺžke asi 320 aminokyselín. Štruktúra sa vyznačuje charakteristickým usporiadaním 8 α -helixov a 8 β -skladaných listov do tzv. súdku.

Karbonyl redukujúce enzýmy sú NAD(P)H-dependentné a substrátovo špecifické. Na základe podobnosti sekvencie aminokyselín rozdeľujeme AKR do rodín (>40% zhoda aminokyselín) a do podrodín (>60% zhoda).

Označenie aldo-ketoreduktas obsahuje základný symbol „AKR“, arabskú číslicu predstavujúcu rodinu, písmeno označujúce podrodinu a ďalšia arabská číslica reprezentuje jedinečnú proteínovú sekvenciu (Jez et al. 1997).

Najväčšou rodinou je AKR1, zahrňuje aldehydreduktasy, aldoreduktasy a hydroxysteroiddehydrogenasy.

Reduktasy karbonylovej skupiny patria medzi významné biotransformačné enzýmy, aj keď dlhé desaťročia stáli bokom hlavného záujmu xenobiochemikov a farmakológov. Substráty reduktas karbonylovej skupiny nie sú len xenobiotiká, ale aj množstvo významných endogénnych látok. Štúdium enzýmov redukujúcich karbonylovú skupinu zlúčenín je dôležité nielen pre predpoveď metabolizmu liečiv s touto skupinou v organizme, ale tiež pre poznanie možnosti ich ovplyvnenia (Connor et al. 1999).

Ľudské reduktasy karbonylovej skupiny sú momentálne intenzívne skúmané (napr. Mordente et al. 2003, Thomas et al. 2004). Oproti tomu u hospodárskych zvierat, alebo parazitov, sú súčasné znalosti o reduktasach karbonylovej skupiny a ich modulácií stále prakticky nulové.

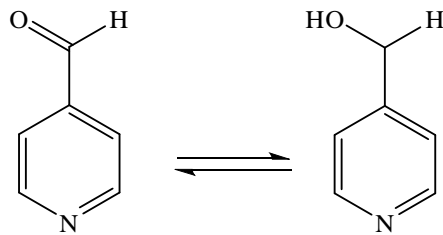
Vybrané substráty reduktas

Ako substráty boli vybrané 4-pyridinkarboxaldehyd, D,L-glyceraldehyd a acenaftenol, ktoré sú špecifické pre hlavné ľudské reduktasy karbonylovej skupiny.

4-pyridinkarboxaldehyd

4-pyridinkarboxaldehyd je redukovaný v cytosolickej frakcii ľudskej pečene aldehydreduktasou (AKR1A1). V mikrosomalnej frakcii je redukovaný 3 α -HSD (Maser 1995).

Jedná sa o kvapalnú látku ($M_r = 107$ g/mol), ktorá sa dobre miesi s vodou.



Obr. č. 2: Redukcia 4-pyridinkarboxaldehydu na 4-pyridylkarbinol

D,L-glyceraldehyd

D,L-glyceraldehyd je endogénny substrát redukovaný v cytosole väčšiny cicavčích orgánov na glycerol. Túto biotransformáciu katalyzuje aldehydreduktasa AKR1A1 (Kawamura et al. 1999).

Jedná sa o pevnú látku ($M_r = 90$ g/mol), ktorá je obtiažne rozpustná vo vode a dobre rozpustná v dimetylsulfoxide (DMSO).

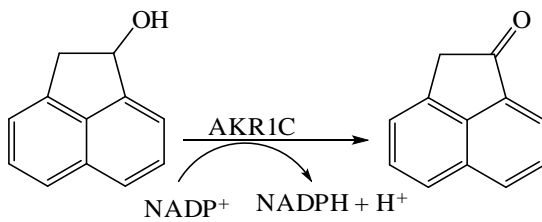


Obr.č. 3: Redukcia D,L-glyceraldehydu na glycerol

Acenaftenol

Acenaftenol sa pôsobením cytosolických aldo-ketoreduktas AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4 oxiduje na acenaftenon a súčasne sa $NADP^+$ redukuje na NADPH.

Jedná sa o látku ($M_r = 170$ g/mol), ktorá je dobre rozpustná v DMSO.



Obr. č. 4: Oxidácia acenaftenolu na acenaftenon

2.3.1.2 Cytochromy P450

Cytochrom P450 sa vyskytuje takmer vo všetkých živých organizmoch. Na subcelulárnej úrovni je viazaný na membrány hladkého endoplazmatického retikula a mitochondrií. Spoločne s redukčnými enzýmami biokatalyzujú reakcie, pri ktorých sa mení redoxný stav substrátu.

Cytochromy P450 ako monooxygenasy katalyzujú oxidáciu radu endogénnych a exogénnych zlúčenín, fungujú tak, že konečná oxidasa získava elektróny z NADPH prostredníctvom NADPH-cytochrom P450-reduktasy alebo z NADH prostredníctvom cytochromu b₅. Reakcia vyžaduje molekulárny kyslík. Cytochrom (CYP) sprostredkováva oxidačné reakcie endogénnych zlúčenín i oxidačné reakcie prvej fázy biotransformácie xenobiotík. Jedna látka môže byť substrátom pre niekoľko isoformiem enzýmu a naopak jedna isoforma môže mať niekoľko substrátov rôznych štruktúr.

Zatiaľ čo cytochromy P450 sú veľmi rozšírené v prírode, pokusy detegovať ich u paraziticky alebo voľne žijúcich červov boli až donedávna neúspešné. Usudzovalo sa, že monooxygenasy P450 sú u helmintov substituované peroxidasami alebo nejakými inými oxidačnými enzýmami ako sú flavinové monooxygenasy a neprítomnosť CYP450 môže súvisieť s anaeróbnou alebo mikroaeróbnou povahou parazitov (Barrett 1997). Pokrokom v genetickej analýze bol tento názor zmenený a dokázal existenciu génov CYP v genóme *Caenorhabditis elegans*.

Expresia niektorých génov pre CYP35 jednoznačne vzrástla, keď bol jedinec *C. elegans* vystavený pôsobeniu známych induktorov CYP ako napr. klobibrat, atrazin, ftalat, alebo ťažké kovy. Navzdory tejto skutočnosti sa veľmi málo vie o zapojení odpovedajúcich CYP35 enzýmov do biotransformácie xenobiotík (Menze et al. 2005).

2.3.1.3 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy (GST) sú multifunkčné proteíny, katalyzujú konjugáciu elektrofilných substrátov s glutathionom. Tiež sa podieľajú na neutralizácií a detoxikácií substrátov z činnosti peroxidas. Na subcelulárnej úrovni sa sú lokalizované prevažne v cytosole. Jedná sa o diméry s molekulovou hmotnosťou asi 50 kDa. Každý monomér má väzobné miesto pre glutathion (G-site) a pre vodík (H-site). Transferasy sú obvykle prítomné v tkanivách ako série isoenzýmov, ktoré môžu byť buď homo- alebo heterodiméry. Isoenzými sú väčšinou špecifické pre jednotlivé tkanivá.

Organizmy vykazujú mnoho foriem GST ako následok ich rozličných úloh. Činnosti GST zahrňujú tiež ochranu tkanív proti poškodeniu oxidáciou, spôsobenou reaktívnymi peroxidasami, ktoré pochádzajú buď z endogénneho metabolizmu parazita, alebo od imunitného systému hostiteľa. A taktiež hrajú úlohu ako determinanty bunecnej odpovede na stres (Hayes and Strange 1995, Wilce and Parker 1994).

Hoci u helmintov boli pozorované podobné GST s tými u cicavcov, existujú špecifické miesta enzýmu s rozdielnou štruktúrou (Sheehan et al. 2001).

Aktivita transferas u gastrointestinálnych parazitov je vyššia než u krvných alebo iných parazitov. To pravdepodobne súvisí s cytoplasmatickým tegumentom Cestod a Nematod, ktorý ich robí zraniteľnejšími voči účinkom xenobiotík a sekundárnych metabolitov v GIT hostiteľa.

Existuje množstvo správ, ktoré jasne ukazujú fakt, že aktivita GST, vrátane GST u helmintov, môže byť ľahko modulovaná expozíciou xenobiotikom. Výsledok takej expozície závisí na povahe modulujúceho činiteľa a môže viesť k zníženiu enzýmovej aktivity alebo k jej zvýšeniu (Vande Waa et al. 1993). Expresia GST môže byť ľahko indukovaná liečbou množstvom látok vrátane známych i potenciálnych kancerogénov, liečiv a metabolitov oxidatívneho stresu (Hayes and Pulford 1995).

U pásomnic (*H. diminuta*) vzrastajú hladiny GST po expozícií fenobarbitalom, a je tiež dôkaz o indukcií aktivity GST xenobiotikom u *Echinococcus granulosus* a *Schistosoma mansoni* a u mnoho ďalších.

Čo sa týka inhibície, poznáme rôzne látky inhibujúce aktivitu GST, zatiaľ neexistuje žiadny inhibítor špecifický ku GST helmintov, ktorého pomoc by sa využila k liečbe parazitóz (Cvilink et al 2008).

GST je súčasťou antioxidantného ochranného systému parazita a aby bol aj efektívny, musí operovať blízko povrchu parazita, teda v tkanivách, ktoré prichádzajú do kontaktu so xenobiotikami alebo ktoré sú rozhodujúce pre reprodukciu.

2.3.1.4 UDP-glukuronosyltransferasa

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) sú rodinou enzýmov 2. fázy metabolizmu. Na subcelulárnej úrovni sa nachádzajú na membránach hladkého a drsného endoplasmatického retikula v blízkosti CYP. Predpokladá sa, že aglykon viažuce miesto je na N-konci polypeptidu UGT. Tu enzýmy vykazujú najväčšiu variabilitu medzi jednotlivými UGT isoenzýmami (Coffman et al. 1996).

Kofaktorom UGT je UDP-glukuronová kyselina, ktorá vzniká dehydrogenáciou UDP-glukosy (hoci v tejto práci sa u *H. contortus* použila UDP-glukosa ako výhodnejší kofaktor. Vid'. Výsledky.)

Vzniklé konjugáty sú väčšinou polárne, disociované, smerujú ku zníženiu biologickej aktivity a distribúcie a ku zvýšeniu exkrécie z tela.

2.3.2 Ovplyvnenie biotrasformačných enzýmov ich indukciou alebo inhibíciou

Indukcia

Enzýmová indukcia má významnú úlohu vo vývoji a diferenciácií buniek, v regulácií kľúčových metabolických dejov, zasahuje do mechanizmu účinku mnohých hormónov a je aj adaptívnou odpoveďou organizmu na niektoré xenobiotiká, ktorou sa chráni pred ich kumuláciou a toxicitou (Kvasničková, Šroler, 1992). V užšom slova zmysle indukcia znamená zvýšenie tvorby mRNA a následnú syntézu špecifického enzýmu po podaní induktora. Pre väčšinu enzýmov je induktorom ich substrát.

Zvýšenie aktivity biotransformačných enzýmov u parazita môže predstavovať výhodnú obrannú stratégiu parazita (Robinson et al. 2004).

Práve kontakt parazitov s nízkymi dávkami anthelmintik vedie k iniciácií obranných mechanizmov a následne k zníženiu citlivosti parazitov (Geerts and Gryseels 2000). Rozsah indukcie závisí na vlastnostiach xenobiotika, jeho koncentrácií a dobe pôsobenia.

V prípade liečby helmintóz sa zvýšením aktivity biotransformačných enzýmov hostiteľa znižujú plazmatické hladiny anthelmintik, čo v konečnom dôsledku môže viesť k zlyhaniu farmakoterapie. A indukcia biotransformačných enzýmov hostiteľa tak môže nepriamo prispievať k vývoju liekovej rezistencie parazitov.

Existuje veľa druhov mechanizmov navodenia rezistencie. Napr. u niekoľkých kmeňov *Haemonchus contortus* rezistentných na niektoré benzimidazolové anthelmintiká bola preukázaná mutácia v géne pre β -tubulín (Kwa et al. 1994), ktorá chráni mikrotubuly parazita pred atakom týchto liečiv. Inou účinnou obrannou stratégiou helmintov je modulácia aktivity membránových transportérov, čím sa buď zníži prestup anthelmintika do organizmu parazita, alebo sa naopak zvýši aktívne odstránenie liečiva z parazita (Kerbouf et al. 2003).

Napriek intenzívnemu štúdiu množstvo mechanizmov navodenia rezistencie zostáva neobjasnených.

Inhibícia

Enzýmová inhibícia môže prebiehať rôznymi mechanizmami. Enzýmy sa špecificky inhibujú mnohými molekulami, čo predstavuje jednu z ciest regulácie metabolizmu jedinca. Inhibícia môže byť reverzibilná alebo ireverzibilná v závislosti na sile väzby inhibítora na enzým.

Kompetitívna inhibícia medzi dvomi xenobiotikami, ktoré sú biotransformované rovnakým enzýmom, trvá len krátku dobu. Alebo môže dôjsť k tvorbe komplexu enzým-intermediálny metabolit, ale k obnoveniu katalytickej aktivity dochádza až po disociácií tohto komplexu. Autokatalytická inaktivácia je ireverzibilnou inhibíciou a k obnoveniu katalytickej aktivity dochádza až po syntéze nového enzýmu.

Rôzne xenobiotiká môžu vystupovať ako špecifické alebo nešpecifické inhibítory. Rozhodujú ešte ďalšie okolnosti ako napr. koncentrácia xenobiotika, ktorá môže spôsobiť, či bude xenobiotikum induktorom alebo inhibítorom (Baliharová et al. 2005).

3. CIEĽ PRÁCE

Diplomová práca sa zaoberá úlohou biotransformačných enzýmov v navodení rezistencie parazitujúcich červov na benzimidazolové anthelmintika. Jej cieľom je zistiť ovplyvnenie týchto enzýmov kontaktom so xenobiotikom v menšej ako terapeutickej dávke. Jednotlivé ciele môžeme rozčleniť do nasledujúcich bodov:

- Zistiť aktivity biotransformačných enzýmov parazita *Haemonchus contortus* voči flubendazolu a ďalšími špecifickými substrátmi
- Sledovať zmeny v aktivite týchto enzýmov v závislosti na kontakte parazita s flubendazolom
- Porovnať tieto zmeny v závislosti na danej dávke liečiva
- Zhodnotiť vplyv xenobiotika na indukciu biotransformačných enzýmov a jeho podiel na rozvoji rezistencie

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Biologický materiál

Experimentálne infikovanie oviec parazitom *Hamonchus contortus*

Pre výskum bol použitý *H. contortus* ISE kmeň. Tento kmeň je citlivý na anthelmintiká (Roos et al. 2004) a bol izolovaný z prostredia predtým ako sa benzimidazolové anthelmintiká dostali na trh. Citlivosť jedincov *H. contortus* ISE línie na FLU bola dokázaná použitím vývojového testu lariev. Každý zo šestnástich zdravých baranov ovce (*Ovis aries*), 5-6 mesiacov starých, bol orálne infikovaný 5500 L₃ larvami *H. contortus*. Vývoj *H. contortus* na dospelé jedince bol vedecky sledovaný.

Liečba baránkov FLU

Flubenol (50% FLU premix, Janssen Pharmaceutica, Belgicko) a Avicel RC-591 (mikrokryštalická celulóza, FMC, Belgicko) boli použité pre prípravu vodnej suspenzie podanej zvieratám (Šavlík et al. 2007).

Osem týždňov po infikácií boli ovce rozdelené do štyroch skupín (4 jedinci v každej skupine). Suspenzie obsahujúce FLU a bez FLU boli aplikované zvieratám orálne pomocou dávkovača pre tekuté farmaceutiká. Každé zviera bolo liečené tromi dávkami podanými každých 24 hodín po dobu troch po sebe nasledujúcich dní. Taký istý objem (0,75 ml) na kilogram živej váhy bol aplikovaný všetkým zvieratám.

Zvieratá v kontrolnej skupine boli liečené rovnakou suspenziou bez FLU. Jednotlivé dávky podané zvieratám v ostatných skupinách obsahovali 0,25 (FLU 0.25), 0,5 (FLU 0.5) a 1,00 (FLU 1.00) mg FLU na kilogram živej váhy za deň. Všetky experimenty boli schválené Etickou komisiou Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy.

Zhromaždenie vlasoviek

Vlasovky boli izolované z hositeľa 24 hodín po podaní poslednej dávky FLU. Takže vlasovky v abdomase (sleze) boli vystavené pôsobeniu FLU približne 68-70 hodín. Zvieratá boli omráčené a okamžite zbavené krvi v súlade s pravidlami pre porážku hospodárskych zvierat v Českej republike. Abomasa

bola odobraná a transportovaná v teplom kúpeli (38°C) do laboratória. Dospelé jedince vlasoviek boli izolované z ovčej abomasy použitím agarovej metódy (Van Wyk et al 1980). Takto izolované dospelé jedince *H. contortus* boli opakovane premyté v 0,1M fosfátovom tlmivom soľnom roztoku pH 7,4 a živé (pohybujúce sa) červy boli rýchlo zmrazené na -80°C.

4.2 Chemikálie, prístroje a pomôcky

Chemikálie

- NADPH
- NAD
- D,L – glycerinaldehyd
- 4 - pyridinkarboxaldehyd
- Acenftenol
- Flubendazol
- 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
- Detergent Slovasol
- Glutathion
- p-nitrofenol
- UDP-glukuronová kyselina
- UDP-glukosa
- Set pre stanovenie bielkoviny metódou s BCA
- Ostatné bežné chemikálie

Prístroje

- spektrofluorimetr Perkin Elemer LS 50B
- spektrofotometr Helios β
- Eppendorf centrifuge 5415D
- Thermomixer Comfort
- SO-LOW- ultra low freeze
- MILLIPORE –pre výrobu ultračistej vody
- Analytické váhy Scaltec SBC 22

- Predvážky Kern KB
- Ph-meter Thermo Orion
- Čítačka Biorad, MicroPlate Reader 550
- Trepačka IKA MS2 Minishaker
- Ultrazvuková kúpeľ

Pomôcky

Laboratórne sklo (Erlenmayerove a odmerné banky, odmerný valec, kadičky), automatické pipety, lyžičky a navažovacia kopijstka, nožnice, parafilm, kyvety pre spektrofotometrické stanovenie, multikanálová pipeta, pipetovacie špičky, adový blok a ďalšie.

4.3 Pracovný postup /metodika/

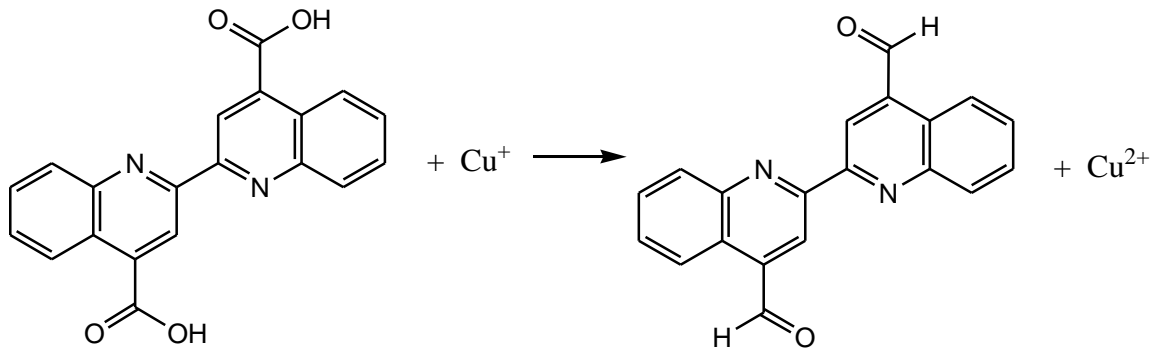
4.3.1 Príprava subcelulárnych frakcií z homogenátu vlasoviek

Vlasovky (5 gramov z každej skupiny oviec) boli rozmrazené v čas potreby a rýchlo zhomogenizované v pomere 1:6 (w/v) v 0,1 M sodno-fosfátovom pufri, pH 7,4 na Potter-Elvehjem homogenizátore a vystavené ultrazvukovým vibráciám na Sonopuls (Bandelin, Nemecko). Subcelulárne frakcie boli izolované pomocou čiastočnej ultracentrifugácie homogenátu v rovnakom pufri. Bol použitý bežný postup prípravy subcelulárnych frakcií z tkaniva cicavcov (Gillette 1972). V skratke, supernatant po dvoch centrifugáciach (5000 g po dobu 20 min. a 20000 g po dobu 60 min.) bol ešte následne ultracentrifugovaný (105000g po dobu 60 min.). Počas celej prípravy bola udržiavaná stála teplota 2-8°C. Mikrosomálna frakcia reprezentovaná sedimentom a cytosol, ako frakcia, reprezentovaný supernatantom pri 105000 g, boli jednotlivo uchovávané pri -80°C.

4.3.2 Stanovenie koncentrácie bielkoviny metódou s BCA

Princípom tejto metódy je reakcia proteínov s Cu^{2+} v alkalickom prostredí. Meď vo forme Cu^+ tvorí v prostredí okolo pH 10 stabilný modrofialový

komplex s BCA (bicinchoninic acid). Intenzita sfarbenia je priamo úmerná množstvu bielkoviny a meria sa spektrofotometricky pri 562 nm. Pre výpočet koncentrácie bielkoviny v skupine sa využije kalibračná priamka (Smith PK, Krohn RI Hermanson GT et al.,1985)



Obr.č. 5: Schematické znázornenie redukcie BCA mednými iónmi (Nožinová, 2003)

Pre reakciu boli použité komerčne dodávané roztoky A a B, ktorých zmiešaním v pomere 50:1 v čas pripravený pracovný roztok C.

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

Roztok B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Kalibračná závislosť bola zostrojená zmeraním absorbancií vzoriek hovädzieho albumínu (BSA) definovanej koncentrácie 0-1000 $\mu\text{g/ml}$. Pre každý bod bolo stanovených osem paralelných meraní. Ako štandard sa použil 1% roztok BSA.

Tab.1. Príprava šiestich koncentrácií BSA pre stanovenie kalibračnej priamky

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

Cytosol alebo mikrosomy sa nariadili 20x destilovanou vodou, takto boli urobené dve riedenia. Z každého riedenia boli odobrané 4 vzorky (=2x4paralelné merania pre jeden cytosol alebo mikrosomy).

Do mikrotitračnej doštičky bolo pipetované 10 µl vzorku bielkoviny danej koncentrácie a 200 µl pracovného roztoku C (za použitia multikanálovej pipety). Slepá vzorka obsahovala namiesto bielkoviny 10 µl redestilovanej vody.

Zmes bola dobre premiešaná a nechala sa inkubovať pri teplote 37 °C. Po 30-tich minútach bola na čítačke Biorad zmeraná absorbanca pri 562 nm proti redestilovanej vode a potom z hodnôt absorbanacie u jednotlivých skupín bol odčítaný priemer hodnôt absorbanacie slepých meraní.

4.3.3 Stanovenie aktivity reduktas/dehydrogenas karbonylovej skupiny

Stanovenie aktivity redukčných enzýmov je založené na premeraní poklesu absorbanacie spôsobeného premenou kofaktoru NADPH na NADP⁺ (alebo ako jej vzostup spôsobený premenou kofaktoru NADP⁺ na NADPH) vo vzorku pri 340 nm za laboratórnej teploty (25 °C). Pomocou zmien absorbanacie a molárneho absorpčného koeficientu NADPH/NADP⁺ $\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ môžeme kvantitatívne vyjadriť aktivitu reduktáz (Ohara et al 1995, Kawamura et al 1999, Felsted et al 1979, Penning et al 1984).

Pre stanovenie boli použité draselno-fosfátový pufo (0,1 M; pH 6,0) a TRIS-HCl pufo (0,1 M; pH 8,9). Draselno-fosfátový pufo bol pripravený

zlievaním 0,1 M KH_2PO_4 a 0,1 M K_2HPO_4 v pomere takmer 1:1 za stálej kontroly pH na pH-metri pri laboratórnej teplote. TRIS-HCl bol pripravený prillieváním 0,1 M HCl k 100 ml TRISu (1,21 g/ 100 ml) za kontroly pH na pH-metri. V čase meraní bol daný pufr temperovaný na 37 °C.

Roztok NADPH a roztok NADP^+ rozpustené v redestilovanej vode boli spoločne so vzorkami cytosolu alebo mikrosómov uchovávané v priebehu meraní v ľadovom kúpeli.

Substráty použité v tejto práci boli podľa fyzikálne-chemických vlastností rozpustené v dimethylsulfoxide (D,L-glyceraldehyd, aceneftenol) alebo v redestilovanej vode (4-pyridinkarboxaldehyd)

4.3.3.1 Redukcia D,L-glyceraldehydu

Pre meranie aktivity reduktas D,L-glyceraldehydu ($M_r=90$ g/mol) reakčná zmes v kyvete:

- 880 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)
- 10 μl substrátu (10,0 mM),
- 10 μl NADPH (0,3 mM),
- 100 μl enzýmov (cytosol).

Celkový objem reakčnej zmesi v kyvete bol 1 ml.

Na slepú vzorku tvorenú pufrom, substrátom a koenzýmom, bol vždy pred meraním spektrofotometer vynulovaný. Po pridaní každej zložky do kyvety bola reakčná zmes premiešaná. Reakcia bola odštartovaná pridaním enzýmu, hodnoty absorbancie boli zaznamenávané v čase 0-4 minút v minútových intervaloch vždy v troch paralelných meraniach.

4.3.3.2 Redukcia 4-pyridinkarboxaldehydu

Pre meranie aktivít reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu ($M_r=151$ g/mol, $\rho=1,222$ g/cm³) reakčná zmes v kyvete:

- 970 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0),
- 10 μl substrátu (1,0 mM),

10 μ l NADPH (0,1 mM),
10 μ l enzýmov.

Celkový objem reakčnej zmesi v kyvete bol 1 ml.

Na slepú vzorku tvorenú pufrom, substrátom a koenzýmom, bol vždy pred meraním spektrofotometer vynulovaný. Po pridaní každej zložky do kyvety bola reakčná zmes premiešaná. Reakcia bola odštartovaná pridaním enzýmu, hodnoty absorbancie boli zaznamenávané v čase 0-4 minút v minútových intervaloch vždy v troch paralelných meraniach.

Enzýmová aktivita [nmol/ml/min] bola vypočítaná pomocou Lambert-Beerova zákona. Špecifická aktivita bola získaná z enzýmovej aktivity na mg bielkoviny [nmol/mg/min].

4.3.3.3 Dehydrogenácia acenaftenolu

Pre meranie aktivít dehydrogenas acenaftenolu bola použitá spektrofluorimetrická metóda vyvinutá na katedre biochemických vied UK. Podstatou metódy je meranie vzostupu fluorescencie NADPH vzniknutého z kofaktoru NADP⁺ pri súčasnej oxidácii acenaftolu.

Obsah reakčnej zmesi:

970 μ l TRIS-HCL pufru (0,1 M; pH 8,9)
10 μ l acenaftenolu (Mr = 170,2 g/mol) rozpustený v DMSO
(1,5 mM v reakčnej zmesi)
10 μ l enzýmu
10 μ l NADP⁺ -štartovací koenzým (Mr = 787,4 g/mol) rozpustený
v redestilovanej vode (1 mM v reakčnej zmesi)
= celkový objem 1ml

Štandardný prídavok :

10 μ l NADPH (Mr = 833 g/mol) rozpustený v redestilovanej
vode (10 μ M v kyvete)

Prístroj: spektrofotometer Perkin Elmer LS 50B)

Paramete: excitácia 340 nm
emisía 460 nm

Napipetovaním pufra, substrátu, enzýmu daného množstva cytosolu bolo spustené meranie, pri lineárnom priebehu krivky (cca 20. sekunda) bol dopipetovaný koenzým. V 100. minúte bol ešte pridaný štandardný prídavok NADPH a meranie bolo ukončené asi v 120. minúte.

Pomocou programu boli odčítané hodnoty intenzity fluorescence na začiatku a na konci prídavku NADPH a smernica priamky jej nárastu.

Aktivita enzýmov bola vypočítaná podľa vzorca:

$$a = \frac{k \cdot n \cdot D}{B - A} \cdot 60$$

aaktivita [nmol/ml/min]

ksmernica priamky

Aintenzita fluorescence na začiatku prídavku NADPH

Bintenzita fluorescence na konci prídavku NADPH

nlátkové množstvo štandardného prídavku v 1ml

Dzriedenie cytosolu v reakčnej zmesi

60prepočet na minúty

Špecifická aktivita bola získaná vzťahnutím enzýmovej aktivity na mg bielkoviny [nmol/mg/min].

4.3.4 Stanovenie aktivity glutathiontransferasy (GST)

Metoda je založená na základe spektrofotometrického stanovenia tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu za minútu pri použití substrátu 0,1 M CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen) a 0,1 M glutathionu (GSH).

Substrát: 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzen ($M_r = 202,56$) v 95% etanole.
Pipetovaný objem bol 10 μ l

Konjugačné činidlo: 0,1 M redukovaný glutathion ($M_r = 307,33$) rozpustený v redestilovanej vode. Pipetovaný objem bol 10 μ l.

Pufor: 0,1 M fosfátový pufor pH 6,5 pripravený zmiešaním 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ s 0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v pomere približne 1:3 za kontroly pH na pH-metri. Pipetovaný objem bol 975 μl .

Vzorka enzýmov: 5 μl cytosolu

Prístroj: UV-VIS spektrofotometer HELIOS β , meranie pri 340nm.

Postup: Celkom 1 ml reakčnej zmesi, postupne pipetované pufor, GSH a cytosol, bol pretrepaný a reakcia bola zahájená pridaním substrátu (CNDB). Po následnom pretrepaní bol meraný nárast absorbancie pri 340 nm po dobu 4 minút. Vykonalo sa 5 paralelných meraní pre každú skupinu cytosolu a 2 paralelné merania pre slepé vzorky (miesto cytosolu bol pridaný pufor).

Pre výpočet aktivity enzýmu [nmol/ml/min] bol použitý rozdiel absorbancií vždy po 1 minúte, od ktorého bola odčítaná výsledná absorbancia slepeho vzorku a za použitia extinčného koeficientu $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Špecifická aktivita bola stanovená prepočtom na 1 mg bielkoviny [nmol/mg/min].

4.3.5 Stanovenie aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glucosyltransferasy (UGlCT) v mikrotitračných doštičkách

Princípom metódy je spektrofotometrické stanovenie premeny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid za enzymovej katalýzy UGT.

Substrát : 0,556 mM p-nitrofenol ($M_r = 139,11$) rozpustený v redestilovanej vode pomocou ultrazvuku. Pipetovaný objem bol 30 μl .

Konjugačné činidlo pre UGT : UDP-glukuronová kyselina ($M_r = 631,38$) rozpustená v redestilovanej vode

Konjugačné činidlo pre UGlCT: UDP- glukóza ($M_r = 610,3$) rozpustená v redestilovanej vode. Pipetovaný objem bol 30 μl

Tris-pufor pH 7,4: navážku rozpustiť v redestilovanej vode a pomocou 1M HCl upraviť pH na 7,4. Pipetovaný objem je 10 μ l

Vzorka enzýmov so známou koncentráciou proteínov. Pipetovaný objem 30 μ l.

Detergent: neionogénny detergent SLOVASOL rozpustiť v redestilovanej vode. Pipetovaný objem sa vypočítal podľa koncentrácie proteínov v mikrosómoch. Detergent : protein (w/w) = 1 : 2.

Stop roztok: 3% kyselina trichloroctová (TCA)

Neutralizačný roztok : 1M NaOH na neutralizáciu TCA

Detergent bol pridaný k 100 μ l mikrosómov a tento roztok bol potom 20 minút inkubovaný pri 4 °C. Pre jednu vzorku mikrosómov sa pripravilo 5 paraleliiek a 2 paralelné slepej vzorky (miesto UDP-GA alebo UDP-glc bola voda). Do mikroskúmaviek v ľadovej kúpeli bol pipetovaný TRIS-HCl pufor, p-nitrofenol, UDP-GA (resp. UDP-glc) a reakcia bola zahájená pridaním mikrosómov s detergentom. Všetko bolo poriadne premiešané a nechané inkubovať pri 37°C po dobu 20 minút. Inkubácia bola ukončená vyložením skúmaviek do ľadu a pridaním 50 μ l kyseliny trichloroctovej, čím došlo k deproteinizácií. Tento roztok bol potom centrifugovaný pri 5000 otáčkach za minútu cca 3 minúty. 50 μ l supernatantu sa prenieslo do jamiek mikrotitračnej doštičky, v ktorých je už pripravených 50 μ l NaOH . Po zafarbení obsahu jamiek bola absorbancia nezreagovaného p-nitrofenolu zmeraná na čítačke BioRad pri 415 nm. Hodnota absorbancie vzoriek bola odčítaná od hodnoty slepých vzoriek.

Výpočet aktivity bol stanovený pomocou extinkčného koeficientu p-nitrofenolu, pri zohľadnení zriedenia a prepočtu na 1 minútu. Hodnota bola ďalej vzťahovaná na 1 mg bielkoviny – špecifická aktivita enzýmov [nmol/mg/min].

4.3.6 Stanovenie aktivity reductáz flubendazolu

Metóda je založená na inkubácii cytosolu jednotlivých vzoriek s flubendazolom a následnej HPLC analýze metabolitov tohto substrátu.

Reakčná zmes (300 μ l) obsahovala:

100 μ l cytosolu

197 μ l NADPH zo zásobného 1mM roztoku NADPH v pufrí (0,1 M Na⁺-fosfátový pufr pH 7,4)

3 μ l flubendazolu s DMSO v koncentrácii 0; 0,5; 1,5; 3; 5 a 10 μ M

Do označených mikroskúmaviek boli napipetované uvedené množstvá cytosolu a koenzýmu s pufrom, potom bolo do nich v pravidelnom intervale (30 sekúnd) pripipetované 3 μ l flubendazolu postupne podľa koncentrácie. Boli pripravené vždy 2 chemicky slepé paralelky(bez FLU) a 5 paralelných meraní z každej vzorky a koncentrácie. Mikroskúmavky boli uzavreté, dobre pretrepané a uložené do thermomixera inkubovať pri 37°C. Po 60 minútach bola inkubácia ukončená pridaním 30 μ l konc. amoniaku. Následne bolo do zmesi pripipetované 700 μ l octanu etylnatého ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) a všetko bolo intenzívne pretrepané na trepačke po dobu 5 minút. Vzorky boli ešte stočené v centrifuge (presne 3 minúty, 5000 otáčok/min.) a potom bolo odobrané 600 μ l supernatantu do pripravených a označených vialiek. Organická fáza bola odparená na koncentrátore. Vialky s odparkom boli dobre zavíčkované a uchované v chlade na vyhodnotenie pomocou HPLC.

Štatistické hodnotenie

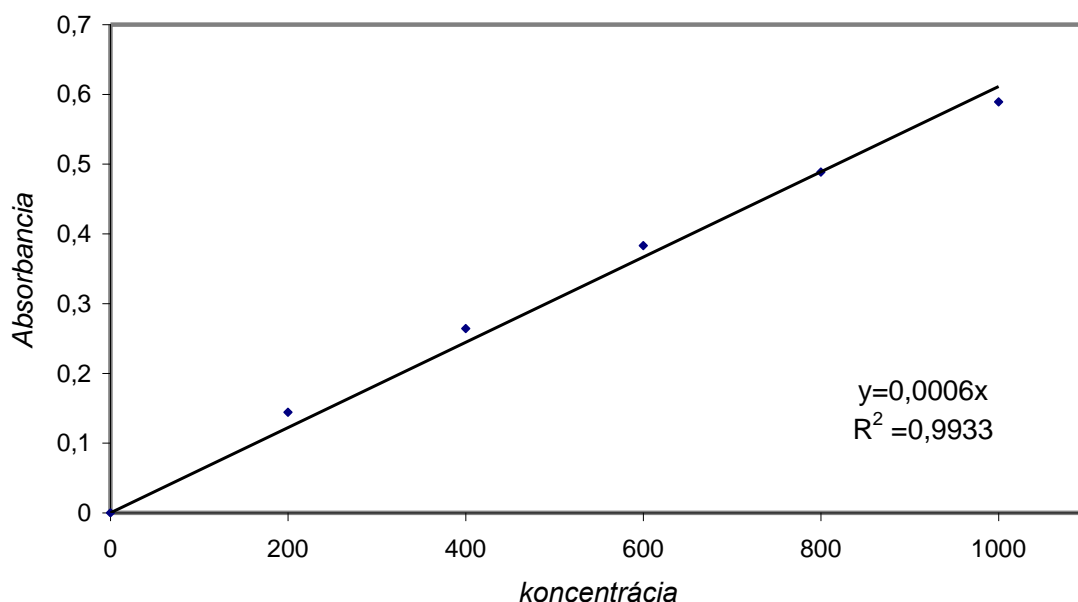
Studentov T-test – výsledky všetkých meraní boli štatisticky spracované nepárovým t-testom na hladine významnosti $h=0,95$.

Všetky hodnoty v tabuľkách sú uvedené ako stredné hodnoty \pm smerodajná odchýlka

5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovenie bielkoviny

Obsah bielkoviny v jednotlivých cytosolických a mikrosomálnych vzorkách bol stanovený metódou BCA (viz. Kapitola 4.3.1.). Po premeraní absorbancie presnej koncentrácie štandardného roztoku hovädzieho sérového albumínu, bola zostrojená kalibračná priamka. Zo smernice priamky (vid' obr.) boli potom vypočítané odpovedajúce hodnoty koncentrácie bielkoviny daných skupín.



Obr.č. 6: Kalibračná priamka. Závislosť absorbancie na koncentrácii bielkoviny

Získané hodnoty koncentrácií u jednotlivých skupín a príslušné smerodajné odchýlky, sú uvedené v tab. 2 a 3. Hodnoty boli ďalej použité pri prepočtoch na špecifické aktivity enzýmov.

Tab. 2: Obsah bielkoviny vo vzorkách cytosolu jednotlivých skupín

Skupina	Koncentrácia bielkoviny [mg/ml]
Kontrola	6,4
FLU 0.25	7,8
FLU 0.50	6,4
FLU 1.00	7,8

Tab. 3: Obsah bielkoviny vo vzorkách mikrosómov jednotlivých skupín

Skupina	Koncentrácia bielkoviny [mg/ml]
Kontrola	11,42
FLU 0.25	11,73
FLU 0.50	11,47
FLU 1.00	12,01

Subcelulárne frakcie Haemonchus contortus

Kontrola – u pokusných zvierat neliečených flubendazolom

FLU 0.25 – u pokusných zvierat liečených flubendazolom 1/60 terapeutickej dávky

FLU 0.50 - u pokusných zvierat liečených Flubendazolom, 1/30 terapeutickej dávky

FLU 1.00 - u pokusných zvierat liečených Flubendazolom, 1/15 terapeutickej dávky

5.2. Stanovenie aktivity reduktas

Experimentálne boli stanovené aktivity redukčných enzýmov v cytosole a mikrosomoch. V cytosolickej frakcii bola stanovená aktivita voči 4-pyridínkarboxaldehydu, DL-glyceraldehydu a acenaftenolu. V mikrosomálnej frakcii voči 4-pyridínkarboxaldehydu.

5.2.1 4-pyridínkarboxaldehyd

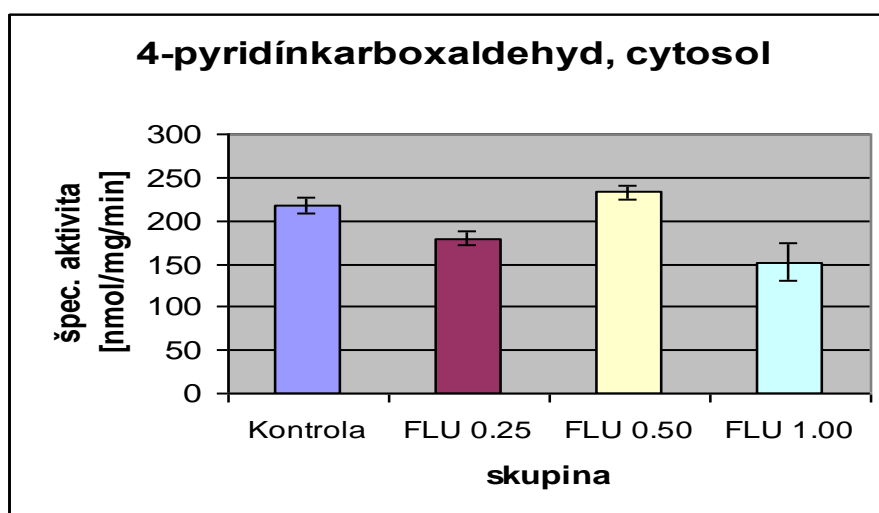
Na základe spektrofotometrickej metódy (viz kapitola 4.3.3.2) boli získané hodnoty aktivity cytosolických a mikrosomálnych enzýmov voči 4-pyridínkarboxaldehydu. Hodnoty v tabuľke 4 a 5 sú prepočítané na 1 mg bielkoviny a sú aritmetickým priemerom 3 paralelných meraní.

A) cytosol

Tab. 4: Špecifická aktivita reduktas cytosolickej frakcie voči 4-pyridínkarboxaldehydu

Skupina	Špecifická aktivita reduktas [nmol/mg/min]*
Kontrola	218 ± 9
FLU 0.25	179 ± 8
FLU 0.50	233 ± 8
FLU 1.00	152 ± 21

*aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka



Obr. č. 7: Grafické znázornenie špec. aktivít enzýmov jednotlivých skupín voči substrátu

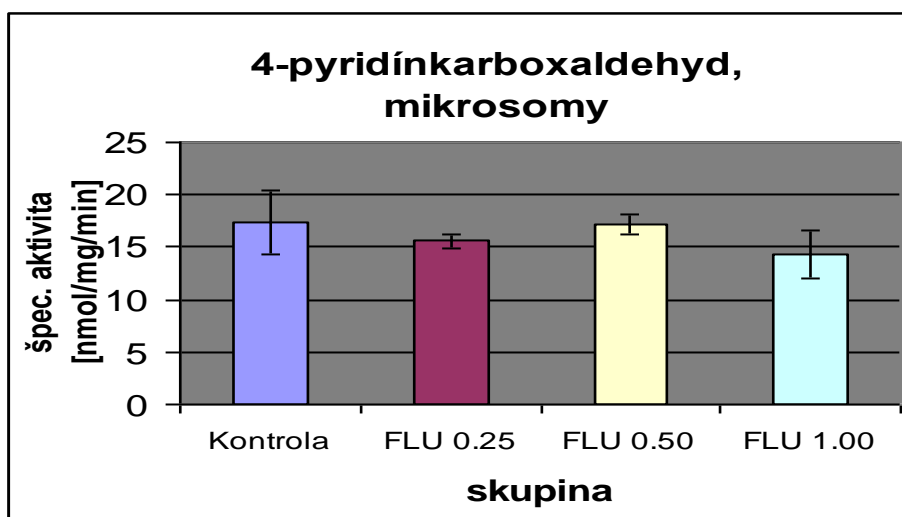
Z grafu je zrejмый pokles aktivity reduktas pre tento substrát v skupine FLU 0.25 a FLU 1.00. A naopak špecifická aktivita týchto enzýmov vzrástla v cytosolickej frakcii skupiny FLU 0.50. Všetky tri zmeny sú štatisticky významné.

B) mikrosomy

Tab. 5: Špecifická aktivita reduktas mikrosomálnej frakcie voči 4-pyridínkarboxaldehydu

Skupina	Špecifická aktivita reduktas [nmol/mg/min]*
Kontrola	17,4 ± 3,1
FLU 0.25	15,6 ± 0,7
FLU 0.50	17,2 ± 0,9
FLU 1.00	14,3 ± 2,2

* aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka



Obr. č. 8: Grafické znázornenie špec. aktivít enzýmov u jednotlivých skupín voči substrátu

Boli síce zaznamenané mierne zmeny špec. aktivity reduktas, podobne ako v cytosolickej frakcii pre tento substrát (pokles špecifických aktivít v skupine FLU 0.25 a FLU 1.00, a jej zvýšenie u FLU 0.50). Avšak žiadna zmena nie je štatisticky významná voči kontrolnej skupine.

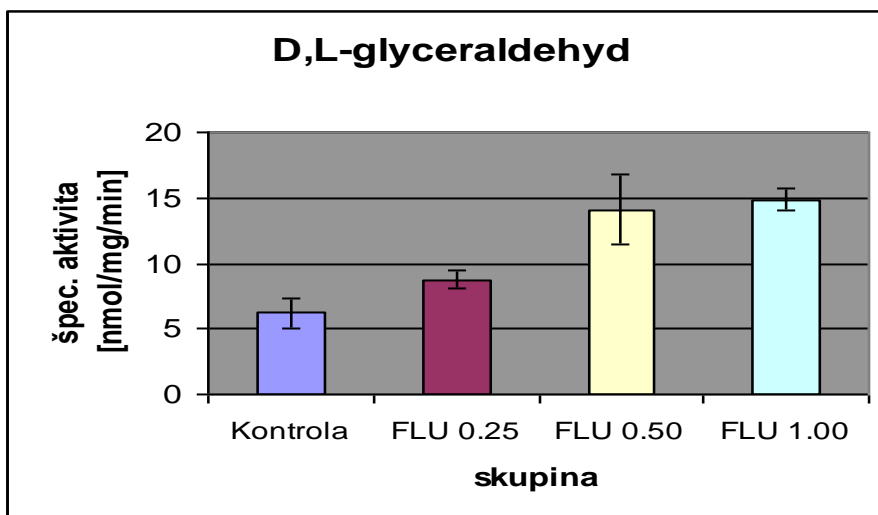
5.2.2 DL-glyceraldehyd

Spektrofotometrickým stanovením (viz. kapitola 4.3.3.1) získané aktivity cytosolických enzýmov pre jednotlivé skupiny voči DL-glyceraldehydu sú uvedené v tabuľke 6, hodnoty sú prepočítané na špecifickú aktivitu (1 mg bielkoviny) a sú aritmetickým priemerom 3 paralelných meraní každej zo vzoriek.

Tab. 6 Špecifická aktivita reduktas cytosolickej frakcie voči DL-glyceraldehydu

Skupina	Špecifická aktivita reduktas [nmol/mg/min]*
Kontrola	6,2 ± 1,2
FLU 0.25	8,8 ± 0,7
FLU 0.50	14,1 ± 2,6
FLU 1.00	14,9 ± 0,8

* aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka



Obr. č. 9: Grafické znázornenie špec. aktivít enzýmov u jednotlivých skupín voči substrátu

Pre D,L-glyceraldehyd bol zaznamenaný štatisticky významný vzrast špecfickej aktivity vo všetkých skupinách. Aj keď v skupine FLU 0.50 je kvôli odľahlej hodnote tato zmena nepreukázateľná. Najvyššie hodnoty špec. aktivity dosahovali enzýmy v skupine, ktorá bola liečená 1mg FLU na kg živej váhy (FLU 1.00), táto hodnota je viac než dvojnásobná v porovnaní s hodnotou špec. aktivity v kontrolnej skupine.

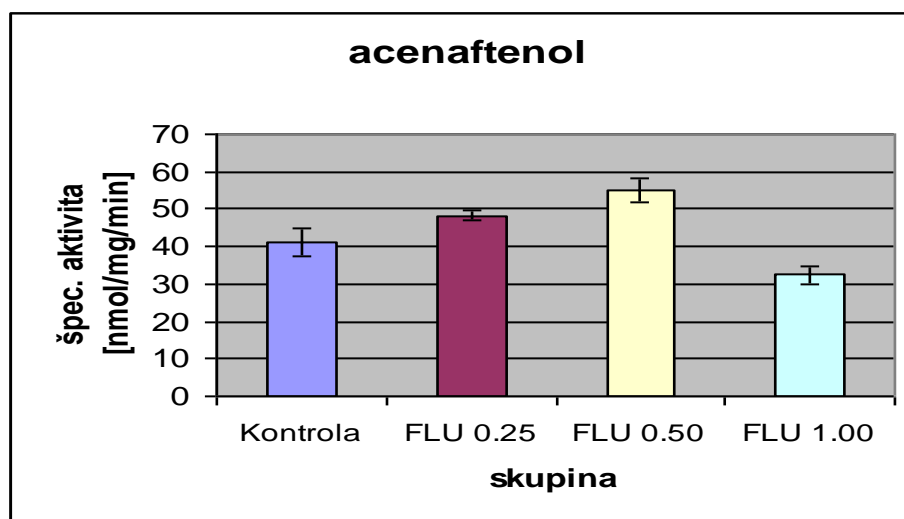
5.2.3 Acenaftenol

Hodnoty aktivity reduktas cytosolických enzýmov voči acenaftenolu boli získané spektrofluorimetrickou metódou (viz. Kapitola 4.3.2).

Tab. 7 Špecifická aktivita cytosolických reduktas voči acenaftenolu

Skupina	Špecifická aktivita reduktas [nmol/mg/min]*
Kontrola	41 ± 4
FLU 0.25	48 ± 1
FLU 0.50	55 ± 3
FLU 1.00	32 ± 3

*aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka



Obr. č. 10: Grafické znázornenie špec. aktivít enzýmov u jednotlivých skupín voči substrátu

V rámci merania špecifických aktivít reduktas voči acenaftenolu bola nameraná štatisticky nepreukázateľná odchýlka smerom k zvýšeniu aktivity enzýmov v skupine FLU 0.25. A potom štatisticky významné zmeny - a to v skupine FLU 0.5 nárast špec. aktivity reduktas a v skupine FLU 1.00 jej výrazný pokles voči kontrolnej skupine.

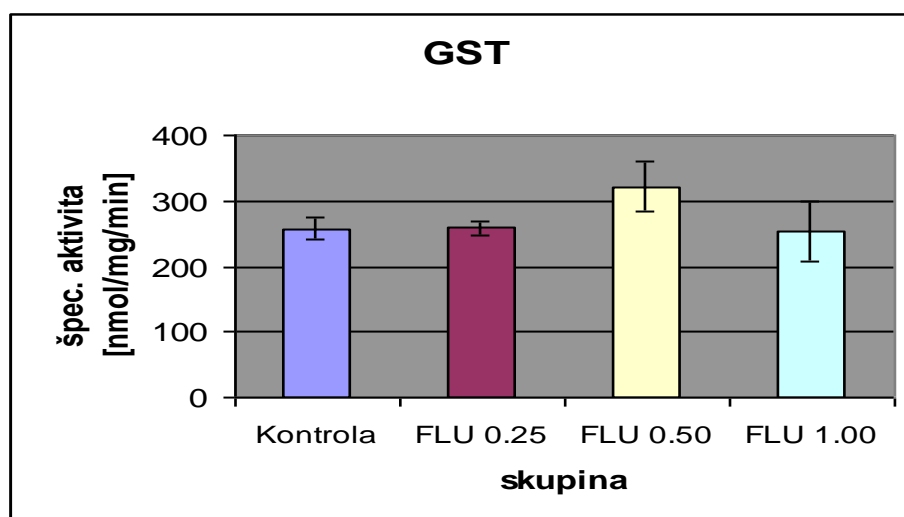
5.3 Stanovenie GST

Pre stanovenie aktivity glutathion-S-transferasy (GST) v vzorkách cytosolu bola použitá spektrofotometrická metóda na základe tvorby

S-2,4-dinitrofenylglutathionu (viz kapitola 4.3.3). V tabuľke 8 sú uvedené priemerné hodnoty s príslušnými smerodajnými odchýlkami.

Tab. 8 Špecifická aktivita GST v cytosolickej frakcii

Skupina	Špecifická aktivita GST [nmol/mg min]
Kontrola	257 ± 17
FLU 0.25	258 ± 10
FLU 0.50	321 ± 38
FLU 1.00	254 ± 45



Obr. č. 11: Grafické znázornenie špecifických aktivít GST jednotlivých skupín liečených a neliečených zvierat

V tomto meraní bol zaznamenaný jeden štatisticky významný rozdiel a to v skupine FLU 0.50. V tejto skupine vzrástla špecifická aktivita konjugačného enzýmu GST. Ostatné zmeny v aktivitách boli štatisticky nevýznamné v porovnaní s kontrolnou skupinou.

5.4. Stanovenie UGT

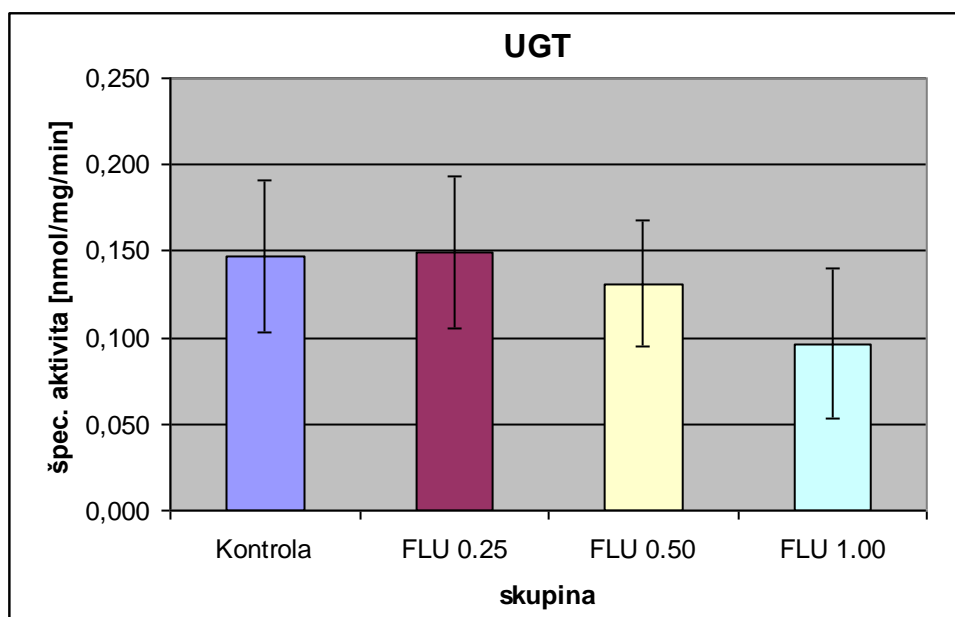
Aktivita UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) bola stanovená na základe spektrofotometrickej metódy (viz. kapitola 4.3.4) premeny p-nitrofenolu za enzýmovej katalýzy UGT.

Konjugačné činidlo UDP-glukuronová kyselina, ako sa experimentálne zistilo, neposkytuje merateľné výsledky.

Pre konečné stanovenie aktivity tejto transferasy bolo ako konjugačné činidlo použitá UDP-glukosa, ktorá sa experimentálne ukázala ako lepšie činidlo pre tieto enzýmy. V tabuľke 9 sú uvedené špecifické aktivity UGlcT jednotlivých vzoriek. Hodnoty sú aritmetickým priemerom 5 paralelných meraní \pm smerodajná odchýlka.

Tab. 9 Špecifická aktivita UGlcT v mikrosomálnej frakcii u jednotlivých skupín

Skupina	Špecifická aktivita [nmol/mg/min]
Kontrola	0,15 \pm 0,04
FLU 0.25	0,15 \pm 0,04
FLU 0.50	0,13 \pm 0,04
FLU 1.00	0,10 \pm 0,04



Obr. č. 12: Grafické znázornenie špecifických aktivít UGlcT u jednotlivých skupín liečených a neliečených zvierat

Z hodnôt špecifických aktivít enzýmu UGlcT bolo zistené v skupine FLU 0.25 a FLU 0.50 štatisticky bezvýznamné zmeny v porovnaní s kontrolnou skupinou. Skupina FLU 1.00 vykazovala pokles špec. aktivity tejto transferasy.

Zmena je štatisticky merateľná.

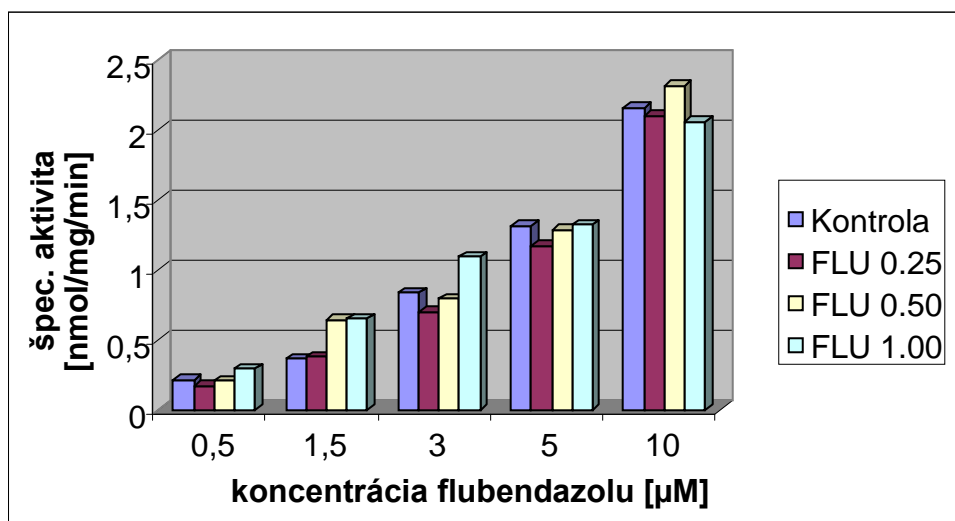
5.5. Stanovenie špecifických reduktas flubendazolu

Pomocou HPLC analýzy a detekcie metabolitov flubendazolu boli zistené špecifické aktivity v jednotlivých skupinách. Aktivita sa stanovila pre rôzne koncentrácie flubendazolu (0,5 μ M; 1,5 μ M; 3 μ M; 5 μ M; 10 μ M).

Hodnoty v tabuľke 10 sú aritmetickým priemerom výsledkov meraní \pm smerodajná odchýlka.

Tab. 10 Špecifická aktivita cytosolických reduktáz flubendazolu v závislosti na koncentrácií substrátu v inkubácii

Skupina	Špecifická aktivita [nmol/mg/min]v rôznych koncentráciach				
	0,5 μ M	1,5 μ M	3 μ M	5 μ M	10 μ M
Kontrola	0,21 \pm 0,02	0,36 \pm 0,04	0,83 \pm 0,07	1,32 \pm 0,08	2,16 \pm 0,13
FLU 0.25	0,17 \pm 0,04	0,38 \pm 0,04	0,70 \pm 0,03	1,17 \pm 0,10	2,10 \pm 0,04
FLU 0.50	0,20 \pm 0,01	0,64 \pm 0,03	0,79 \pm 0,08	1,29 \pm 0,05	2,31 \pm 0,12
FLU 1.00	0,29 \pm 0,06	0,65 \pm 0,03	1,09 \pm 0,06	1,32 \pm 0,06	2,06 \pm 0,14



Obr. č. 13: Porovnanie špecifickej aktivity jednotlivých vzoriek pri rôznych koncentráciách FLU

Pre koncentráciu 0,5 μM jedinou významnou moduláciou enzymatickej aktivity je jej zvýšenie u skupiny FLU 1.00

Pre koncentráciu 1,5 μM sa ako významná zmena vyhodnotilo zvýšenie špecifickej aktivity reduktas u skupín FLU 0.50 a FLU 1.00.

Pre koncentráciu 3 μM to bol pokles enzymatickej aktivity u skupiny FLU 0.25 a jej zvýšenie u skupiny FLU 1.00

Pre koncentráciu 5 μM a 10 μM neboli zaznamenané žiadne významné zmeny v špecifickej aktivite jednotlivých skupín.

6. DISKUSIA

Choroby hospodárskych zvierat spôsobené parazitickými červami sú neustále v popredí záujmu odbornej verejnosti. Dôvodom je celosvetová prevalencia týchto ochorení, silne negatívny dopad na produkčnú úroveň postihnutých chovov a obmedzené spektrum prostriedkov využiteľných k prevencii a liečbe. Počet dostupných liečiv je relatívne veľmi malý a behom uplynulých desaťročí sa značne znížila ich účinnosť. Paraziti si totiž postupne vytvorili mechanizmy, ktorými sa úspešne bránia toxicite anthelmintik. A tak sa rezistencia parazitujúcich červov na dostupné anthelmintiká stáva stále väčším celosvetovým problémom. Aj napriek dlhodobému štúdiu sú možné mechanizmy navodenia helmintorezistencie zatiaľ málo známe. Až detailná znalosť týchto mechanizmov môže viesť k úspešnej terapii parazitóz hospodárskych zvierat.

Ako model pre túto prácu bol vybraný *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová). Je to častý a relatívne veľmi patogénny parazit domácich aj voľne žijúcich prežúvavcov pôsobiaci nematózy tráviaceho traktu. Je atraktívny model parazita pre štúdium rezistencie na anthelmintiká, pretože je jedným z parazitických druhov, u ktorých je rezistencia značne rozšírená a je i intenzívne študovaná (Coles et al. 2006). Je tiež blízky príbuzný ostatným dôležitým patogénnym druhom nematód (Kaplan 2004).

Parazitický helminti, vrátane *H. contortus*, sú schopní metabolizovať tricalbendazol, albendazol alebo moxidektin. Tieto anthelmintiká sú metabolizované oxidáciou. Oxidasy hrajú pravdepodobne mnoho významnejšiu rolu v metabolizácii liečiva ako sa doteraz predpokladalo (Kotze 1999). Dôležitosť enzýmov prvej fáze biotransformácie liečiv na rezistenciu je jasne demonštrovaná v práci od Robinson et al (2004), kde bola zistená významne vyššia aktivita oxidas pre tricalbendasol u kmeňa *Fasciola hepatica* rezistentného na tricalbendasol. Podobný mechanizmus, a teda zvýšenie enzymatickej aktivity ako odpoveď na stresové podmienky, boli popísané u dospelého jedinca *H. contortus*, kde bolo nájdené významné zvýšenie aktivity katalasy po expozícii peroxidu (Kotze 2003). Je teda zrejmé, že aj parazitujúci helminti sa môžu brániť chemickému stresu indukciou aktivity biotransformačných enzýmov.

Zatiaľ v tejto súvislosti boli skúmané indukcie len oxidačných a konjugačných enzýmov, ale pretože parazitujúci helminti podstatnou mierou redukujú xenobiotiká, mohli by aj redukčné enzýmy a ich indukcia hrať dôležitú úlohu v obrane helmintov proti účinkom niektorých liečiv.

Z bežne používaných anthelmintik sú metabolizované redukčnou cestou flubendazol a mebendazol. Pre účely tejto práce bol vybraný flubendazol, jednak pretože sa na jeho biotransformácií zásadným spôsobom podieľajú redukčné enzýmy a jednak pretože je zástupcom skupiny benzimidazolových anthelmintik a v literatúre bolo opísané v množstve lokalít navodenie rezistencie *H. contortus* práve na benzimidazoly.

Ľudské reductasy karbonylovej skupiny sú momentálne intenzívne skúmané (napr. Mordente et al. 2003, Thomas et al. 2004). Taktiež boli publikované aj príklady modulácie reductas u ľudí a laboratórnych zvierat (Soldan et al. 1996). Oproti tomu u hospodárskych zvierat, alebo parazitov, sú súčasné znalosti o reductasach karbonylovej skupiny a ich modulácií stále prakticky nulové.

V tejto práci bola sledovaná možnosť modulácie aktivity biotransformačných enzýmov na základe ich predošlého kontaktu s xenobiotikom. Boli stanovené a porovnané špecifické aktivity reductas, ako enzýmov prvej fázy, glutathion-S-transferasy a UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) resp. UDP-glucosyltransferasy (UGlCT) ako enzýmov fázy druhej. Jedná sa o enzýmy, ktoré sa u tohto živočíšneho druhu asi najväčšou mierou podieľajú na biotransformácií liečiv. Podľa vlastností jednotlivých enzýmov boli ich aktivity stanovené spekrofotometricky, spektrofluorimetricky, alebo bola vykonaná inkubácia enzýmov so substrátom a potom boli pomocou HPLC stanovené produkty biotransformácie. Pre jednotlivé merania boli použité vzorky cytosolických a mikrosomálnych frakcií *Haemonchus contortus* liečených a neliečených pokusných zvierat. (Skupina označená ako Kontrola pochádza od zvierat neliečených flubendazolom, ostané skupiny sú potom rozdelené podľa množstva sub-letálnej dávky anthelmintika podaného pokusným zvieratám.)

Pre výpočet špecifickej enzýmovej aktivity bolo nutné najskôr stanoviť koncentrácie bielkoviny v jednotlivých vzorkách. Hodnoty koncentrácie bielkoviny boli v rámci porovnávaných skupín podobné.

V subcelulárnych frakciách jednotlivých skupín boli stanovené špecifické aktivity redukčných enzýmov voči rôznym substrátom.

Aktivita reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu bola stanovená pre cytosolicku i mikrosomálnu frakciu. Hodnoty špecifickej aktivity v mikrosomálnej frakcii boli rádovo nižšie ako tie v cytosole. V mikrosomalnej frakcii sa má na biotransformácií tohto substrátu podieľať 3-HSD (3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa, jej možné ovplyvnenie sa nepodarilo v tejto práci dokázať. V cytosole bola zaznamenaná preukázateľná zmena špecifických aktivít enzýmov voči kontrolnej skupine. Konkrétne v skupine FLU 0.25 poklesla enzymatická aktivita. V skupine FLU 0.50 bolo zistené zvýšenie aktivity redukčných enzýmov pre tento substrát. Rovnaký enzým aldehydreduktasa AKR1A1 sa podieľala na biotrasnformácií aj nasledujúceho substrátu.

Pre D,L-glyceraldehyd bola pri porovnaní s kontrolnou skupinou nameraná až dvojnásobne zvýšená enzymatická aktivita v skupine FLU 0.50 ale aj v FLU 1.00, na rozdiel od predchádzajúceho substrátu, kde táto skupina vykazovala pokles enzymatickej aktivity voči kontrolnej skupine.

V podstate, pre tento substrát bolo namerané zvýšenie špecifickej aktivity reduktas vo všetkých troch skupinách v porovnaní s kontrolou.

Keďže by mali mať oba substráty rovnaký enzým biotransformácie, je zaujímavé, že v skupine FLU 0.25 biotransformácia 4-pyridinkarboxaldehydu klesla, u D,L- glyceraldehydu naopak stúpla. V skupine FLU 1.00 to bolo presne naopak, špecifická aktivita enzýmu voči 4-pyridikarboxaldehydu klesla a voči D,L-glyceraldehydu sa zvýšila v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vysvetlenie môže poskytnúť rôznorodosť a jedinečnosť každého organizmu a jeho rozličnej enzymatickej odpovede.

Pre acenaftenol, ako typický substrát AKR1C, bol zaznamenaný opäť vzrast špecifickej aktivity u skupiny FLU 0.50. V skupine FLU 1.00 to bol zase výrazný pokles enzymatickej aktivity.

Vo všeobecnosti môžeme povedať, že liečba skupiny FLU 0.50 (vzorka zo zvierat liečených 0,5 mg fubendazolu na kg živej váhy, čo je 1/30 terapeutickú dávku) podporila teóriu, že podávanie sub-letálnej dávky, môže neskôr chrániť parazita pred účinkami xenobiotika tým, že zvýši aktivitu reduktas ako biotransformačných enzýmov. V tejto skupine sme zistili vzrast

špecifickej aktivity reduktas karbonylovej skupiny voči všetkým vybraným substrátom.

V ostatných skupinách sa indukcia a inhibícia enzýmov menila v závislosti na substráte.

Pre konjugačné enzýmy a ich možnú moduláciu toho literatúra ponúka podstatne viac hlavne čo sa týka aktivity GST. Hayes a Pulford publikovali, že expresia GST môže byť ľahko indukovaná liečbou mnohými zlúčeninami, vrátane známych i potenciálnych kancerogénov, liečiv a metabolitov oxidatívneho stresu. U pásomnic (*H. diminuta*) vzrastajú hladiny GST po expozícií fenobarbitalom, a je tiež dôkaz o indukcií aktivity GST xenobiotikom u *Echinococcus granulosus* a *Schistosoma mansoni* a u mnoho ďalších.

V tejto práci som experimentálne zistila štatisticky významnú zmenu špecifickej aktivity GST len v skupine FLU 0.50 a síce nárast aktivity tejto transferasy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Hodnoty špecifických aktivít UGlcT boli radovo veľmi malé a jediná štatisticky významná modulácia je inhibícia aktivity UGlcT v skupine FLU 1.00. Ostatné možné ovplyvnenia danej transferasy sa ukázali ako výpovedne bezvýznamné.

A nakoniec boli stanovené i aktivity špecifických reduktas flubendazolu u jednotlivých skupín v závislosti na rôznej koncentrácií flubendazolu pri ich inkubácii. Toto meranie preukázalo nárast biotransformácie flubendazolu v skupine FLU 1.00, ale len pri nižších v koncentráciách substrátu (do 3 μ M). Ostatné hodnoty špecifických aktivít týchto reduktas u jednotlivých skupín neznamenal ani výrazný nárast ani pokles v porovnaní s kontrolnou skupinou, avšak tieto koncentrácie substrátu (flubendazolu) značne prevyšujú koncentráciu dosiahnuteľnú v tele parazita. Môžeme sa teda domnievať, že predošlá expozícia organizmu s flubendazolom vyvolá zvýšenú aktivitu redukčných enzýmov a redukcia flubendazolu môže prebiehať rýchlejšie.

7. ZÁVER

Pre jednotlivé sledované skupiny červov boli stanovené špecifické aktivity vybraných biotransformačných enzýmov. Redukčné a konjugačné enzýmy boli stanovené na základe ich vlastností pre špecifické substráty.

Získané hodnoty boli porovnané s kontrolnou skupinou a nakoniec štatisticky vyhodnotené jednotlivé zmeny v aktivite enzýmov v závislosti na danej dávke liečiva.

Na základe výsledkov môžeme vyvodiť, že kontakt parazita s flubendazolom viedol ku zmenám aktivít niektorých redukčných enzýmov a GST, pozorované zmeny boli však malé a asi nemôžu príliš chrániť parazita pred pôsobením anthelminika.

Zoznam použitej literatúry

- Angulo-Cubillan F.J., Garcíá-Coiradas L., Cuquerella M. 2007. Relation *Haemonchus contortus-ovina*. Revista Científica, ISSN 0798-2259.
- Alvarez L.I., Imperiale F.A., Sanches S.F., Murno G.A., Lanusse C.E. 2000. Uptake of albendazole and alevendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. Veterinary parasitology 94, 75-89.
- Alvarez L.I., Mottier M.L., Lanusse C., 2007. Drug transfer into target helminth parasites. TRENDS in Parasitology 561, 97-104.
- Baliharová, V., Velík, J., Fimanová, K., Lamka, J., Szotáková, B., Šavlík, M., Skálová, L. 2005 Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro. *Pharmacol Res* 57, 91-106.
- Barrett J., 1997. Helminth detoxification metabolisms. J. Helminthol. 71, 85-89.
- Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Richard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. parasitology 136, 167-185.
- Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubeňová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L., 2008. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 151, 242-248.
- Cvilink V., Lamka J., Skálová L., 2008. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelminhics in helminths. Drug metabolism reviews, 02/2009, Vol. 41, No 1, 8-26.
- Jez J.M., Flynn T.G., Penning T.M. 1997. The new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. Biochem. Pharmacol. 54, 639-647.
- Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I.J., Kador P.F., Lee Y.S., Tsai J.Y., Fujisawa S., Lizak M.J., Sinz A., Sato S. 1999. Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinefrine in rats. Biochem. Pharmacol. 58, 517-524.

- Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminski R., von Samson-Himmelstjerna G. 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 332–346.
- Köhler P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336-345.
- Kotze A.C. 1999. Peroxide-supported *in vitro* cytochrome P450 activities in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int. J. Parasitol.* 29, 389-396.
- Kotze A.C. 2003. Catalase induction protects *Haemonchus contortus* against hydrogen peroxide *in vitro*. *Int J. Parasitol.* 33, 393-400.
- Kvasničková E., Šroler A. 1992. Indukce enzymů, které metabolizují látky tělu cizí, *Československá farmacie* roč. XLI, 9-10.
- Kwa M.S., Veenstra J.G., Roos M.H. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 299 – 303.
- Maser E., Oppermann U.C.T. 1997. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase systém, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action. *Eur J Biochem.* 249, 365-369.
- O'Connor R.M., Long J.A., Allred D.R. 1999. Selection and recovery of minor parasite populations expressing unique infected-erythrocyte phenotypes. *Mol. Biochem. Parasitology* 100, 125-129.
- Precious W.Y., Barrett J. 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology today* 5, 156–160.
- Robinson M.W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E.M., Fairweather I. 2004. The cooperative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res.* 92, 205-210.
- Roos M.H., Otsen m., Hoekstra R., Veenstra J.G., Lenstra V.A. 2004. Genetic analysis of inbreeding of two strains of parasitic nematode *haemonchu contortus*. *Int. J. Parasitol.* 34, 109-115.
- Urbánková M., Aktivita biotransformačních enzymů u muflonů s dikroceliózou a u zdravých muflonů (rigorózní práce). 2006

- Van Wyk J.A., Gerber H.M., Groenveld H.T. 1980. A technique for recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large scale application. J Vet. Res. 47, 147-158.
- Vandewaa E.A., Campbell C.K., O'Leary K.A., Tracey J.W. 1993. Induction of *Schistoma mansoni* glutathione transferase by xenobiotics. Archives of Biochemistry and Biophysics 303, 15 – 21.
- Waller P.J. 2004. Management and control of nematode parasites of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. Trop Biomed. 21, 7-13.
- http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Haemonchus_contortus.html, 7.4. 2009.