

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

**Porovnání metabolismu anthelmintik a aktivit
biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních
kmenů vlasovky slézové**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.
Hradec Králové, 2011

Tamara Lasotová

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat především Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při řešení diplomové práce. Dále děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za odběr biologického materiálu, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za provedení HPLC analýzy a Mgr. Haně Bártíkové za pomoc v experimentální části práce. Chtěla bych zároveň poděkovat všem členům katedry biochemických věd za ochotu a pomoc.

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

ABSTRAKT

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

Kandidát: Tamara Lasotová

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Porovnání metabolismu anthelmintik a aktivit biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slézové

Haemonchus contortus je dominující gastrointestinální parazit u ovcí a koz. Tento krev sající parazit způsobuje těžké anémie, které zpravidla končí smrtí, zvláště u mladých zvířat. Největším problémem ve farmakoterapii haemonchózy je rezistence na anthelmintika, která je dnes celosvětově rozšířená. Biotransformační enzymy jsou schopné inaktivovat anthelmintika pomocí biotransformace, což přispívá k rozvoji rezistence helmintů. Cílem diplomové práce bylo porovnání metabolismu anthelmintik a aktivit biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů *H. contortus*. Pro testování byly vybrány tři kmeny *H. contortus*: citlivý na anthelmintika – ISE kmen, rezistentní na benzimidazolová anthelmintika – IRE kmen, rezistentní na všechna anthelmintika – WR kmen. Výsledky ukázaly, že aktivita enzymů redukujících karbonylovou skupinu modelových substrátů je vyšší u rezistentních kmenů než u citlivého kmene, na rozdíl od biotransformace albendazolu a flubendazolu *in vitro*, kde vyšly výsledky opačné. Příčinou může být rozdílný mechanismus vzniku rezistence na anthelmintika. Je mnoho způsobů navození rezistence u helmintů a častokrát dochází ke kombinacím více mechanismů rezistence najednou.

ABSTRACT

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

Candidate: Tamara Lasotová

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Comparison of anthelmintics metabolism and activities of biotransformation enzymes in susceptible and resistant strains of *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus is a predominant gastrointestinal parasite of sheep and goat. This blood-sucking parasite cause severe anaemia with mortalities, particularly in young animals. The greatest problem in pharmacotherapy of haemonchosis is a resistance to anthelmintics, which is worldwide. Biotransformation enzymes have the ability to inactivate anthelmintics via biotransformation and it contributes to development of helminths resistance. The aim of this project was to compare anthelmintics metabolism and activities of biotransformation enzymes in susceptible and resistant strains of *H. contortus*. For a testing three strains of *H. contortus* were chosen: anthelmintics-susceptible strain – ISE strain, benzimidazole-resistant strain – IRE strain, anthelmintics-resistant strain – WR strain. The results showed that the activities of reductases of carbonyl group of the model substrates are higher in resistant strains than in susceptible strain, on the contrary to the biotransformation of albendazole and flubendazole *in vitro* where the results are opposite. It may be caused by different mechanisms of anthelmintic resistance development. There are many mechanisms of drug resistance in helminths and many times they are combined.

OBSAH

OBSAH	5
1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 HAEMONCHUS CONTORTUS	8
2.1.1 Vlasovka slezová a její vývojový cyklus	8
2.1.2 Onemocnění a diagnostika	10
2.1.3 Kontrola a léčba.....	11
2.2 REZISTENCE.....	16
2.3 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U HELMINTŮ	19
2.3.1 Fáze I biotransformace	20
2.3.2 Fáze II biotransformace	24
2.3.3 Fáze 0 a III.....	26
3. CÍL PRÁCE	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	28
4.1.1. Chemikálie.....	28
4.1.2 Přístroje	28
4.1.3 Biologický materiál.....	29
4.2 PRACOVNÍ POSTUP	29
4.2.1 Příprava pufrů a médií	29
4.2.2 Příprava subcelulárních frakcí.....	32
4.2.3 BCA stanovení bílkoviny	32
4.2.4 <i>In vitro</i> sledování metabolismu ABZ a FLU u <i>Haemonchus contortus</i>	34
4.2.5 <i>Ex vivo</i> sledování metabolismu FLU u <i>Haemonchus contortus</i>	35
4.2.6 Stanovení aktivity redukčních biotransformačních enzymů	36
4.2.7 Stanovení aktivity oxidačních enzymů	42
4.2.8 Stanovení aktivity katalasy.....	44
4.2.9 Stanovení aktivity konjugačních enzymů	45
5. VÝSLEDKY	48
5.1 Stanovení koncentrace bílkovin	48
5.2 <i>In vitro</i> sledování metabolismu ABZ a FLU u <i>Haemonchus contortus</i>	49
5.2.1 Inkubace ABZ se subcelulárními frakcemi	49
5.2.2 Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi.....	53
5.3 <i>Ex vivo</i> inkubace <i>Haemonchus contortus</i> s FLU	54
5.4 Stanovení aktivity redukčních enzymů.....	56
5.4.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu	56
5.4.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 6,0.....	57
5.4.3 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5.....	58
5.4.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu.....	59
5.4.5 Stanovení aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu.....	60
5.4.6 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu	61
5.4.7 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu	62
5.5 Stanovení aktivity oxidačních enzymů	64
5.5.1 Stanovení aktivity peroxidasy pomocí o-fenylendiaminu dihydrochloridu (OPD).....	64
5.5.2 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)	65
5.6 Stanovení aktivity katalasy	66
5.7 Stanovení aktivity konjugačních enzymů	67
5.7.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST).....	67
5.7.2 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glucosyltransferasy (UGlCT)	68
6. DISKUSE	70
7. ZÁVĚR.....	76

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77
LITERATURA.....	78

1. ÚVOD

Helmintózy jsou parazitická onemocnění, která ohrožují zdravotní stav hospodářských, domácích i volně žijících zvířat a způsobují obrovské finanční ztráty, které jsou každoročně odhadovány v řádech stovek miliónů dolarů. Jedním z původců těchto helmintóz je vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), což je hlístice parazitující ve slezu přežvýkavců. Hostitelům způsobuje těžkou anémii a hypoalbuminemii, která může vést až ke smrti hostitele.

Kontrola a léčba parazitóz spočívá v podávání anthelmintik. Současná anthelmintika jsou vysoce účinná proti nedospělým i dospělým stádiím všech významných gastrointestinálních nematod. Mezi nejčastěji podávaná léčiva patří benzimidazoly. I když anthelmintika poskytují hodně ekonomických výhod, jejich hojné používání způsobilo v mnoha zemích rozvoj rezistence parazitů na anthelmintika. V souvislosti s rozšířením rezistence jsou zkoumány jak mechanismy navození rezistence, tak biotransformační enzymy, které fungují jako účinná obrana parazitů proti negativním vlivům xenobiotik.

Cílem této diplomové práce je porovnat biotransformaci anthelmintik a aktivity biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slezové. Pro testování byly použity tři kmeny *H. contortus*: kmen citlivý na anthelmintika – ISE kmen, rezistentní na benzimidazolová anthelmintika – IRE kmen, rezistentní na všechna anthelmintika – WR kmen. Byl sledován metabolismus anthelmintik albendazolu a flubendazolu. Dále byly zkoumány a porovnávány aktivity biotransformačních enzymů vůči modelovým substrátům. Testování probíhalo jak *in vitro* v subcelulárních frakcích homogenátu tří kmenů vlasovky slezové, tak *ex vivo* v CO₂ inkubátoru v médiu s anthelmintiky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HAEMONCHUS CONTORTUS

2.1.1 Vlasovka slezová a její vývojový cyklus

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je hlístice parazitující v přežvýkavcích (Ghisi et al. 2007). Patří do kmene Hlístice (*Nematoda*), třídy Secernatea, řádu Strongylida, čeledi Trychostrongylidae, rodu Haemochus. *Haemonchus contortus* poprvé popsal Rudolphi v roce 1803. Sameček dosahuje délky 10 až 20 mm a je celý červený. Samička dosahuje délky 18 až 30 mm a je pruhovaná (obr. 1), protože její střevo naplněné krví je propleteno s bílými reprodukčními orgány. *H. contortus* má specializovaný trubicovitý vylučovací systém se třemi kanálky, které jsou uspořádané do tvaru písmene „H“.



Obr. 1: Samička *Haemonchus contortus*.



Obr. 2: *Haemonchus contortus* na Petriho misce

Dospělí samečci a samičky jsou nitkovitého tvaru, žijí ve slezu přežvýkavců a živí se krví hostitele. Samička klade denně 5000 až 10000 vajíček, které se spolu s výkaly dostávají do prostředí. Vývoj vlasovky slezové je přímý bez mezihostitele. Vajíčka, pokud mají dostatek tepla a vlhkosti, se vylíhnou na zemi i ve vodě do prvního (L1) larválního stádia. Z prvního larválního stádia se postupně vyvíjí druhé (L2) a třetí (L3) larvální stádium. Velké množství nedospělých infekčních larev (L3) se usazuje na hustě porostlých pastvinách, na kterých se pase dobytek. Pasoucí se dobytek pozře infekční larvy spolu s trávou. Larva (L3) putuje do slezu a provrtává se do vnitřní vrstvy

sliznice slezu. Následně se vyvíjí čtvrté (L4) larvální stádium, ze kterého se vyvíjí sexuálně zralý dospělý červ.

Rychlost a úspěšnost vývoje prvních tří larválních stádií z vajíčka je dána klimatickými podmínkami, především vyšší teplotou a dostatečnou vlhkostí. Řada epidemiologických studií zkoumala environmentální podmínky, které jsou důležité pro rozvoj haemonchózy ovcí. Byla stanovena spodní hranice teploty 18°C a průměrné měsíční srážky 50 mm. Proto je obecně uznáváno, že *H. contortus* se vyskytuje hlavně v teplých a mokřích oblastech, kde se chovají ovce a kozy. Nicméně, nedávné důkazy ukázaly, že tento parazit je očividně rozšířen i v severní Evropě (Waller et al. 2005).

Důležitým faktorem ve vývojovém cyklu vlasovky slezové je schopnost pozastavit vývoj (*hypobiosa*). *Hypobiosa* znamená, že některé L3 larvy pozřené zvířetem přejdou do latentního stádia a mohou setrvat ve sliznici tlustého střeva až po dobu tří let, místo aby pokračovaly ve vývinu do dospělého parazita. Latentní stádium umožňuje larvám přežít nepříznivé klimatické podmínky v okolním prostředí, které by mohly negativně ovlivnit larvální vývoj. Během tohoto období se inaktivní larvy akumulují a jejich počet se enormně zvyšuje. Na jaře nebo v období bahnění ovcí se inaktivní larvy probouzejí a pokračují ve svém vývoji do sexuálně dospělého parazita.

Rozvoj larválních stádií je determinován především počasím, jmenovitě teplotou a množstvím srážek. Jestliže je jedna z vnějších podmínek nepříznivá (teplota a/nebo vlhkost je příliš nízká), pak dojde k přerušení vývoje vylíhnutých vajíček k larválním stádiím. Tudíž teplota a množství srážek jsou důležitými parametry, které regulují vývojový proces v oblastech mírného pásma, zatímco v tropech/subtropech jsou srážky jediným limitujícím faktorem, protože teplota je vždy dostatečně vysoká pro tento proces. Proto tedy jsou ve vlhkých tropech/subtropech podmínky na pastvách příznivé víceméně neustále. V mírném podnebí se častokrát objeví překážka, která omezí vývojový proces, a tím nejen omezí vývoj larev, ale zároveň může být využívána ke kontrole onemocnění (Waller 2004).

Na rozdíl od chovu dobytka v mírném podnebí, kde se provádí zimní ustájení a/nebo chybí pastva, chov dobytka v tropických/subtropických oblastech je charakterizován celoroční pastvou. Takto je vývoj larev na pastvě víceméně nepřetržitý a všechen dobytek je pravděpodobně infikován. Zatímco farmáři v tropických/subtropických oblastech nemají dostatek finančních zdrojů, znalostí nebo vůle léčit svá zvířata pomocí léků, jsou v těchto oblastech také země, kde je situace opačná (Waller 2004).

Tento parazit sající krev je rozšířen především ve vlhkých tropech a subtropech (Waller et al 2005). Avšak dnes je zřejmé, že *H. contortus* se stává závažným problémem i pro oblasti mírného pásma. Souvisí to se změnami klimatických

podmínek, které jsou příznivé pro tohoto parazita. Mnoho potíží je spojeno s kontrolou onemocnění u malých přežvýkavců a s narůstající rezistencí na anthelmintika. Podrobná ekonomická hodnocení opětovně ukázala, že hlavní ztráty způsobené parazity se týkají především živočišné produkce než mortality (Waller 2004).

Haemonchus contortus je dominující gastrointestinální parazit u ovcí a koz (Tiwari et al. 2006). Definitivním hostitelem však nemusí být jen domácí přežvýkavci, ale i divoká zvířata. *H. contortus* byl identifikován také v antilopách, žirafách a velbloudech. Tento krev sající parazit je zodpovědný za akutní vzplanutí nemoci zpravidla končící smrtí zvláště u mladých zvířat (Waller 2004).

2.1.2 Onemocnění a diagnostika

Přestože má *H. contortus* velkou řadu hostitelů, zdá se, že ovce a koza domácí jsou nejčastějšími hostiteli. Ovce jsou pro člověka důležitým zdrojem kvalitních potravinářských výrobků (maso, mléko). Gastrointestinální nematodóza je jedna z nejhorších chorob ohrožujících celé stádo. Její důsledky jsou velmi vážné. Akutní forma gastrointestinální nematodózy způsobí smrt jehňat. Mnohem častěji však přechází do chronické formy, která významně omezí produktivitu (Angulo-Cubillán et al. 2007).

Ovce jsou velmi náchylné k tomuto parazitu. Odborníci zjistili, že je to způsobené kombinací několika faktorů:

- Ovčí trus je malý, snadno se rozkládá a rychle uvolňuje larvy parazita do okolí.
- Pasoucí se ovce často trhají trávu u samé země, kde je nejvíce infekčních larev.
- Ovce a kozy žijí ve velkých stádech a udržují si vzájemnou blízkost, což přispívá k rychlému šíření haemonchózy.

Ovce jsou schopny vytvořit si určitou imunitu k parazitům. Čím je ovce starší, tím méně je náchylná k negativním vlivům parazita. Kromě toho, pokud byla ovce již jednou nakažena, pak je schopna do určitého stupně inhibovat vývoj parazita i produkci vajíček. Nicméně, tato odolnost není úplná a nestačí zabránit propuknutí nemoci, zvláště když je zvíře vystaveno obrovskému počtu infekčních larev vlasovky. Proto je velmi důležité léčit dospělé bahnice, aby se zabránilo vzniku infekcí u mladých jehňat.

Haemonchóza ovcí je parazitické onemocnění způsobené *Haemonchus contortus*. Závažnost tohoto onemocnění závisí na různých faktorech, na intenzitě infekce (počet infekčních larev *H. contortus*), virulenci parazita, na věku a plemenu zvířete a na zdravotním stavu zvířete. Hlavní patogenní mechanismus vlasovky slezové spočívá v přímém poškození gastrické mukózy a následném sání krve

(Angulo-Cubillán et al. 2007). Způsobuje tak anémii, hypoalbuminemii a často celkový pokles proteinů (Alvarez et al. 2000). Anémie je charakterizována bledostí dásní a očních víček. Pokud je ovce nakažena velkým počtem parazitů, může zemřít náhle z důvodu obrovské ztráty krve, i když byla v nejlepším zdravotním stavu. Jestliže onemocnění nastupuje pomalu, ovce postupně ubývá na váze, stává se anemickou a její vlna začíná být křehká a může vypadávat. U těchto slabých zvířat se může rozvinout jiná choroba, například pneumonie, a následkem toho zvířata uhynou.

U parazitického onemocnění se může někdy objevit průjem. Ten vzniká drážděním střev, které zapříčiňuje narušené trávení potravy. Infekce *Haemonchus contortus* však vyvolávají průjem velmi zřídka. V důsledku sníženého obsahu proteinů se tělní tekutiny hromadí v oblasti dolní čelisti, v břišní a hrudní dutině a v střevní stěně.

Je známo, že v průběhu fatální haemonchózy se mění barva spojivek z tmavě červené u zdravých ovcí, přes odstíny růžové až k prakticky bílé, jako důsledek postupně se zhoršující anémie. Rozsah těchto změn vycházejících z hodnot hematokritu byl donedávna stále neurčitý. Analýza jednotlivých stupňů anémie projevující se ve spojivkové mukózní membráně byla prováděna jak fotografováním mukózní membrány, tak určením hematokritu (van Wyk, Bath 2002).

Haemonchus contortus je pravděpodobně jediný zástupce nematod ovcí a koz, který může být přesně diagnostikován bez použití laboratorních testů. Jasným příznakem je akutní anémie. *H. contortus* je považován za nejvíce patogenního parazita malých přežvýkavců. Má vysoký biotický potenciál, a pokud nastanou příznivé podmínky pro vývoj tohoto parazita, může způsobit obrovské ztráty ve všech živočišných třídách. Ačkoliv se vyskytují smíšené infekce s jinými nematody, vajíčka *H. contortus* na pastvě stále převládají (Waller et al. 2005). Vajíčka tohoto parazita představují 90% kontaminace pastvin při převládajících vysokých teplotách a vlhkosti (Waller 2004).

2.1.3 Kontrola a léčba

Nematodózy jsou celosvětovým ekonomickým problémem v živočišné produkci. Finanční ztráty způsobené parazitizmem jsou každoročně odhadovány v řádech stovek milionů dolarů (Coyne et al. 2001). Naštěstí dostupnost bezpečných a širokospektrých anthelmintik pomohla snížit dopad řady parazitických onemocnění. Moderní anthelmintika jsou vysoce účinná proti nedospělým i dospělým stádiím všech významných gastrointestinálních nematod a stejně tak proti četným extraintestinálním

červům. Mnohá z těchto léčiv jsou dobře tolerována hostitelem a v některých případech se léčí pomocí jedné orální dávky. Mezi mnoha nedávno vyvinutými anthelmintiky mají některá výjimečné chemoterapeutické vlastnosti, např. selektivní toxicita anthelmintik (Köhler 2001).

Ačkoliv anthelmintika poskytují mnoho ekonomických výhod, jejich hojně používání představuje několik výrazných negativ. Nejvýznamnější je v tomto ohledu vývoj rezistence parazitů na anthelmintika. Jinými potenciálními riziky jsou odolná rezidua v mase a mléce, a nebezpečí náhodné ekotoxicity, jejíž příčinou je vystavování bezobratlých (včely, motýli) vlivu léčiv v okolním prostředí (Coyne et al. 2001).

2.1.3.1 Anthelmintika

Profylaktická léčba parazitických gastroenteritid spočívá především v užívání anthelmintik (Riou et al. 2003). Preventivní odčervovací kúra se provádí v každém ročním období, aby se zabránilo rozšíření parazitóz. S preventivní léčbou se začíná hned, jak se začnou ovce pást. Toto ošetření je zaměřeno především na hypobiotické larvy a na zastavení jejich vývojového cyklu.

Známymi cílovými místy anthelmintických léčiv jsou výhradně proteiny tvořící iontové kanály, enzymy, strukturní proteiny a transportní molekuly (tab. 1) (Köhler 2001).

Tab. 1: Cílová místa běžně užívaných anthelmintik.

Iontové kanály	Mikrotubuly	Bioenergetika	Neznámý mechanismus
Tetrahydropyrimidiny (Pyrantel, Morantel)	Benzimidazoly (Thiabendazol, Mebendazol, Albendazol)	Salicylanilidy (Klosantel)	Prazikvantel
Imidazothiazoly (Levamisol)		Chlorované sulfonamidy (Klorsulon)	Triklabendazol
Makrocyclické laktony (Ivermektin)			
Piperazin			

Benzimidazoly

Skupina benzimidazolových anthelmintik je nejrozsáhlejší skupinou anthelmintik odvozenou od jediné chemické struktury. Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku. Benzimidazoly jsou obecně léčiva s antinematodní, z části s antitrematodní i anticestodní aktivitou. Historie této velké třídy extrémně

úspěšných a účinných léčiv začala objevem thiabendazolu v roce 1961, prvního širokospektrého anthelmintika. Tato sloučenina odstartovala vývoj různých strukturně podobných léčiv a proléčiv, které se ukázaly méně toxickými pro savce a dokonce účinnějšími proti celé řadě červů, než jejich předchůdce thiabendazol (Köhler 2001).

Dřívější studie účinku těchto sloučenin u červů ukázaly, že způsobují ultrastrukturální změny jak ve střevních buňkách obličejových červů a krycích buňkách tasemnic, tak hlavně změny v redistribuci cytoplazmatických vezikul i jiných organel. Protože docházelo k mizení cytoplazmatických mikrotubulů, bylo rozhodnuto, že benzimidazoly inhibují transport sekrečních vezikul uskutečňovaný prostřednictvím mikrotubulů. Tyto léčivem navozené fyziologické reakce byly nedávno podpořeny pozorováním, že letální účinek fenbendazolu u *Haemonchus contortus* je spojen s inhibicí transportu sekrečních vezikul ve střevě následovaný rozptýlením obsahu vezikul v cytoplazmě střevních buněk (Köhler 2001).

V současnosti je zcela jasné, že biochemická podstata účinku benzimidazolů spočívá v jejich schopnosti vázat se s vysokou afinitou na podjednotku mikrotubulu, tubulin, čímž se naruší struktura a funkce mikrotubulu (Köhler 2001). Mechanismus účinku je tedy založen na inhibici energetického metabolismu parazitujících červů. Inhibují syntézu tubulinu, což je strukturní protein mikrotubulů, a narušují tak transport a metabolismus glukózy. Důsledkem je energetické vyčerpání a ztráta pohyblivosti parazitů a jejich pozvolné odumření (Ducháček, Lamka 2006).

Studie s klasickým antimitotickým zástupcem kolchicinem ukázaly, že se tato sloučenina váže na tubulin přednostně při polymerizaci. Data získaná z fluorescenční spektroskopie nasvědčovala tomu, že kolchicin vázající místo je na monomeru beta-tubulinu. Podobný mechanismus může být zodpovědný za inhibici polymerace tubulinu u benzimidazolů, vzhledem k tomu, že vázající místo těchto látek se rovněž nachází na monomeru beta-tubulinu. Mikrotubuly jsou velmi dynamické, všudypřítomné buněčné orgány sloužící k různým životním funkcím zahrnujícím mitózu, pohyb a transport ve všech eukaryotních buňkách. Mnoho těchto struktur existuje v dynamickém ustáleném stavu, ve kterém je udržováno v rovnováze spojování a rozpojování podjednotek. V takovémto systému interakce léčivo-tubulin způsobí posun ustáleného stavu, čímž dojde ke ztrátě sítě mikrotubulů a hromadí se volný tubulin. Protože mikrotubuly hrají zásadní úlohu v řadě buněčných procesů, jejich léčivem indukovaná destrukce nakonec vede ke smrti organismu. Princip vysoké selektivní toxicity benzimidazolových anthelmintik není zcela jasný, ale zdá se, že spočívá v silnější a irreverzibilní vazbě léčiva s tubulinem červa (Köhler 2001). Většina léčiv této skupiny působí proti dospělým i vývojovým stádiím helmintů, některá i ovocidně.

Makrocyclické laktony

Jsou to léčiva biosyntetického původu, která můžeme rozdělit do dvou skupin na avermektiny a milbemyciny. Avermektiny jsou fermentačním produktem půdní aktinomycety *Streptomyces avermitilis*. Vyznačují se jedinečným spektrem účinnosti umožňujícím léčbu onemocnění endoparazitárních (nematodóz) i ektoparazitárních (infekce členovci). Kromě toho se avermektiny vyznačují tendencí k reziduálnímu účinku, což umožňuje nejenom eliminovat stávající parazitární infekci, ale poskytnout po určitou dobu i ochranu proti opakované infekci (Ducháček, Lamka 2006).

Makrocyclické laktony vyvolávají paralýzu somatického svalstva červů a inhibují příjem potravy tím, že blokují faryngeální pumpu. Elektrofyziologické studie jasně ukázaly, že fyziologickým místem účinku těchto léčiv je rodina glutamátových receptorů spojených s chloridovými kanály, které obsahují α -podjednotky a jsou specifické pro bezobratlé. Tyto kanály jsou ionotropní inhibiční membránové proteiny, které jsou fylogeneticky příbuzné GABA_A chloridovým kanálům obratlovců a jsou pravděpodobně tvořeny podobnými podjednotkami. Zdá se, že ivermektin účinkuje jako agonista glutamátu a prodlužuje dobu otevření kanálu. Nízké koncentrace potencují účinek přirozeného transmiteru a vyšší hladiny přímo otevírají kanál. Navázání ivermektinu způsobí ireversibilní proudění chloridových iontů, což vede k hyperpolarizaci buněčné membrány a paralýze svalů. Výsledky experimentů ukazují, že místo pro navázání ivermektinu se nachází na α -podjednotce, zatímco glutamát vázající místo je lokalizováno na β -podjednotce glutamátového kanálu.

Mechanismus senzitivity k ivermektinu u oblých červů je velmi komplexní a zahrnuje vzájemné působení mezi různými α -typy glutamátových kanálů jak ve faryngeální svalovině, tak v extrafaryngeálních neuronech (Köhler 2001). Makrocyclické laktony tedy ovlivňují funkci chloridových kanálů a tím stabilizují neurony. To vede k narušení přenosu vzruchů v nervových vláknech, z tohoto důvodu dochází k inhibici elektrického potenciálu v nervových buňkách hlístic a ve svalových buňkách členovců. Účinnost byla rovněž prokázána proti některým vývojovým stádiím parazitů. U savců jsou chloridové kanály v centrálním nervovém systému pro velké molekuly avermektinů hůře přístupné, příčinou je účinná hematoencefalická bariéra (Ducháček, Lamka 2006). Ve vyšších koncentracích však ivermektin interaguje nejen s chloridovými kanály hlístice, ale i s GABA receptorem spojeným s chloridovým kanálem, což znamená, že tato léčiva mohou být toxická pro obratlovce s poškozenou hematoencefalickou bariérou (Köhler 2001).

Agonisté nikotinu

Imidazothiazoly je dlouhodobě užívaná skupina anthelmintik mající výhradně antinematodní účinky. Působí proti dospělým formám parazitů a larválním formám některých parazitů. Ovocidní účinky však nemají.

Většina těchto komerčně dostupných léčiv proti oblym červům působí svým účinkem na nervový systém parazita. Zástupci této lékové skupiny působí jako agonisté acetylcholinu a řadí se sem levamisol, tetrahydropyrimidiny (pyrantel a morantel) a některé další strukturně podobné sloučeniny. Nedávné studie používající elektrofyziologickou techniku ukázaly, že povrch somatických svalových buněk nematod má nikotinové acetylcholinové receptory, které mohou být otevřeny pomocí nikotinových anthelmintik. Vazba těchto sloučenin na rozpoznávací místo excitačního receptoru vyvolá depolarizaci a spastickou paralýzu svalů červa a může vést k vypuzení parazita. Nikotinový receptor obratlovců je důkladně probádaný iontový kanál řízený ligandem pentamerní struktury složený z různých podjednotek. Detaily biochemické stránky nikotinového receptoru u oblym červů nebyly ještě odhaleny, ale vlastnosti podjednotkové sekvence a farmakologický profil tohoto kanálu jsou podobné nikotinovému receptoru u obratlovců.

Cílové místo levamisolu a nejspíš i pyrantelu, morantelu a dalších strukturně příbuzných sloučenin je farmakologicky odlišný iontový kanál, který tvoří nikotinový receptor na svalových buňkách nematod. Selektivní toxicita těchto látek je založena na jedinečných vlastnostech nikotinového receptoru nematod, které se zdají být farmakologicky rozdílné od homologních receptorů u vyšších živočichů (Köhler 2001).

Další anthelmintika

Tetrahydropyrimidinová skupina se vyznačuje výhradně antinematodním účinkem, je proto využívána především v polykompozitních anthelmintických přípravcích. Zástupci této skupiny jsou pyrantel a oxantel. Pyrantel je cholinergním agonistou působícím jako excitační neurotransmitter na acetylcholinových receptorech svalových buněk nematod. Jeho výsledným účinkem je spastická paralýza nematod, která jsou vypuzena peristaltikou střeva.

Primární cíl salicylanilidů a nitrofenolů a jejich selektivní toxicita u motolic, tasemnic a krev sajících hlístic není dostatečně prozkoumána. Zástupci těchto skupin narušují tvorbu ATP blokováním mitochondriální oxidační fosforylace (Köhler 2001).

2.1.3.2 Další metody léčby

Jiné než chemické možnosti kontroly parazitů jsou ve stádiu vyvíjení a zjišťování prospěšnosti a použitelnosti, tak aby mohly působit proti parazitickým formám v živočiších i proti volně žijícím formám na pastvě.

Nová metoda kontrolování parazitů, která nebyla ve Spojených Státech ještě zcela prozkoumána, spočívá v použití léčivých rostlin s anthelmintickými účinky. Na Novém Zélandu i v Evropě jsou důkazy o tom, že spásáním těchto rostlin obsahujících kondenzované taniny se snížil počet vajíček a larev ve fekáliích i počet dospělých parazitů ve slezu a v tenkém střevě (Fleming et al. 2006).

Nedávné studie zkoumaly houbu, která by se mohla používat jako biologická léčba proti volně žijícím formám v laboratorních i přírodních podmínkách. Tyto houby se nacházejí v půdě/rhizosféře po celém světě, kde se živí různými druhy volně žijících půdních nematod. Tyto houby zachytí hlístice do speciální lepkavé pasty na svých rostoucích hyfách. Podávací systém přimíchává spory hub do dodatkového krmiva, kterým musí být zvířata každý den krmena. Největším problémem je, jak zajistit, aby každé zvíře zkonzumovalo stejné množství krmiva. Další podmínkou účinnosti je, aby zvíře bylo krmeno těmito spory nejméně 60 dnů. Toto je velmi časově i finančně náročné, a proto se tento způsob léčby v současnosti nepoužívá.

V důsledku vzniku rezistence na anthelmintika, se začal výzkum soustřeďovat na vývoj vakcín. Již bylo vyvinuto několik úspěšných vakcín na plicnivku u dobytka a na tasemnice u ovcí. Vakcíny na červy malých přežvýkavců obsahují skrytý antigen a jsou namířeny přímo na *H. contortus*. Vakcíny byly zatím testovány jen v laboratorních podmínkách a jsou stále ve vývojovém procesu (Fleming et al. 2006).

2.2 REZISTENCE

Rezistence je u gastrointestinálních nematod celosvětově rozšířena. Rezistence na anthelmintika je definována jako pokles účinku anthelmintik na populaci parazitů, kteří jsou běžně citliví k těmto léčivům. Tento pokles citlivosti je způsobený vzrůstajícím počtem rezistentních alel, které vznikají výběrem při opakovaném používání anthelmintik. Gastrointestinální nematody u malých přežvýkavců vlastní řadu genů, které podporují vývoj rezistence na anthelmintika. Následkem toho tyto červi mají genetický potenciál k tomu, aby rychle a úspěšně reagovali na chemickou léčbu. Jsou schopni šířit své rezistentní geny při stěhování hostitele z jedné farmy na druhou (Fleming et al. 2006).

Rezistence na anthelmintika byla poprvé popsána v roce 1957 u parazita *Haemonchus contortus*, který byl vystaven dlouhodobému působení fenothiazinů. Rezistence představuje problém i v novějších třídách anthelmintik. Zdá se, že se rezistence objevuje ve všech třídách anthelmintik používaných k léčbě parazitických onemocnění. Byla zaznamenána i zkřížena rezistence (Coyne et al. 2001).

Předpokládá se, že během léčby anthelmintiky přežije malý počet červů, kteří tvoří základ pro rozvoj rezistence v dané populaci. Tito červi infikují pastviny rezistentními larvami, což vede postupně k selekčnímu tlaku na rezistenci. Četnost genů hraje důležitou roli pro stanovení, jak rychle se bude rozvíjet rezistence na anthelmintika v neléčené populaci. Dokonce i v přírodě dochází občas u červů k náhodným mutacím. Čím častěji k nim dochází, tím rychleji se rozvíjí rezistence na anthelmintika. Může se jednat o mutace té části receptoru, na kterou nasedají léčiva, nebo mutace způsobující rozdíly v enzymech, v transportu nebo v metabolismu anthelmintik. Rezistence se bude také rychleji rozvíjet, pokud budou geny pro rezistenci dominantní.

Nejběžněji používaný test k detekci rezistence na anthelmintika stále zůstává test redukce počtu vajíček v trusu (FECRT – Faecal Egg Count Reduction test). Test je vhodný pro všechna anthelmintika i pro anthelmintika, která jsou již metabolizována v těle hostitele. Metoda je založena na porovnání počtu vajíček v trusu před a po léčbě anthelmintiky. Vajíčka nematod jsou počítána v den aplikace a poté v určitých časových intervalech v závislosti na daném anthelmintiku. Při léčbě benzimidazoly (BZ) jsou vajíčka počítána v intervalu 8 – 10 dnů, u makrocyclických laktonů 14 – 17 dnů. Po těchto dnech by se již vajíčka v trusu neměla nacházet. Jestliže je snížen počet vajíček o víc než 95%, pak je anthelmintikum účinné a může se pokračovat v jeho užívání. K detekci rezistence se používají také různé laboratorní testy. Jeden z široce používaných je test líhnutí larev z vajíček (EHT – Egg Hatch test). Tento test se využívá k detekci BZ rezistence a je založen na ovocidním účinku benzimidazolových anthelmintik. Vajíčka jsou inkubována s různými koncentracemi BZ a sleduje se jejich líheň. Test vývinu larev (LDA – Larval Development test) umožňuje detekci rezistence u BZ i makrocyclických laktonů. Vajíčka nebo první larvální stádia obličejových červů jsou vystavena působení různých koncentrací anthelmintik. Sleduje se schopnost larev přežít v přítomnosti anthelmintika. Tento test je citlivější než metody FECRT a EHT, podle všeho je schopen detekovat rezistenci na anthelmintika, pokud 10% populace červů nese rezistentní geny (Papadopoulos 2008).

Mechanismus rezistence na benzimidazoly byl u helmintů důkladně prozkoumán. Bylo zjištěno, že rezistentní červi ztratili vysokou afinitu vazebných míst pro tato léčiva na podjednotce mikrotubulu, což ukazují testy s navázanými

radioligandy. Studie molekulární genetiky ukazují, že BZ rezistence u helmintů je spojena s výběrem specifických alel jednoho nebo dvou různých izotypů β -tubulinu. Při infikování ovcí za použití *H. contortus* došlo velmi rychle ke ztrátě alel izotypu 1 a následoval výběr červů nesoucích delecii izotypu 2. V dalších studiích byl testován pomocí PCR techniky v izolátu z *Haemonchus* vztah mezi BZ rezistencí a náhradou fenylalaninu za tyrosin v poloze 200 genu kódujícího β -tubulin. Experimentální důkazy získané ze studií s *H. contortus* a dalšími červy z čeledi *Trichostrongylidae* jasně ukazují, že počáteční rezistence na benzimidazoly je spojena s bodovou mutací genu pro izotyp 1 β -tubulinu, a že důsledkem další selekce je kompletní ztráta alel izotypu 2 v populaci. Kvůli vysokému stupni rezistence je však třeba uvažovat i o dalších mechanismech (Köhler 2001).

Kmen citlivý na anthelmintika (ISE) a benzimidazolový-rezistentní kmen (IRE) *Haemonchus contortus*

V předložené práci byly sledovány a porovnávány aktivity biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slezové. Experimenty byly prováděny s citlivými a rezistentními kmeny, které se získávají pomocí inbreeding.

Při zkoumání genetické rozmanitosti u několika populací *H. contortus* se ukázalo, že existuje široká genetická různorodost, ale výběr léčiva nemá na ni skoro žádný vliv. Z tohoto důvodu tyto populace nemohou být použity pro sestavení genetické mapy ani pro identifikaci genů způsobujících rezistenci. Proto se provedl inbreeding, který snížil různorodost a vedl k fixaci alel. Pro inbreeding byl vybrán BZ-citlivý kmen *H. contortus* z SE populace z Edinburgu a BZ-rezistentní kmen z RE4 populace. Inbreeding byl proveden pomocí volného páření (HSM - half-sib mating). Patnáct HSM proběhlo v každé populaci. Do bacheru ovcí bylo vstříknuto třetí larvální stádium, které se ve slezu vyvinulo do dospělých jedinců. Vajíčka z dospělých samic nebo z trusu byla kultivována do třetího larválního stádia a následně znovu aplikována do bacheru ovcí. Inbreeding vedlo ke vzniku dvou druhů populace – BZ-citlivý (ISE) kmen a BZ-rezistentní (IRE) kmen. Teoretický koeficient inbreeding pro citlivou a rezistentní populaci je 0,87. Pro kontrolu, zda se během inbreeding udržuje BZ-citlivá nebo BZ-rezistentní populace, byl prováděn test líhnutí larev. BZ citlivost a rezistence posledních tří generací v každém kmeni byla také kontrolována pomocí PCR metody. Získání těchto dvou ISE a IRE kmenů umožnilo studovat a analyzovat genetickou podstatu rezistence na anthelmintika (Roos et al. 2004).

White-River kmen *Haemonchus contortus*

Pro sledování aktivity biotransformačních enzymů u vlasovky slezové byl použit také multirezistentní White-River (WR) kmen z Jižní Afriky. Tento WR kmen je rezistentní na ivermektin, ale také na benzimidazoly, rafoxanid a closantel. Tento kmen se nachází na pastvinách Kikuyu v Keni (Le Jambre et al. 1994, Van Wyk et al. 1987).

2.3 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U HELMINTŮ

Mnoho xenobiotických sloučenin (např. polutanty z životního prostředí, léčiva a potravní přísady) neustále vstupuje do těl živočichů. V organismu je většina těchto xenobiotik metabolizována jedinečnými enzymy na polárnější metabolity, které jsou jednodušeji vylučovány. Metabolismus xenobiotik probíhá ve třech fázích. V I. fázi metabolismu dochází k oxidaci, redukci a hydrolýze. Ve II. fázi probíhají u xenobiotik nebo u metabolitů z první fáze konjugační reakce s endogenními sloučeninami. Glutathion, glukuronová kyselina, aminokyseliny a sulfáty reprezentují nejdůležitější konjugační činidla. Třetí fázi metabolismu xenobiotik představuje aktivní transport substrátů, metabolitů nebo konjugátů přes membrány, který je zprostředkován pomocí speciálních bílkovinných transportérů (Cvilink et al. 2009).

Parentní sloučenina, metabolit a konjugát mají zpravidla rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, farmakodynamické účinky a stejně tak rozdílnou toxicitu a farmakokinetiku. Přítomnost biotransformačních enzymů a jejich aktivita určuje způsob a stupeň metabolizace chemického léčiva nebo jiného xenobiotika. Časté podávání farmakologicky aktivních látek má za následek vznik indukce a inhibice biotransformačních enzymů. Indukce způsobí zvýšení aktivity biotransformačních enzymů. K nárůstu aktivity dochází především v důsledku zvýšené genové exprese a/nebo snížené degradace proteinů. Inhibice neboli snížená aktivita biotransformačních enzymů je způsobená interakcí xenobiotik s již hotovými enzymy (Velík et al. 2004).

Aktivita biotransformačních enzymů tedy podstatně ovlivňuje žádoucí i nežádoucí účinky podaných léčiv nebo jiných xenobiotik. Biotransformační enzymy fungují ve všech organismech jako účinná obrana proti možným negativním vlivům xenobiotik. Tyto enzymy mohou do určité míry chránit parazity před toxickými účinky anthelmintik. Schopnost biotransformačních enzymů inaktivovat anthelmintika pomocí biotransformace představuje výhodnou obrannou strategii u parazitů (Cvilink et al. 2008a). Nedávné studie ukázaly, že rozvoj rezistence je částečně spojen se systémem enzymů a transportérů, které chrání organismus před škodlivým působením xenobiotik (Cvilink et al. 2009).

2.3.1 Fáze I biotransformace

Popsány jsou jen ty enzymy, kterými jsem se zabývala v experimentální části.

2.3.1.1 Redukční enzymy

I když je oxidace častější než redukce, představuje redukce hlavní metabolickou cestu u sloučenin, jako jsou ketony, aldehydy, chinony, nitro sloučeniny, N-oxidy nebo S-oxidy. Karbonylové sloučeniny jsou široce rozšířeny v přírodě a představují vážnou hrozbu pro žijící organismy, protože jsou schopny reagovat s buněčnými makromolekulami. Aldehydy a ketony jsou škodlivé pro buňky, protože se mohou kovalentně vázat se sekundárními aminoskupinami a thiolovými skupinami bílkovin (O'Connor et al. 1999).

Redukční enzymy tedy chrání organismy před toxickými účinky reaktivních aldehydů a ketonů. Význam karbonylreduktas u *H. contortus* spočívá v tom, že působí proti účinku anthelmintik a jiných xenobiotik nesoucích karbonylovou skupinu. Substráty reduktas a dehydrogenas nejsou jen xenobiotika, ale i mnoho endogenních látek.

V buňce je ochrana proti reaktivním karbonylovým sloučeninám zabezpečena několika rodinami detoxifikačních enzymů (O'Connor et al. 1999).

Redukční enzymy rozdělujeme do tří nadrodin proteinů:

- Reduktasy/dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)
- Reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR)
- Aldo-ketoreduktasy (AKR)

SDR jsou rozpustné bílkoviny, většinou se jedná o dimery nebo tetramery, obsahující přibližně 270 aminokyselin v monomeru a charakterizované katalytickou triádou (Ser, Tyr a Lys) v aktivním místě.

AKR jsou nejčastěji monomerní, NAD(P)H dependentní enzymy, dosahují délky 320 aminokyselin a v aktivním místě obsahují tetrádu (Tyr, His, Asp a Lys) (Combourieu et al. 2004). Strukturu tvoří 8 α -helixů a 8 β -skládaných listů uspořádaných do soudku. Názvosloví AKR vychází z podobnosti sekvence aminokyselin. Aldo-ketoreduktasy se označují symbolem AKR, arabskou číslicí označující rodinu, písmenem představující podrodinu a další arabskou číslicí určující jedinečnou proteinovou sekvenci (Jez et al. 1997).

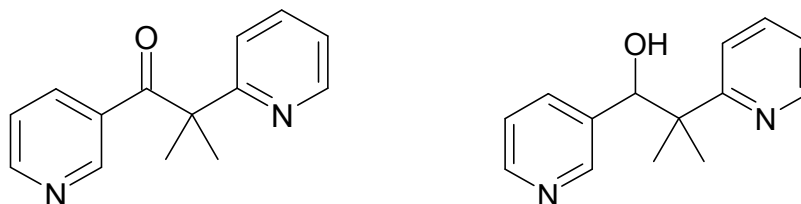
Karbonylové reduktasy jsou přítomné v různých organismech. Byly nalezeny v prokaryotech i eukaryotech, včetně kvasinek, rostlin, obojživelníků a savců (Hyndman et al. 2003).

Studium enzymů redukujících karbonylovou skupinu sloučenin je důležité nejen pro předvídání metabolismu léčiv s touto skupinou v organismech, ale taky pro porozumění možnosti jejich ovlivnění. Navzdory tomu, jsou však znalosti o reduktasách karbonylové skupiny u parazitů stále nedostatečné. V současné době jsou intenzivně zkoumány především lidské reduktasy.

Abychom tuto nepříznivou situaci napravili, stanovili jsme aktivity enzymů redukujících karbonylovou skupinu u jednotlivých kmenů vlasovky slezové. Pro stanovení aktivit karbonylreduktas byly použity substráty: metyrapon, daunorubicin, DL-glyceraldehyd, 4-pyridinkarboxaldehyd a oracin.

Metyrapon

Metyrapon (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon) je redukován na alkoholický metabolit metyrapol (obr. 3), jak cytosolickými, tak mikrosomálními enzymy náležícími do nadrodiny aldo-ketoreduktas (dihydrodioldehydrogenasy) a krátkořetězcových dehydrogenas/reduktas (karbonylreduktasa, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typ 1, 11 β -HSD 1) v přítomnosti NADPH anebo NADH jako kofaktoru (Maser, Oppermann 1997, Combourieu et al. 2004).

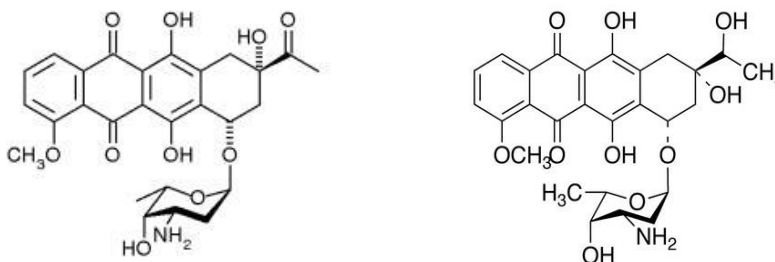


Obr. 3: Metyrapon a jeho alkoholický metabolit (+/-)-metyrapol

Daunorubicin

Daunorubicin je pevná látka oranžovo-červené barvy. Je využíván jako cytostatikum při léčbě akutní leukémie.

Daunorubicin je redukován na daunorubicinol reduktasami, z nichž jedna, aldehydreduktasa vykazuje nejvyšší redukční aktivitu při pH 8,5 a druhá, karbonylreduktasa při pH 6,0.

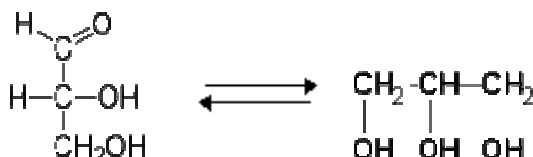


Obr. 4: Daunorubicin a jeho redukováný metabolit daunorubicinol

DL-Glyceraldehyd

DL-Glyceraldehyd je endogenní substrát redukováný v cytosolu většiny savčích orgánů na glycerol aldehydreduktasou (AKR1A1).

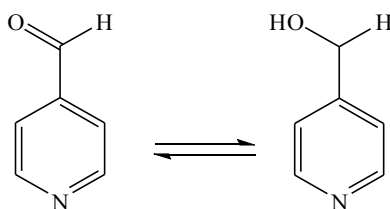
Jedná se o pevnou látku obtížně rozpustnou ve vodě a dobře rozpustnou v dimethylsulfoxidu (DMSO).



Obr. 5: Redukce DL-glyceraldehydu na glycerol

4-Pyridinkarboxaldehyd

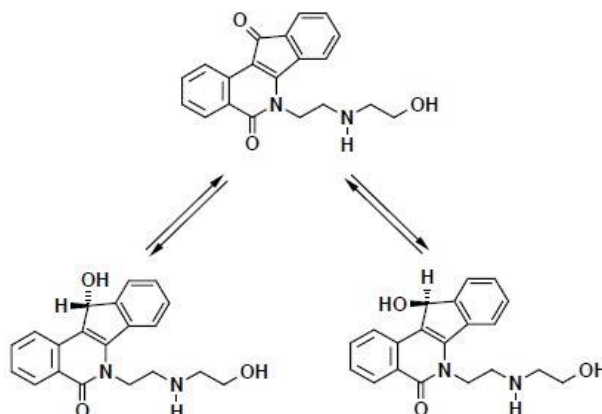
4-Pyridinkarboxaldehyd je redukován v cytosolické frakci lidských jater aldehydreduktasou (AKR1A1). V mikrosomální frakci je redukován 3 α -HSD (Maser 1995).



Obr. 6: Redukce 4-pyridinkarboxaldehyd na 4-pyridylkarbinol

Oracin

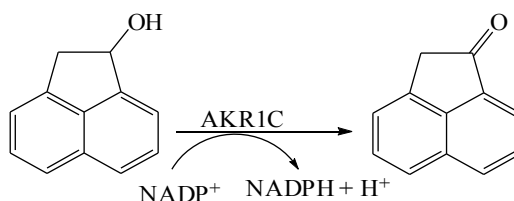
Oracin, 6-[2-(2-hydroxyethyl)aminoethyl]-5,11-dioxo-5,6-dihydro-11*H*-indeno[1,2-*c*] isochinolin, je potenciální cytostatikum pro orální podání. Hlavním metabolitem oracinu je 11-dihydrooracin (DHO). Tento chirální metabolit vzniká redukcí karbonylové skupiny v pozici 11 molekuly. Oracin je redukován mikrosomálním enzymem 11 β -HSD 1 a cytosolickými enzymy karbonylreduktasou a aldo-ketoreduktasami podrodiny 1C.



Obr. 7: Metabolická přeměna oracinu na (+)-DHO a (-)-DHO enantiomery

Acenaftenol

Tento substrát je přeměňován cytosolickými aldo-ketoreduktasami AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4. Oxiduje se na acenaftenon a zároveň se NADP^+ redukuje na NADPH.



Obr. 8: Oxidace acenaftenolu na acenaftenon

2.3.1.2 Peroxidasa

Tento enzym brání vzniku nebezpečných hydroxylových radikálů oxidací peroxidu vodíku (H_2O_2). K oxidaci dochází pomocí cytochromu *c*, jako elektronového donoru. Peroxidasa byla nalezena v kvasinkách a bakteriích. Byla také popsána u některých červů jako *Fasciola hepatica* a *Schistosoma mansoni* (Bruschi, Lucchi 2001). Pro stanovení aktivity peroxidasy byl použit substrát *o*-fenylendiamin dihydrochlorid (OPD). OPD je tvořen hnědožlutými krystalky, které jsou málo rozpustné ve vodě, ale rozpustné v alkoholu a éteru.

2.3.1.3 Superoxiddismutasa (SOD)

SOD je jeden z nejdůležitějších enzymů nalezených v helmitech. Superoxiddismutasa katalyzuje přeměnu superoxidového aniontu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku a kyslík. SOD existuje ve třech formách, které se liší od sebe kovovým prvkem navázaným v aktivním místě. SOD obsahující železo byla nalezena v protozoích,

řasách a v některých vyšších rostlinách. SOD vázající mangan byla zjištěna ve vysokých koncentracích v mitochondriích u živočichů i bakterií a SOD obsahující měď a zinek byla nalezena v živočišných, včetně červů (Bruschi, Lucchi 2001). Pro stanovení aktivity SOD byla použita sada SOD Assay Kit-WST.

2.3.1.4 Katalasa

Katalasa je tetramerická molekula skládající se z podjednotek, které mají molekulovou hmotnost kolem 60 kDa a každá podjednotka obsahuje hematin, jako prostetickou skupinu. Enzym štěpící H_2O_2 byl nalezen ve většině organismů a tkání, ale není přítomen v anaerobních organismech. Aktivita tohoto enzymu byla zaznamenána také u nematod (Bruschi, Lucchi 2001). Pro stanovení aktivity katalasy byl použit fluorescenční substrát odvozený od europium-tetracyklinu.

2.3.2 Fáze II biotransformace

Na rozdíl od savců, bylo publikováno jen pár studií týkajících se detoxikačních enzymů II. fáze u parazitů, až na rodinu enzymů glutathion-S-transferasy. Zatímco se výzkum soustředí jen na glutathion-S-transferasy, jsou zbývající enzymy II. fáze u helmintů opomíjeny a přehlíženy (Cvilink et al. 2009).

2.3.2.1 Glutathion-S-transferasa

Nadrodina glutathion-S-transferas (GST) zahrnuje všudypřítomné, multisubstrátové, cytosolické i mikrosomální enzymy, které jsou zapojené do biotransformace endogenních sloučenin a xenobiotik, včetně léčiv a polutantů z životního prostředí. Katalyzují konjugaci elektrofilních sloučenin s glutathionem (GSH) (Cvilink et al. 2009).

Savčí GST mohou být členěny do několika vývojových tříd: Alfa (bazické), Mí (mírně neutrální), Pí (kyselé) a Theta. Toto rozdělení bylo provedeno na základě podobnosti sekvencí a imunologické zkřížené reaktivity (Salinas, Wong 1999). Enzymy v jedné třídě mají přibližně stejné velké monomery (kolem 24 až 28 kDa), stejné sekvence aminokyselin (60 až 80%) a výraznou substrátovou specifitu, která se ale může částečně překrývat. Cytosolické GST byly nejvíce prostudovány v lidských, potkaních a myších tkáních, kde jsou hojně rozšířeny. Zdá se, že GST jsou doslova

všudypřítomné mezi aerobními organismy. Byly také nalezeny v rostlinách, rybách, hmyzu, houbách, kvasinkách a nedávno i v bakteriích (Wilce, Parker 1994).

Cytosolické GST mají dvě aktivní místa, která fungují nezávisle na sobě. Každé místo se skládá ze dvou oblastí vázající ligandy. Místo vázající GSH je vysoce specifické pro glutathion, zatímco místo vázající elektrofilní substrát je méně specifické (Wilce, Parker 1994).

Glutathion-S-transferasy byly detekovány u mnoha červů, zahrnující nematody, motolice a tasemnice. GST mají u různých druhů helmintů odlišnou substrátovou specifitu, katalytickou aktivitu i imunogennost. Sekvence transferas u helmintů vykazují velmi malou podobnost se sekvencemi savčích enzymů. Aktivity GST se různí v závislosti na konkrétní třídě helmintů. Nejvyšší aktivita byla naměřena u tasemnic a aktivita u gastrointestinálních parazitů je vyšší, než u parazitů krevních nebo tkáňových. Příčinou může být cytoplazmatický tegument, který způsobí, že jsou tasemnice vnímavější ke xenobiotikům. Relativně nízké hodnoty GST aktivity byly naměřeny u nematod (Cvilink et al. 2009).

Pro stanovení aktivity GST byl použit 1-chloro-2,4-dinitrobenzen jako substrát.

2.3.2.2 UDP-glukuronosyltransferasa

Glukuronidace představuje u savců hlavní konjugační reakci, kterou katalyzuje rodina enzymů - UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) (King et al. 2000). UGT jsou rodinou enzymů II. fáze metabolismu, které katalyzují konjugaci xenobiotik s glukuronovou kyselinou, čímž vznikají glukuronidy. Glukuronidy směřují ke snížení biologické aktivity, snížení distribuce a ke zvýšení exkrece z těla (Webb et al. 2004).

UGT jsou přítomny v mnoha tkáních, jsou to integrální proteiny lokalizované na luminální straně endoplazmatického retikula. UGT se na základě podobnosti sekvence dělí na dvě rozdílné podrodiny, na UGT1 a UGT2. Navzdory rozdílům v primární sekvenci aminokyselin mezi UGT1 a UGT2, sekvence domény nacházející se na C-konci proteinu je vysoce konzervativní. Tato doména slouží pro navázání UDP-glukuronové kyseliny. Aglykon vázající doména je na N-konci proteinu a je nejméně konzervativní (King et al. 2000).

Glukosidace je konjugační reakce katalyzována UDP-glukosyltransferasou (UGlcT) probíhající běžně v rostlinách, ale velmi vzácně v živočiších. Jediný O'Hanlon zaznamenal konjugaci s glukosou v metabolismu endogenních ekdysteroidů u *Ascaris suum* a *Parascaris equorum in vitro* (O'Hanlon et al. 1991).

Pro stanovení aktivity UGT a UGlcT byl použit substrát p-nitrofenol. p-Nitrofenol vytváří dvě krystalické formy. První forma je bezbarvá, druhá forma p-nitrofenolu má

žlutou barvu, která působením světelných paprsků přechází na červenou barvu. p-Nitrofenol je mírně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.

2.3.3 Fáze 0 a III

Za třetí fázi biotransformace se považuje transport xenobiotik. Transportéry, přenášející sloučeniny přes membrány, představují důležitý článek v detoxikaci xenobiotik. Známe dva typy přenašečů: transportéry importující xenobiotika do buněk (fáze 0) a přenašeče exportující xenobiotika nebo jejich metabolity ven z buněk (fáze III). Druhý typ transportéru byl zkoumán mnohem důkladněji, protože hraje důležitou roli při vzniku rezistence. Hlavní rodinou exportujících transportérů jsou ABC přenašeče (ATP-binding cassette). ABC přenašeče jsou všudypřítomné proteiny, nacházející se ve všech buňkách všech tříd od mikrobů až po člověka. ABC přenašeče zprostředkovávají aktivní přenos, jak lipofilních xenobiotik, tak hydrofilních metabolitů a konjugátů ven z buňky. Výzkum zkoumající transport léčiv se v současnosti soustředí zejména na P-glykoprotein (Pgp, ABCB1). P-glykoprotein je nejznámější ABC transportér a je to nejdůležitější efluxní pumpa účastnící se metabolismu xenobiotik.

ABC transportéry byly nalezeny i u mnoha tříd červů. První popsaný Pgp u červů byl zjištěn u *C. elegans*. U *H. contortus* byl Pgp nalezen podél celého trávicího traktu, nejvíce však v hltanu a v přední části střeva (Cvilink et al. 2009).

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo porovnání metabolismu anthelmintik a aktivit biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Tato práce je součástí grantového projektu „Vývoj lékové rezistence u helmintů – možné mechanismy a obrana“ (GAČR P502/10/0217). Aby bylo cíle dosaženo, byla provedena:

1. Příprava subcelulárních frakcí z dospělců tří kmenů *Haemonchus contortus* (citlivý - ISE, rezistentní na benzimidazoly - IRE, rezistentní na všechna anthelmintika - WR)
2. Sledování metabolismu vybraných anthelmintik pomocí *in vitro* inkubace subcelulárních frakcí tří kmenů vlasovky slezové s anthelmintiky
3. Sledování metabolismu vybraných anthelmintik pomocí *ex vivo* kultivace tří kmenů vlasovky slezové v CO₂ inkubátoru v médiu s anthelmintiky
4. Stanovení aktivit biotransformačních enzymů v subcelulárních frakcích vlasovky slezové
5. Porovnání jednotlivých kmenů *H. contortus*

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL

4.1.1. Chemikálie

- 1-chlor-2,4-dinitrobenzen, Fluka
- Acenaftenol, Aldrich
- Albendazol, Sigma
- Albendazolsulfoxid, Toronto Research Chemicals (TRC)
- Albendazolsulfon, TRC
- Daunorubicin, Sigma
- DL-Glyceraldehyd, BDH
- Flubendazol, TRC
- Flubendazol redukovaný, TRC
- UDP-glukosa, Sigma
- Glutathion, Fluka
- Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma
- Katalasa, Sigma
- Metyrapon, Fluka
- NADPH, Merck
- NADP⁺, Merck
- Medium RPMI-1640
- Oracin
- Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma
- p-nitrofenol, Fluka
- 4-pyridinkarboxaldehyd, Aldrich
- Roztok bicinchoninové kyseliny, Sigma
- UDP-glukuronová kyselina, Sigma
- Ostatní běžné chemikálie čistoty p.a.

4.1.2 Přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBS 22
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

- Concentrator 5301
- Digitální pH - metr Jenway LTD 3020
- Laboratorní magnetická míchačka IKA Color Squid Hytel HTR 8068
- Luminiscenční spektrofotometr Perkin Elmer LS 50 B
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf
- Ultracentrifuga Sorvall OTD Combi
- Ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070
- UV-VIS spektrofotometr Unicam Helios β
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu (HPLC)
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series

4.1.3 Biologický materiál

Jehňata ovce domácí (cca 2 - 3 měsíce stará) byla infikována perorálně suspenzí s 5000 larvami L3 *Haemonchus contortus*. Po 6 týdnech byla jehňata usmrcena a slezy s vlasovkami byly převezeny do laboratoře. K izolování živých dospělých vlasovek byla použita metoda agarových sít. Byly izolovány citlivé a rezistentní kmeny *H. contortus*: citlivý (ISE) kmen, BZ-rezistentní (IRE) kmen a multirezistentní White-River (WR) kmen. Získané vlasovky byly třikrát promyty fyziologickým roztokem (37°C), a poté buď zamraženy v hlubokomrazicím boxu na -80°C nebo přímo použity pro *ex vivo* kultivace.

4.2 PRACOVNÍ POSTUP

4.2.1 Příprava pufrů a médií

Tris - HCl pufr 0,1 M pH 7,4

Navážka 6,06 g trishydroxymethylaminomethanu byla rozpuštěna ve 300 ml redestilované vody a pH upraveno pomocí 1 M HCl na 7,4 za stálého míchání a kontroly pH. Pufr byl následně doplněn redestilovanou vodou na 500 ml.

Tris - HCl pufr 0,1 M pH 8,9

Navážka 1,21 g trishydroxymethylaminomethanu byla rozpuštěna ve 100 ml redestilované vody. Přiléváním 0,1 M HCl za kontroly pH na pH-metru při laboratorní teplotě bylo pH upraveno na 8,9.

Tris - HCl pufr 0,2 M pH 8,5

Navážka 2,42 g trishydroxymethylaminomethanu byla rozpuštěna ve 100 ml redestilované vody. Přiléváním 0,2 M HCl za kontroly pH na pH-metru při laboratorní teplotě bylo pH upraveno na 8,5.

Sodnofosfátový pufr 0,1 M pH 7,4

Nejdříve byly připraveny jednotlivé složky: 1000 ml 0,1 M roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (navážka 35,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 250 ml 0,1 M roztoku dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (navážka 3,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Jednotlivé složky byly připraveny do odměrných baněk a potom slévány za stálého míchání a kontroly pH až bylo dosaženo požadované hodnoty pH 7,4.

Sodnofosfátový pufr 0,1 M pH 6,5

Nejdříve byly připraveny jednotlivé složky: 50 ml 0,1 M roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (navážka 1,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 50 ml 0,1 M roztoku dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (navážka 0,78 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Roztoky byly slévány za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru až bylo dosaženo požadované hodnoty pH 6,5.

Draselnofosfátový pufr 0,1 M pH 6,0

Nejdříve byly připraveny jednotlivé složky: 0,1 M roztok hydrogenfosforečnanu draselného a 0,1 M roztok dihydrogenfosforečnanu draselného. Roztoky byly slévány za stálého míchání a kontroly pH na pH-metru až bylo dosaženo požadované hodnoty pH 6,0.

Roztoky k in vitro inkubaci FLU se subcelulárními frakcemi

K inkubaci *in vitro* FLU se subcelulárními frakcemi bylo potřeba připravit 3 roztoky FLU o koncentracích 0,1, 0,5, 1,0 mM. Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 5 mM. Navážka FLU 1,565 mg byla rozpuštěna v 1 ml DMSO.

Smísením 200 μ l zásobního roztoku s 800 μ l DMSO vznikl roztok A o koncentraci 1 mM (koncentrace v inkubační směsi 10 μ M).

Roztok B o koncentraci 0,5 mM byl získán smísením 200 μ l roztoku A s 200 μ l DMSO (koncentrace v inkubační směsi 5 μ M).

Roztok C o koncentraci 0,1 mM byl získán smísením 100 μ l roztoku A s 900 μ l DMSO (koncentrace v inkubační směsi 1 μ M).

Roztoky k in vitro inkubaci ABZ se subcelulárními frakcemi

K inkubaci *in vitro* ABZ se subcelulárními frakcemi bylo potřeba připravit 3 roztoky ABZ o koncentracích 0,1, 0,5, 1,0 mM. Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mM (koncentrace v inkubační směsi 10 μ M). Navážka ABZ 1,327 mg byla rozpuštěna v 5 ml methanolu.

Smísením 500 μ l zásobního roztoku s 500 μ l methanolu vznikl roztok A o koncentraci 0,5 mM (koncentrace v inkubační směsi 5 μ M).

Roztok B o koncentraci 0,1 mM byl připraven smísením 100 μ l zásobního roztoku s 900 μ l methanolu (koncentrace v inkubační směsi 1 μ M).

Roztoky k ex vivo inkubaci FLU s Haemonchus contortus

K inkubaci *ex vivo* FLU s *Haemonchus contortus* bylo potřeba připravit pufr PBS (Phosphate Buffered Saline) o koncentraci 0,01 M. Pět tablet PBS se rozpustilo v 1 litru redestilované vody. K 500 ml roztoku PBS bylo přidáno 5 ml antibiotik (ATB, PENICILIN 6 mg/ml + STREPTOMYCIN 10 mg/ml).

K 500 ml média (RPMI-1640) byl přidán 1 g NaHCO₃, 4 g glukózy, 500 μ l amfotericinu, 5 ml ATB a nakonec se médium provzdušnilo pneumoxidem pro úpravu pH na 7,4.

Dále bylo potřeba připravit 10 mM zásobní roztok FLU, navážka FLU 1,57 mg byla rozpuštěna v 500 μ l DMSO. Zásobní roztok 1 mM byl připraven smícháním 50 μ l 10 mM roztoku s 450 μ l DMSO. Následně bylo smícháno 50 ml média s 50 μ l 10 mM zásobního roztoku FLU (koncentrace FLU v médiu 10 μ M) a 50 ml média bylo smícháno s 50 μ l 1 mM zásobního roztoku FLU (koncentrace v médiu 1 μ M).

Současně byl připraven roztok pro slepé vzorky smísením 10 ml média s 10 μ l DMSO.

4.2.2 Příprava subcelulárních frakcí

Vlasovky z třech kmenů byly rozváženy. K 3,34 g vlasovek z ISE kmene bylo přidáno 4 ml 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4, k 2,56 g vlasovek z IRE kmene bylo napipetováno 3 ml pufru, k 6 g vlasovek z WR kmene bylo přidáno 6 ml pufru. Následně byla provedena homogenizace za snížené teploty ve skleněném homogenizátoru s rotujícím teflonovým pístem a sonikace ultrazvukovým homogenizátorem (Sonopuls). Homogenát se přelil do kyvet a byla provedena první centrifugace (centrifuga Heraeus, 20 min., 5000 g, 4°C). Supernatant byl přelit do čistých kyvet a provedla se druhá centrifugace na 20 000 g, po dobu 60 min. při 4°C v téže centrifuze.

Peleta z 2. centrifugace byla resuspendována v 5 ml sodnofosfátového pufru pH 7,4 a znovu byla provedena centrifugace v centrifuze Heraeus. Vzniklá peleta byla resuspendována v sodnofosfátovém pufru s 20 % (v/v) glycerolu, a tímto byla získána frakce MIT. Tato frakce obsahuje hlavně mitochondrie.

Supernatant z druhé centrifugace byl přelit do centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu. Kyvety byly vloženy do rotoru ultracentrifugy Beckman, přístroj byl naprogramován na 105 000 g na 65 min. při 4°C. Supernatant z ultracentrifugy Beckman tvoří frakci CYT. Tato frakce při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje převážně cytosol.

K peletě z 3. ultracentrifugace byl přidán sodnofosfátový pufr pH 7,4 a opět se provedla centrifugace v ultracentrifuze Beckman. Supernatant byl vylit a peleta byla resuspendována v sodnofosfátovém pufru s 20 % (v/v) glycerolu. Takto byla získána frakce MIK, která obsahuje převážně mikrosomy.

Tyto frakce byly rozpipetovány do mikrozkušavek, zmraženy a uchovávány při -80°C v hlubokomrazícím boxu.

4.2.3 BCA stanovení bílkoviny

Metoda spočívá v reakci bílkovin s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^{1+} , která vytváří v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninovou kyselinou). Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství bílkoviny a měří se spektrofotometricky na přístroji Tecan při 562 nm. Koncentrace bílkoviny ve vzorku se získají z kalibrační přímky.

Byly připraveny roztoky:

Roztok A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M 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 se použil hovězí sérový albumin (BSA). V den potřeby byl připraven 1 % roztok (0,5 ml 20 % BSA byl doplněn do 10 ml redestilovanou vodou). Z tohoto základního roztoku bylo naředěním připraveno šest roztoků (tab. 2), které byly použity pro vytvoření kalibrační křivky.

Tab. 2: Příprava standardních roztoků BSA pro sestavení kalibrační křivky

	Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	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

Jednotlivé subcelulární frakce byly pro stanovení bílkoviny naředěny 10krát 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 mikrotitrační destičce bylo napipetováno 10 μl vzorku bílkoviny (roztok BSA nebo naředěné frakce MIT, CYT, MIK) a 200 μl roztoku C. Do první jamky byla napipetována jen redestilovaná voda. Slepý vzorek obsahoval místo bílkoviny 10 μl redestilované vody. Po promíchání se inkubovalo při 37°C po dobu 30 minut. Poté byla na spektrofotometrickém přístroji Tecan změřena absorbance při vlnové délce 562 nm proti destilované vodě. Od hodnot absorbance vzorků se odečetl průměr hodnot absorbance slepých vzorků.

4.2.4 *In vitro* sledování metabolismu ABZ a FLU u *Haemonchus contortus*

4.2.4.1 Inkubace ABZ se subcelulárními frakcemi

Frakce MIK a MIT z každého kmene (ISE, IRE, WR) byly inkubovány s albendazolem a 1 mM koenzymem NADPH. Koncentrace ABZ v reakční směsi byla 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M, přičemž od každé koncentrace proběhly tři paralelní inkubace. Současně byly připraveny slepé chemické vzorky, které neobsahovaly biologický materiál a slepé biologické vzorky, které neobsahovaly substrát.

Inkubační směs obsahovala:

- 3 μ l ABZ (0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM)
- 100 μ l biologického materiálu (frakce MIT, MIK)
- 100 μ l vodného roztoku NADPH
- 97 μ l fosfátového pufru pH 7,4

Celkový objem reakční směsi byl 300 μ l v každé mikrozkušavce. Do označených mikrozkušavek byla napipetována uvedená množství mikrosomů nebo mitochondrií, koenzymu a pufru při 0°C. Následně bylo připipetováno 3 μ l albendazolu postupně podle koncentrace. Inkubace probíhala 30 min při 37°C.

Byly inkubovány i slepé vzorky. Ve slepých vzorcích byl biologický materiál nahrazen puftrem nebo byl substrát nahrazen DMSO. Od každé koncentrace substrátu byl připraven a inkubován jeden slepý vzorek, který proběhl ve třech paralelních inkubacích.

4.2.4.2 Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi

Frakce CYT z každého kmene (ISE, IRE, WR) byly inkubovány s flubendazolem a 1 mM koenzymem NADPH. Koncentrace FLU v reakční směsi byla 1 μ M, 5 μ M a 10 μ M, přičemž od každé koncentrace proběhly tři paralelní inkubace. Současně byly připraveny slepé chemické vzorky, které neobsahovaly biologický materiál a slepé biologické vzorky, které neobsahovaly substrát.

Inkubační směs obsahovala:

- 3 μ l FLU (0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM)
- 100 μ l biologického materiálu (frakce CYT)
- 100 μ l vodného roztoku NADPH

97 μ l fosfátového pufru pH 7,4

Celkový objem reakční směsi byl 300 μ l v každé mikrozkušavce. Do označených mikrozkušavek byla napipetována uvedená množství cytosolu, koenzymu a pufru při 0°C. Následně bylo připipetováno 3 μ l flubendazolu postupně podle koncentrace. Inkubace probíhala 30 min. při 37°C.

Byly inkubovány i slepé vzorky. V slepých chemických vzorcích byl biologický materiál nahrazen puftrem. Od každé koncentrace substrátu byl inkubován jeden slepý vzorek, který proběhl ve třech paralelních inkubacích. Byl také inkubován slepý biologický vzorek, ve kterém byl substrát nahrazen DMSO. Od každého kmene byl inkubován jeden slepý biologický vzorek, který proběhl ve třech paralelních inkubacích.

4.2.4.3 Extrakce

Inkubace byla ukončena ochlazením reakční směsi na 0°C a přidáním 30 μ l koncentrovaného amoniaku. Ke směsi bylo připipetováno 700 μ l octanu ethylatého a intenzivně třepáno 2 minuty na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách za minutu. Potom bylo 600 μ l organické fáze odebráno do připravené vialky a extrakt odpařen v koncentrátoru. Suché vzorky byly označeny a uschovány v chladu a temnu, a potom vyhodnoceny pomocí HPLC.

4.2.5 *Ex vivo* sledování metabolismu FLU u *Haemonchus contortus*

4.2.5.1 *Ex vivo* inkubace *Haemonchus contortus* s FLU

Tři kmeny (ISE, IRE, WR) *Haemonchus contortus* izolované ze slezu ovce byly třikrát promyty puftrem PBS a následně dvakrát promyty puftrem PBS s antibiotiky. Do mikrozkušavek bylo vloženo vždy 20 kusů *H. contortus* s kouskem sterilní gázy a 1,5 ml média RPMI. *H. contortus* byl preinkubován v médiu v CO₂ inkubátoru 60 min při 37°C.

Po skončení preinkubace bylo odpipetováno médium a přidáno 1,5 ml média s FLU. Byly připraveny dvě koncentrace FLU (1 μ M, 10 μ M), přičemž od každé koncentrace proběhly 2 paralelní inkubace (u kmene IRE 4 paralelní inkubace).

Současně byly připraveny slepé biologické vzorky, které vznikly přidáním 1,5 ml roztoku média s DMSO k 20 *Haemonchus contortus* a slepé chemické vzorky, které neobsahovaly *H. contortus*, ale pouze médium s FLU. Inkubace probíhala v CO₂ inkubátoru 24 hod. při 37°C.

Po skončení inkubace bylo z každé mikrozkušavky odebráno třikrát 300 µl média s FLU a napipetováno do třech nových mikrozkušavek. Totéž se provedlo u slepých vzorků.

Zbylé vlasovky v mikrozkušavkách byly promyty redestilovanou vodou a následně byla provedena homogenizace za snížené teploty ve skleněném homogenizátoru s rotujícím teflonovým pístem a sonikace ultrazvukovým homogenizátorem (Sonopuls). Z tohoto homogenátu bylo odebráno dvakrát 300 µl do dvou nových mikrozkušavek.

4.2.5.2 Extrakce

Do prvních paralelních vzorků bylo přidáno 30 µl amoniaku a 700 µl octanu ethylatého a intenzivně třepáno 2 minuty na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách za minutu. Následně byla organická fáze odebrána do připravené vialky a extrakt odpařen v koncentrátoru. Postup u druhého a třetího paralelního měření byl stejný, ale organická fáze byla přenesena vždy do prvních vialek, ve kterých již byl odpařen extrakt z prvních paralelních vzorků.

Extrakce u vzorků s homogenátem proběhla stejným způsobem, jako u vzorků s médiem. Organická fáze z druhého paralelního měření byla přenesena do prvních vialek, ve kterých již byl odpařen extrakt z prvního paralelního měření. Suché vzorky byly označeny a uschovány v chladu a temnu, a potom vyhodnoceny pomocí HPLC.

4.2.6 Stanovení aktivity redukčních biotransformačních enzymů

4.2.6.1 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 $\text{NADPH/NADP}^+ \epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas. Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako oxidace 1 μmol NADPH/min při 25°C (Ohara et. 1995, Kawamura et al. 1999, Felsted et al. 1979, Penning et al. 1984).

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

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μl . Zásobním roztokem substrátu byl 0,1 M vodný roztok metyraponu ($M_r = 226$).

Po přidání každé složky byla kyveta uzavřena parafínem a směs byla několikerým převrácením kyvety promíchána. Spektrofotometr Helios β byl vynulován na slepý vzorek, který obsahoval pouze první tři složky (bez enzymu). Reakce byla odstartována přidáním enzymu (nutno směs promíchat). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Helios β při 340 nm vždy v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení aktivity reduktas metyraponu bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.6.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 6,0)

Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C).

Reakční směs v kyvetě: 930 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,0)
10 μl substrátu (0,01 mM – zásobní roztok 1 mM)
10 μl NADPH (0,1 mM – zásobní roztok 10 mM)
50 μl enzymu (frakce CYT kmene ISE, IRE, WR)

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μl . Zásobním roztokem substrátu byl 1 mM vodný roztok daunorubicinu ($M_r = 564$).

Po přidání jedné ze složek byla kyveta uzavřena parafínem a směs byla několikerým převrácením kyvety promíchána. Spektrofotometr Helios β byl vynulován na slepý vzorek, který obsahoval pouze první tři složky (bez enzymu). Reakce byla odstartována přidáním enzymu (nutno směs promíchat). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Helios β při 340 nm vždy v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.6.3 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 8,5)

Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C).

Reakční směs v kyvetě: 930 μl TRIS-HCl pufru (0,2 M, pH 8,5)
 10 μl substrátu (0,01 mM – zásobní roztok 1 mM)
 10 μl NADPH (0,1 mM – zásobní roztok 10 mM)
 50 μl enzymu (frakce CYT kmene ISE, IRE, WR)

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μl . Zásobním roztokem substrátu byl 1 mM vodný roztok daunorubicinu ($M_r = 564$). Pro stanovení byl použit TRIS-HCl pufr (0,2 M, pH 8,5).

Po přidání každé složky byla kyveta uzavřena parafínem a promíchána. TRIS-HCl pufr, substrát a NADPH tvořily slepý vzorek, na který byl spektrofotometr Helios β vynulován. Reakce byla odstartována přidáním enzymu (nutno směs promíchat). Absorbance byla měřena na spektrofotometru Helios β při 340 nm vždy v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.6.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C).

Reakční směs v kyvetě: 930 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,0)
 10 μl substrátu (10 mM – zásobní roztok 1 M)
 10 μl NADPH (0,3 mM – zásobní roztok 30 mM)
 50 μl enzymu (frakce CYT, MIT, MIK všech tří kmenů)

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μl . Zásobním roztokem substrátu byl 1 M roztok DL-glyceraldehydu ($M_r = 90,08$) v dimethylsulfoxidu.

Po přidání každé složky byla kyveta uzavřena parafínem a promíchána. Draselno-fosfátový pufr, substrát a NADPH tvořily slepý vzorek, na který byl

spektrofotometr Helios β vynulován. Reakce byla odstartována přidáním enzymu (nutno směs promíchat). Hodnoty absorbance byly odečítány při 340 nm v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení aktivity reductas DL-glyceraldehydu bylo provedeno ve třech paralelních vzorcích.

4.2.6.5 Stanovení aktivity reductas 4-pyridinkarboxaldehydu

Stanovení aktivity reductas 4-pyridinkarboxaldehydu je založeno na proměření poklesu absorbance způsobeném přeměnou NADPH na NADP^+ ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C).

Reakční směs v kyvetě:

- 970 μl draselno-fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,0)
- 10 μl substrátu (1 mM – zásobní roztok 0,1 M)
- 10 μl NADPH (0,1 mM – zásobní roztok 10 mM)
- 10 μl enzymu (frakce CYT, MIT, MIK všech tří kmenů)

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μl . Zásobním roztokem substrátu byl 0,1 M vodný roztok 4-pyridinkarboxaldehydu ($M_r = 107,11 \text{ g/mol}$, $1,122 \text{ g/cm}^3$).

Po přidání každé složky byla kyveta uzavřena parafínem a promíchána. Spektrofotometr Helios β byl vynulován na slepý vzorek, který obsahoval pouze první tři složky (bez enzymu). Reakce byla odstartována přidáním enzymu (nutno směs promíchat). Hodnoty absorbance byly odečítány při 340 nm v čase 0 minut a 4 minuty. Stanovení aktivity reductas 4-pyridinkarboxaldehydu 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 1 minutu. Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

$$a = (A / \epsilon) * V * D / 1 \text{ [nmol/min]}$$

a..... aktivita

A..... absorbance

ϵ molární absorpční koeficient NADPH/ NADP^+ ($\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V..... objem reakční směsi v kyvetě

D..... zředění

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

4.2.6.6 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu

Stanovení aktivity acenaftenoldehydrogenasy spočívá v měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP^+ na NADPH ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Současně dochází k oxidaci acenaftenolu. Pro stanovení byl použit spektrofotometr Perkin Elmer LS 50B.

Reakční směs v kyvetě: 930 μl TRIS-HCl pufru (0,1 M, pH 8,9)
10 μl acenaftenolu (1,5 mM – zásobní roztok 0,15 M)
10 μl NADP^+ (1 mM – zásobní roztok 0,1 M)
50 μl enzymu (frakce CYT kmene ISE, IRE, WR)

Standardní přídavek: 10 μl NADPH v TRIS-HCl pufru (0,1 M, pH 8,9)

Parametry:
excitace: 340 nm
emise: 480 nm
doba inkubace: 180 s

Celkový objem v kyvetě byl 1000 μl . Pro stanovení byl použit TRIS-HCl pufr (0,1 M, pH 8,9). Zásobním roztokem substrátu byl 0,1 M roztok acenaftenolu ($M_r = 170,2$ g/mol) v dimethylsulfoxidu. TRIS pufr, NADP^+ a frakce tvořily slepý vzorek (bez acenaftenolu). Napipetováním pufru, substrátu a cytosolu do kyvety bylo spuštěno měření. V 50. sekundě byl připipetován koenzym NADP^+ , který nastartoval reakci. V 150. sekundě byl přidán standardní přídavek NADPH a měření bylo ukončeno v 180. sekundě.

Pomocí programu byly odečteny hodnoty intenzity fluorescence na začátku a na konci přídávku NADPH. Pro výpočet byla zjištěna také směrnice přímky.

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita [nmol/min/ml]

k..... směrnice přímky

A..... intenzita fluorescence na začátku přídávku NADPH

B..... intenzita fluorescence na konci přídávku NADPH

n..... látkové množství standardního přídávku v 1 ml

D..... zředění cytosolu v reakční směsi

60..... přepočet na minuty

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

4.2.6.7 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu

Metoda je založena na inkubaci cytosolu všech tří kmenů ISE, IRE a WR s oracinem. Následně byla provedena extrakce a HPLC stanovení metabolitu dihydrooracinu.

Inkubační směs o celkovém objemu 300 μ l obsahovala:

- 100 μ l 1 mM oracinu
- 50 μ l 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4
- 100 μ l 3 mM vodného roztoku NADPH
- 50 μ l frakce CYT všech tří kmenů ISE, IRE, WR

Do označených mikrozkušavek byly napipetovány první tři složky a tato směs byla preinkubována 5 minut při 37°C. Následně bylo do mikrozkušavek připipetováno 50 μ l frakce CYT a reakční směs byla promíchána. Současně byly vytvořeny i slepé vzorky. V slepém chemickém vzorku byla frakce nahrazena 50 μ l sodnofosfátového pufru. Slepý biologický vzorek obsahoval místo oracinu 100 μ l redestilované vody. Z každého kmene byl inkubován jeden slepý vzorek. Všechny vzorky proběhly ve třech paralelních inkubacích.

Inkubace při 37°C byla ukončena po 30 minutách vložím inkubační směsi do ledové lázně a přidáním 30 μ l amoniaku. Ke směsi bylo připipetováno 700 μ l octanu ethylnatého a intenzivně třepáno 2 minuty na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách za minutu. Potom byla horní vrstva odebrána do připravené vialky a extrakt odpařen v koncentrátoru. Suché vzorky byly označeny a uschovány v chladu a temnu, a potom vyhodnoceny pomocí HPLC.

Výpočet aktivity byl proveden na základě množství dihydrooracinu ve vzorku, byla zohledněna doba inkubace a zředění. Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

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

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 a [nmol/min/mg].

4.2.7 Stanovení aktivity oxidačních enzymů

4.2.7.1 Stanovení aktivity peroxidasy pomocí o-fenylendiaminu dihydrochloridu (OPD)

Aktivita peroxidasy byla stanovena oxidací o-fenylendiaminu. Vzniklý 2,2'-diaminoazobenzen byl stanoven spektrofotometricky na přístroji Tecan při 490 nm. Reakce probíhala v přítomnosti peroxidu vodíku.

Pro stanovení byl použit TRIS-HCl pufr (50 mM, pH 8,0) s 0,1 % Tritonem X-100. 5,86 μ l H₂O₂ 29 % bylo rozpuštěno v 50 ml TRIS pufru. 10 ml z tohoto roztoku bylo odebráno pro rozpuštění 18,11 mg substrátu OPD. Frakce CYT, MIT, MIK (ISE, IRE, WR kmene) bylo potřeba před použitím naředit fosfátovým pufrem v poměru 1 : 4. Do každé jamky na mikrotitrační destičce bylo napipetováno 50 μ l zředěných frakcí, a poté multikanálovou pipetou bylo připipetováno 50 μ l roztoku substrátu OPD v TRIS pufru s H₂O₂. Slepý vzorek obsahoval místo frakce 50 μ l fosfátového pufru. Všechny vzorky proběhly ve čtyřech paralelních inkubacích. Do první jamky byla napipetována jen redestilovaná voda.

Inkubace při 37°C byla ukončena po 30 minutách přidáním 25 μ l 4 M H₂SO₄. Absorbance byla změřena na přístroji Tecan při 490 nm proti destilované vodě. Od hodnot absorbance vzorků se odečetl průměr hodnot absorbance slepých vzorků. Pro výpočet aktivity enzymu byl použit extinkční koeficient $\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

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

a aktivita

A absorbance

ϵ extinkční koeficient pro 2,2'-diaminoazobenzen ($1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V objem reakční směsi v jamce na mikrotitrační destičce

D zředění

30..... doba inkubace (min)

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

4.2.7.2 Stanovení aktivity superoxidodismutasy (SOD)

Metoda je založena na přeměně WST-1 (water-soluble tetrazolium salt) na WST-1 formazan, který je zbarvený v důsledku redukce superoxidovým aniontem. Superoxiddismutasa katalyzuje přeměnu superoxidového aniontu ($O_2^{\cdot-}$) na peroxid vodíku a kyslík. SOD tedy inhibuje přeměnu WST-1 na WST-1 formazan. Vzniklý WST-1 formazan byl stanoven spektrofotometricky při 450 nm. Inhibiční aktivita SOD je vyjádřena snížením barevnosti.

Pro stanovení aktivity SOD byly použity Kity – WST roztok, roztok enzymu SOD, roztok pufru a zředěný pufr.

WST pracovní roztok: 1 ml WST roztoku byl smíchán s 19 ml roztoku pufru

Pracovní roztok s enzymem: 15 μ l roztoku enzymu bylo smícháno s 2,5 ml zředěného pufru

Roztok vzorku: 20 μ l frakce CYT, MIK, MIT (z ISE, IRE, WR kmene), 200 μ l WST pracovního roztoku, 20 μ l pracovního roztoku s enzymem

Slepý vzorek I: 20 μ l destilované vody, 200 μ l WST pracovního roztoku, 20 μ l pracovního roztoku s enzymem

Slepý vzorek II: 20 μ l frakce CYT, MIK, MIT (z ISE, IRE, WR kmene), 200 μ l WST pracovního roztoku, 20 μ l zředěného pufru

Slepý vzorek III: 20 μ l destilované vody, 200 μ l WST pracovního roztoku, 20 μ l zředěného pufru

Do každé jamky na mikrotitrační destičce byly napipetovány jednotlivé složky podle rozpisu. Mikrotitrační destička byla inkubována při 37°C po dobu 20 minut. Po ukončení inkubace byla ihned změřena absorbance na spektrofotometru Tecan při 450 nm. Každému vzorku obsahujícímu 20 μ l frakce odpovídal jeden slepý vzorek II.

Všechny vzorky proběhly ve čtyřech paralelních inkubacích. Slepé vzorky I a III proběhly v osmi paralelních měřeních. Do první jamky byla napipetována jen redestilovaná voda.

Aktivita enzymu neboli její inhibiční podíl v % byl vypočten podle vzorce:

$$a = \{ [(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{vzorek}} - A_{\text{blank2}})] / (A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) \} * 100 (\%)$$

4.2.8 Stanovení aktivity katalasy

Stanovení aktivity katalasy je založeno na použití fluorescenčního substrátu odvozeného od europium-tetracyklinu.

Roztok I (10 mM Mops pufr) - navážka 1,15 g Mops sodné soli byla rozpuštěna v 400 ml destilované vody, pomocí 1 M HCl bylo pH upraveno na 6,9, pufr byl následně doplněn destilovanou vodou na 500 ml.

Roztok II (6,3 mM roztok Eu^{3+}) - navážka 115,3 mg $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ byla rozpuštěna v 50 ml Mops pufru.

Roztok III (2,1 mM roztok tetracyklinu) - navážka 50,5 mg tetracyklinu hydrochloridu byla rozpuštěna v 50 ml Mops pufru.

Roztok IV (EuTc standard) - 10 ml roztoku II bylo smícháno s 10 ml roztoku III, a poté rozpuštěno ve 100 ml Mops pufru.

Roztok V (katalasa) - 100 μl roztoku katalasy z hovězích jater (1 277500 j/ml) bylo rozpuštěno v 10 ml Mops pufru, později naředěno na požadovanou koncentraci.

Mikrotitrační destička byla zahřána na 30°C. Do každé jamky na mikrotitrační destičce bylo napipetováno 65 μl roztoku IV, 20 μl 5 mM vodného roztoku H_2O_2 a 165 μl Mops pufru. Po promíchání se nechala destička stát po dobu 10 minut. Po 10 minutách se přidalo 10 μl frakce CYT, MIK, MIT. Každý vzorek probíhal ve čtyřech paralelních měřeních. Do sedmi paralelních slepých vzorků bylo místo frakce napipetováno 10 μl sodnofosfátového pufru o pH 7,4. Zároveň bylo připraveno osm

paralelních vzorků standardu katalasy, kde bylo napipetováno 10 μ l roztoku katalasy. Destička byla inkubována při 37°C po dobu 30 minut.

Fluorescence byla měřena v přístroji Tecan při maximální excitační vlnové délce 378 nm a maximální emisní vlnové délce 613 nm. Od hodnot absorbance vzorků a standardu katalasy se odečetl průměr hodnot absorbance slepých vzorků. Aktivita katalasy byla vypočtena podle standardu katalasy. Standard katalasy obsahoval 50 jednotek/ml. 10 μ l standardu katalasy pipetovaných do jamek tedy obsahoval 0,5 jednotek. Na základě toho se vypočítalo, kolik jednotek obsahoval vzorek frakce. Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny, což je specifická aktivita enzymu a [μ mol/min/mg].

4.2.9 Stanovení aktivity konjugačních enzymů

4.2.9.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Princip metody je založen na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu za minutu při použití substrátu 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzen a 0,1 M redukovaného glutathionu (GSH) a enzymové katalýzy glutathion-S-transferasy.

Reakční směs:

- Substrát: 10 μ l 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzen ($M_r = 202,56$ g/mol), navážka 30,4 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml 95 % ethanolu.
- Konjugační činidlo: 10 μ l 0,1 M GSH ($M_r = 307,33$ g/mol), navážka 46,1 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.
- 0,1 M Na-fosfátový pufr pH 6,5
- 5 – 20 μ l frakce CYT všech tří kmenů ISE, IRE, WR

Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 1000 μ l. Nejdříve byl napipetován pufr, glutathion a cytosol, směs byla protřepána na třepačce, a poté byl připipetován substrát 1-chloro-2,4-dinitrobenzen. Směs byla promíchána a ihned měřena na UV-VIS spektrofotometru Helios β . Sledoval se nárůst absorbance při 340 nm. Byly měřeny 3 paralelní vzorky. Spektrofotometr Helios β byl vynulován na slepý vzorek, který obsahoval pufr, glutathion a cytosol (bez substrátu). Při hodnotě absorbance nad 0,800 bylo potřeba frakce CYT naředit.

Sledoval se průběh linearity měření a hodnota absorbance byla odečtena v čase 0, a poté po 60, 120, 180 sekundách. Pro výpočet aktivity enzymu byl použit rozdíl absorbancí naměřených v 60. a 180. sekundách. Od tohoto rozdílu byla odečtena průměrná hodnota absorbance slepého vzorku. Pro výpočet aktivity enzymu byl použit extinkční koeficient $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Aktivita enzymu byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita

A..... absorbance

ϵ extinkční koeficient pro S-2,4-dinitrofenylglutathion ($9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V..... objem reakční směsi v kyvetě

D..... zředění

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

4.2.9.2 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glucosyltransferasy (UGlCT)

Princip metody je založen na spektrofotometrickém stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid za enzymové katalýzy UGT.

Reakční směs:

- Substrát: 30 μl p-nitrofenol (0,556 mM), navážka 1,16 mg byla rozpuštěna v 15,00 ml redestilované vody pomocí ultrazvuku. Ve 100 μl reakční směsi je 0,0167 μmol p-nitrofenolu.
- Konjugační činidlo pro UGT: 30 μl UDP-glukuronová kyselina, navážka 1,05 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.
- Konjugační činidlo pro UGlCT: 30 μl UDP-glukóza, navážka 1,006 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody.
- 30 μl TRIS-HCl pufr pH 7,4
- 10 μl enzymu (mikrosomy a mitochondrie kmene ISE, IRE, WR)
- Detergent: neionogenní detergent Slovasol pro aktivaci UGT a UGlCT, pipetovaný objem k biologické frakci byl vypočten podle koncentrace proteinu ve vzorku, poměr detergent : protein (w/w) 1 : 2

Ze známých hodnot koncentrace proteinu se vypočítalo množství detergentu, který byl přidán k frakcím MIK a MIT. 100 μ l rozmraženého vzorku frakce se inkubovalo s roztokem detergentu při 4°C po dobu 20 minut. Reakční směs byla připravena do mikrozkušavek, které byly vloženy do ledové lázně. Bylo připraveno pět paralelních vzorků a tři paralelní slepé vzorky (bez UDP-GA, resp. bez UDP-Glc). Do mikrozkušavek byl napipetován TRIS pufr, p-nitrofenol, UDP-GA (resp. UDP-Glc) a reakce byla zahájena přidáním frakce MIK nebo MIT (ze všech třech kmenů ISE, IRE, WR) s detergentem. Uzavřené mikrozkušavky byly promíchány a inkubovaly se při 37°C 20 minut. Reakce byla ukončena po 20 minutách vložением mikrozkušavek do ledové lázně a přidáním 50 μ l kyseliny trichloroctové. Poté byl deproteinizovaný roztok centrifugován 3 minuty při 5000 ot./min. 50 μ l supernatantu se přidalo k 50 μ l 1 M NaOH již připraveného v jamkách mikrotitrační destičky a po zabarvení se změřila na přístroji Tecan absorbance nezreagovaného p-nitrofenolu při 415 nm. Hodnota absorbance vzorků se odečetla od průměru hodnot absorbance slepých vzorků.

Pro výpočet aktivity enzymu bylo použito stanovení 100 % p-nitrofenolu. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 30 μ l p-nitrofenolu, 30 μ l TRIS pufru, 40 μ l redestilované vody, 50 μ l kyseliny trichloroctové. Po promíchání bylo odebráno 50 μ l této směsi a přidáno k 50 μ l 1 M NaOH již připraveného v jamkách mikrotitrační destičky. Na spektrofotometru Tecan byla změřena absorbance pěti paralelních vzorků 100 % p-nitrofenolu. Z průměru hodnot absorbance 100 % p-nitrofenolu bylo vypočítáno % nezreagovaného p-nitrofenolu ve vzorcích s biologickým materiálem.

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

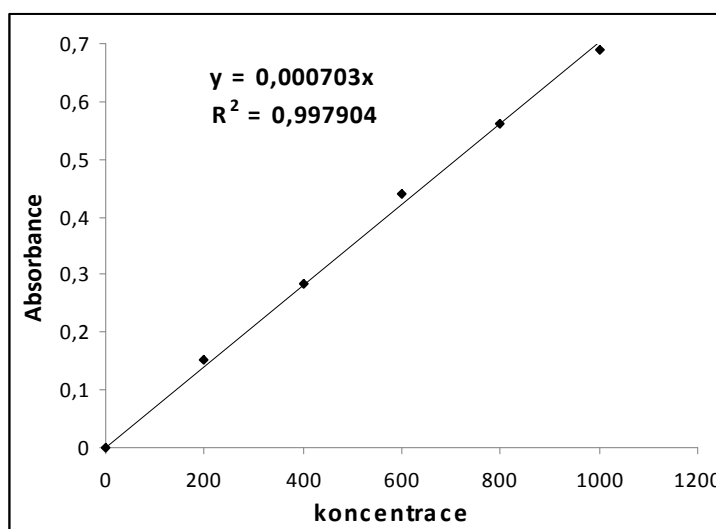
5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení koncentrace bílkovin

Koncentrace bílkoviny v jednotlivých cytosolických, mikrosomálních a mitochondriálních frakcích byla stanovena pomocí metody BCA (viz. Kapitola 4.2.3). Nejdříve byla sestavena kalibrační křivka pomocí standardního roztoku hovězího sérového albuminu.

Kalibrační křivka:

konc. µg/ml	0	200	400	600	800	1000
absorbance	0	0,1509	0,2835	0,4411	0,5624	0,6883



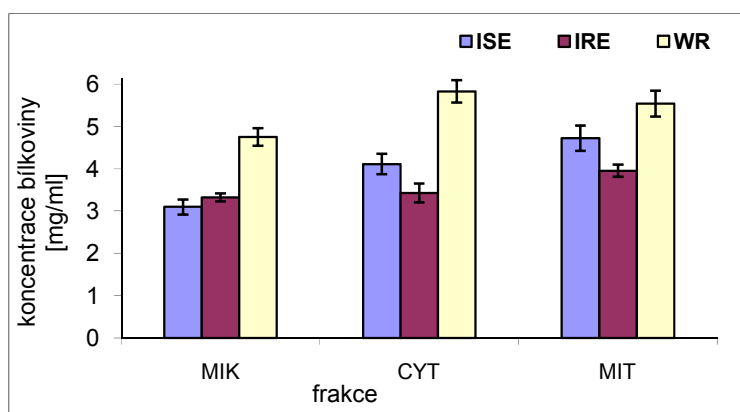
Obr. 9: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny

Od naměřených hodnot absorbance vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku. Hodnoty koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích byly vypočítány ze směrnice přímky (tab. 3).

Tab. 3: Koncentrace bílkoviny ve frakci MIK, CYT, MIT získaných z *H. contortus* (rovnice kalibrační přímky je $y = 0,000703x$)

Kmen Frakce	ISE			IRE			WR		
	MIK	CYT	MIT	MIK	CYT	MIT	MIK	CYT	MIT
Konc. bílkoviny [mg/ml]* ±	3,10	4,11	4,72	3,33	3,43	3,96	4,76	5,83	5,54
směrodatná odchylka	0,18	0,24	0,30	0,10	0,22	0,14	0,21	0,27	0,31

* průměr hodnot z osmi měření



Obr. 10: Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích

5.2 In vitro sledování metabolismu ABZ a FLU u *Haemonchus contortus*

5.2.1 Inkubace ABZ se subcelulárními frakcemi

Oxidaci ABZ na ABZSO katalyzují především jaterní mikrosomální oxidasy (Virkel et al. 2004). Proto nebyla v tomto měření použita frakce CYT. Frakce MIK a MIT z každého kmene (ISE, IRE, WR) byly inkubovány s albendazolem a 1 mM koenzymem NADPH. Koncentrace ABZ v reakční směsi byla 1 μM , 5 μM a 10 μM , přičemž od každé koncentrace proběhly tři paralelní inkubace. Současně byly připraveny slepé chemické vzorky, které neobsahovaly biologický materiál (viz Kapitola 4.2.4.1). HPLC analýzou bylo stanoveno množství metabolitů albendazolu v mikrosomálních a mitochondriálních frakcích. Pomocí známých molekulových

hmotností metabolitů a koncentrací bílkovin v daném biologickém materiálu byla vypočítaná specifická aktivita enzymu (pmol/min/mg).

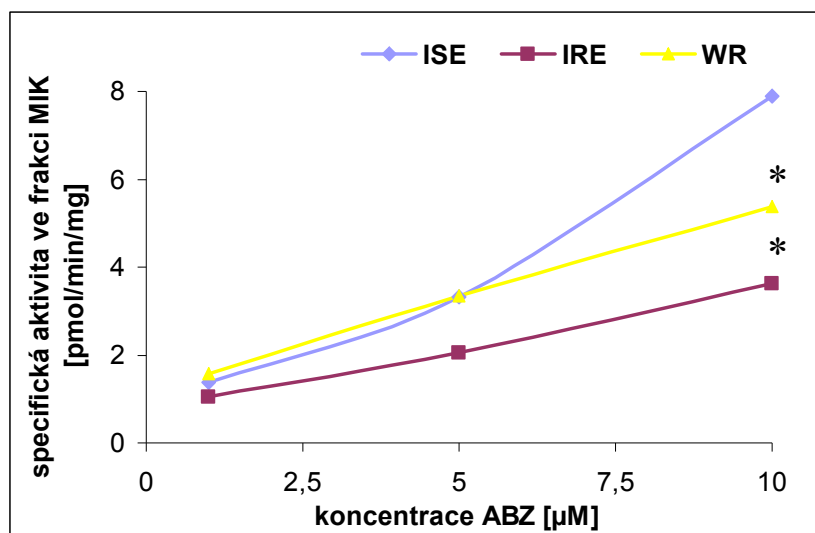
Ve frakcích byl nalezen jak albendazolsulfoxid (ABZSO), tak albendazolsulfon (ABZSO₂). Hodnoty uvedené v tabulce 4 a 5 jsou aritmetickým průměrem ze tří měření ± směrodatná odchylka.

Tab. 4: Biotransformace ABZ při inkubaci mikrosomálních frakcí vlasovky s ABZ (1 μM, 5 μM, 10 μM)

Frakce			MIK		
Kmen			ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [pmol/min/mg]	ABZSO	1 μM	1,38 ± 0,20	1,06 ± 0,11	1,57 ± 0,73
		5 μM	3,33 ± 0,87	2,06 ± 0,36	3,35 ± 0,67
		10 μM	7,90 ± 0,09	3,63 ± 1,65	5,39 ± 0,23
	ABZSO ₂	1 μM	ND	ND	ND
		5 μM	0,008 ± 0,004	ND	0,0006 ± 0,0003
		10 μM	0,014 ± 0,006	0,0005 ± 0,0006	0,005 ± 0,001

Tab. 5: Biotransformace ABZ při inkubaci mitochondriálních frakcí vlasovky s ABZ (1 μM, 5 μM, 10 μM)

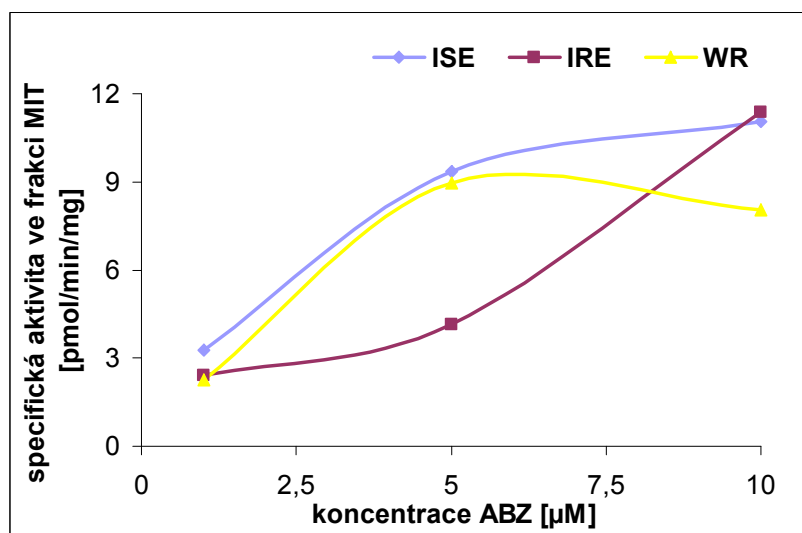
Frakce			MIT		
Kmen			ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [pmol/min/mg]	ABZSO	1 μM	3,26 ± 0,11	2,43 ± 0,46	2,27 ± 0,94
		5 μM	9,37 ± 4,81	4,14 ± 1,12	8,96 ± 1,68
		10 μM	11,07 ± 2,89	11,39 ± 1,90	8,03 ± 1,93
	ABZSO ₂	1 μM	0,016 ± 0,009	0,005 ± 0,003	0,005 ± 0,001
		5 μM	0,015 ± 0,006	0,006 ± 0,003	0,011 ± 0,004
		10 μM	0,019 ± 0,012	0,021 ± 0,014	0,009 ± 0,004



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

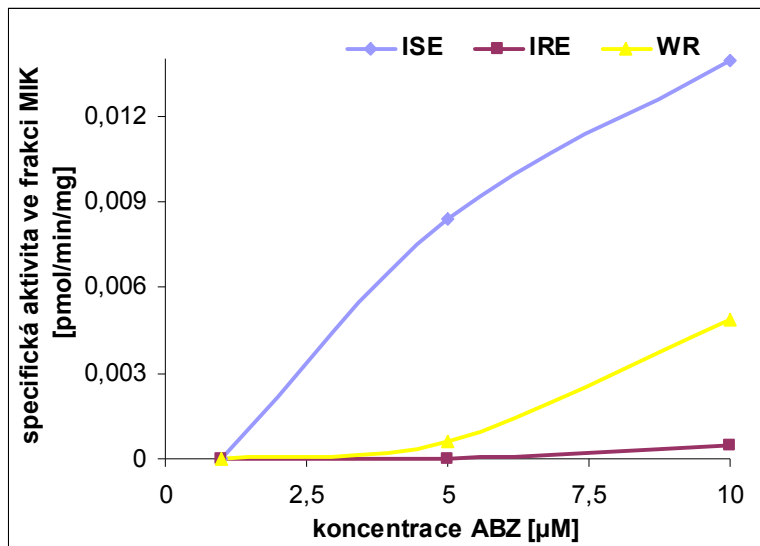
Obr. 11: Porovnání specifické aktivity oxidace ABZ na ABZSO v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích ABZ ve frakci MIK

Porovnáním aktivit oxidas ABZ na ABZSO v jednotlivých kmenech vlasovky ve frakci MIK bylo zjištěno, že největší specifická aktivita enzymů je při koncentraci ABZ 10 µM v ISE kmeni a nejnižší v IRE kmeni. Rozdíly ve specifické aktivitě jsou statisticky významné.



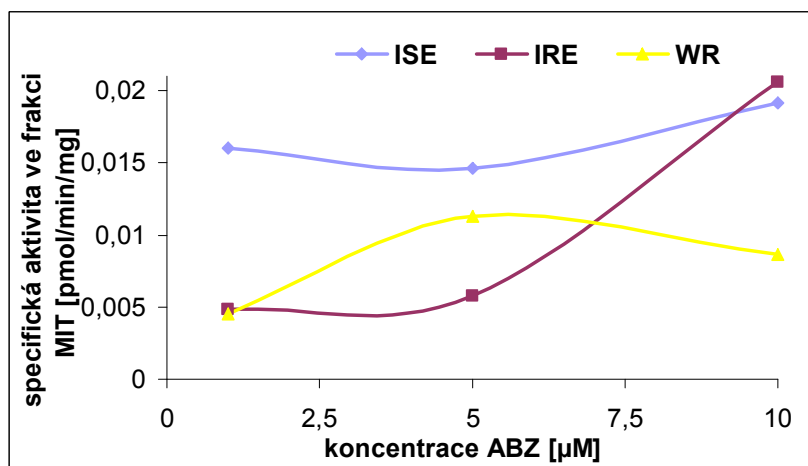
Obr. 12: Porovnání specifické aktivity oxidace ABZ na ABZSO v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích ABZ ve frakci MIT

Porovnáním aktivit oxidas ABZ na ABZSO v jednotlivých kmenech vlasovky ve frakci MIT bylo zjištěno, že při koncentraci ABZ 10 μM je nejnižší specifická aktivita enzymů v WR kmeni. Rozdíly jsou statisticky nevýznamné.



Obr. 13: Porovnání specifické aktivity oxidace ABZ na ABZSO₂ v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích ABZ ve frakci MIK

ABZSO₂ nebyl nalezen v mikrosomálních frakcích při koncentraci ABZ 1 μM v žádném kmeni *H. contortus* a při koncentraci 5 μM v IRE kmeni. Rozdíl mezi kmeny není statisticky významný.



Obr. 14: Porovnání specifické aktivity oxidace ABZ na ABZSO₂ v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích ABZ ve frakci MIT

Porovnáním aktivit oxidas ABZ na ABZSO₂ v jednotlivých kmenech vlasovky ve frakci MIT bylo zjištěno, že při koncentraci ABZ 10 µM je největší specifická aktivita enzymů v IRE kmeni a nejnižší v WR kmeni. Rozdíly jsou statisticky nevýznamné.

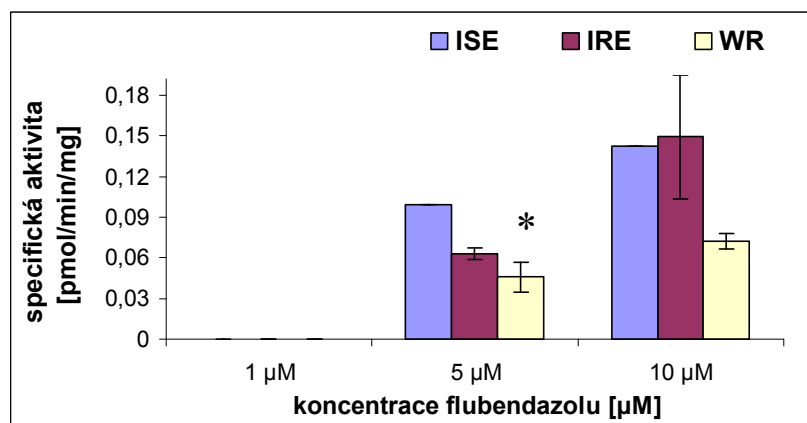
5.2.2 Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi

Podle výsledků z experimentů prováděných různými autory, dochází k redukcí FLU jen v cytosolické frakci a jen za použití koenzymu NADPH (Cvilink et al. 2008a). Proto byla vybrána pro toto měření jen frakce CYT z každého kmene (ISE, IRE, WR). Frakce byly inkubovány s flubendazolem a 1 mM koenzymem NADPH. Koncentrace FLU v reakční směsi byla 1 µM, 5 µM a 10 µM, přičemž od každé koncentrace proběhly tři paralelní inkubace. Současně byly připraveny slepé chemické vzorky, které neobsahovaly biologický materiál a slepé biologické vzorky, které neobsahovaly substrát (viz Kapitola 4.2.4.2). HPLC analýzou bylo stanoveno množství metabolitů flubendazolu v cytosolických frakcích. Pomocí známých molekulových hmotností metabolitů a koncentrací bílkovin v daném biologickém materiálu byla vypočítaná specifická aktivita enzymu (pmol/min/mg).

Ve frakcích byl nalezen jen redukovaný flubendazol (FLU-R). Ve slepých vzorcích nebyla zaznamenána žádná aktivita. Hodnoty uvedené v tabulce 6 jsou aritmetickým průměrem výsledků měření ± směrodatná odchylka.

Tab. 6: Biotransformace FLU při inkubaci cytosolu s FLU (1 µM, 5 µM, 10 µM)

Frakce		CYT		
Kmen		ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [pmol/min/mg]	1 µM	ND	ND	ND
	5 µM	0,099 ± 0	0,063 ± 0,004	0,046 ± 0,011
	10 µM	0,14	0,15 ± 0,046	0,073 ± 0,006



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 15: Porovnání specifické aktivity cytosolických reduktas v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích flubendazolu

Při koncentraci 1 µM nebyla aktivita reduktas detekována v žádném kmeni *H. contortus*. Při koncentraci 5 µM byla největší specifická aktivita reduktas flubendazolu v ISE kmeni a nejmenší v WR kmeni. Statisticky významný rozdíl v aktivitě cytosolických reduktas vyšel jen u WR kmene při koncentraci FLU 5 µM. Při koncentraci 10 µM byla nejmenší specifická aktivita reduktas v WR kmeni. Rozdíly mezi jednotlivými kmeny jsou statisticky nevýznamné.

5.3 Ex vivo inkubace *Haemonchus contortus* s FLU

Tři kmeny (ISE, IRE, WR) *Haemonchus contortus* izolované ze slezu ovce byly inkubovány s FLU o koncentraci 1 µM a 10 µM v CO₂ inkubátoru po dobu 24 hod, přičemž od každé koncentrace proběhly 2 paralelní inkubace (u kmene IRE 4 paralelní inkubace). Současně byly připraveny slepé biologické vzorky a slepé chemické vzorky. Po skončení inkubace byla provedena homogenizace *H. contortus* za snížené teploty a extrakce parentní látky a metabolitů z média i homogenátu (viz Kapitola 4.2.5.1).

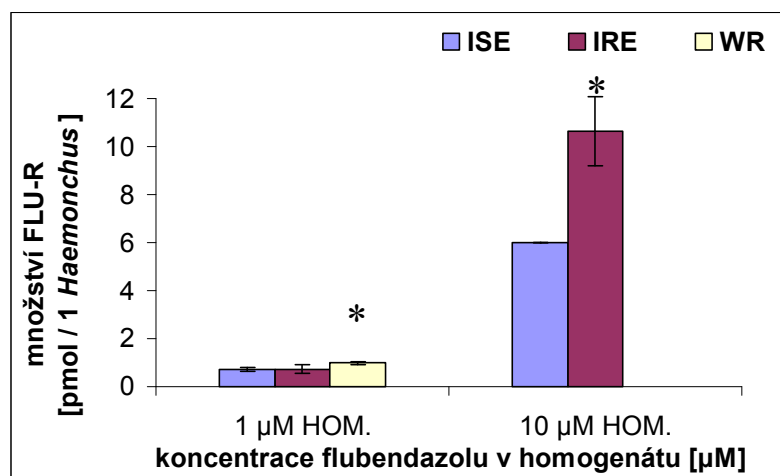
Ve vzorcích byl nalezen FLU a redukovaný flubendazol (FLU-R), aritmetické průměry výsledků měření ± směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce 7 a 8. Ve slepých chemických i biologických vzorcích nebylo zaznamenáno žádné množství FLU-R.

Tab. 7: Množství FLU-R ve vzorcích homogenátu

	Kmen	Množství FLU-R [pmol/1 Haemonchus]	
		1 μM	10 μM
Homogenát	ISE	0,72 \pm 0,08	6 \pm 0
	IRE	0,73 \pm 0,19	10,63 \pm 1,44
	WR	0,98 \pm 0,06	ND

Tab. 8: Množství FLU-R ve vzorcích média

	Kmen	Množství FLU-R [nmol/l]	
		1 μM	10 μM
Médium	ISE	24,83 \pm 1,61	227,78 \pm 23,57
	IRE	16,68 \pm 5,58	258,33 \pm 35,57
	WR	18,18 \pm 1,71	177,78 \pm 15,7

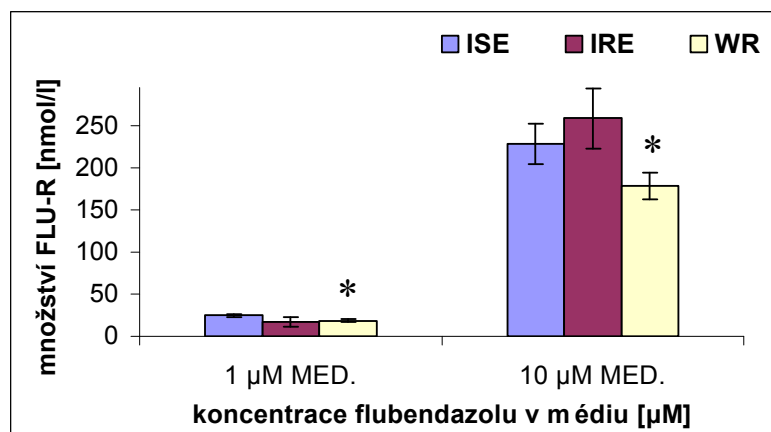


* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 16: Porovnání množství FLU-R v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích FLU v homogenátu

Statisticky významný rozdíl v množství vzniklého FLU-R v HOM vyšel u WR kmene při koncentraci FLU 1 μM a u IRE kmene při koncentraci FLU 10 μM . V homogenátu s koncentrací FLU 10 μM kmene WR nebylo nalezeno žádné množství FLU-R, pravděpodobně v důsledku chybné extrakce.

Porovnáním množství FLU-R v homogenátu bylo zjištěno, že větší množství FLU-R se nachází v homogenátu s výchozí koncentrací FLU 10 μM .



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 17: Porovnání množství FLU-R v jednotlivých kmenech *H. contortus* při různých koncentracích FLU v médiu

Porovnáním množství FLU-R v médiu bylo zjištěno, že větší množství FLU-R se nachází v médiu s výchozí koncentrací FLU 10 μM ve všech třech kmenech *Haemonchus contortus*. Rozdíl mezi kmeny je statisticky významný.

5.4 Stanovení aktivity redukčních enzymů

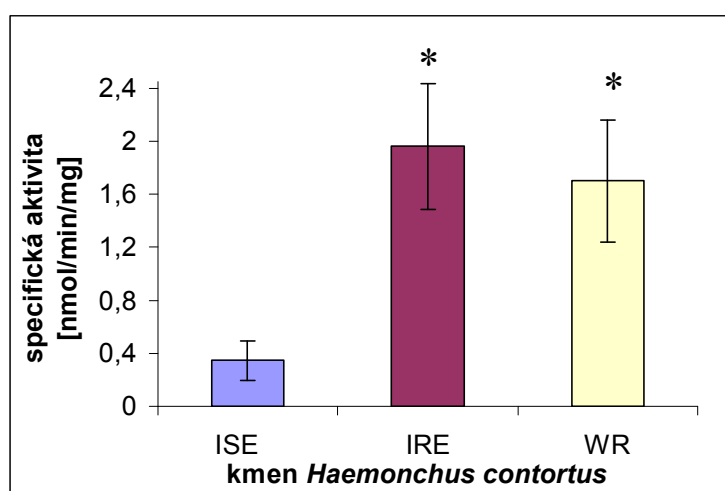
Pro stanovení aktivit redukčních enzymů metyraponu, DL-glyceraldehydu, 4-pyridinkarboxaldehydu a daunorubicinu při pH 6,0 a 8,5 byla použita spektrofotometrická metoda měření absorbance, která proběhla vždy ve třech paralelních měřeních. Ke stanovení byly použity frakce MIK, CYT, MIT všech tří kmenů ISE, IRE, WR (viz Kapitola 4.2.6). Výsledná aktivita byla vztažena na mg bílkoviny a vyjádřena jako specifická aktivita enzymu v $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

5.4.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu

Aktivita reduktas metyraponu (1 mM) byla měřena spektrofotometricky při pH 6,0. K měření byly použity frakce CYT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 9: Specifická aktivita reduktas metyraponu v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	CYT		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	0,34 ± 0,15	1,96 ± 0,47	1,70 ± 0,46



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 18: Porovnání specifické aktivity redukce metyraponu v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

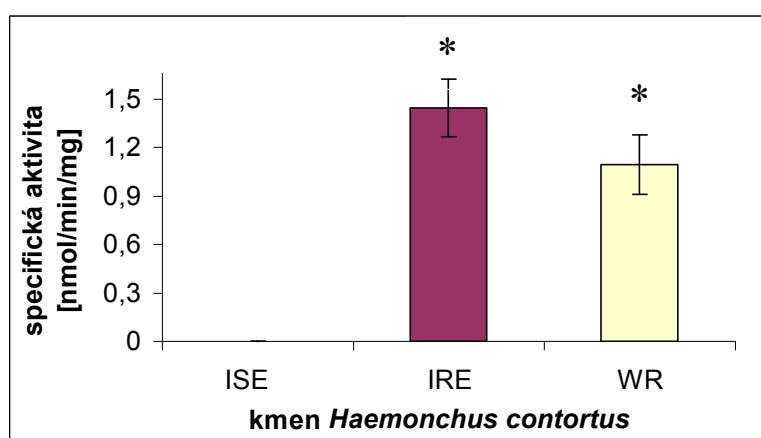
Z porovnání aktivit reduktas metyraponu v jednotlivých kmenech vlasovky vyplývá, že největší specifickou aktivitu enzymů vykazuje IRE kmen a nejnižší ISE kmen. Rozdíly mezi kmeny jsou statisticky významné.

5.4.2 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 6,0

Aktivita reduktas daunorubicinu (0,01 mM) byla měřena spektrofotometricky v prostředí pH 6,0. Ke stanovení aktivity enzymu byly použity frakce CYT všech tří kmenů *H. contortus*. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10: Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 6,0 v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	CYT		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	ND	1,45 ± 0,18	1,09 ± 0,18



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 19: Porovnání specifické aktivity redukce daunorubicinu při pH 6,0 v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

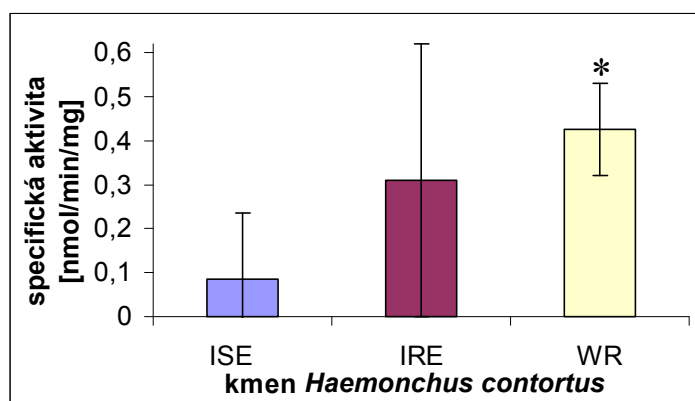
V ISE kmeni nedošlo k poklesu absorbance, aktivita enzymu byla tedy v tomto kmeni nulová. Z porovnání aktivit reduktas daunorubicinu při pH 6,0 v jednotlivých kmenech *H. contortus* bylo zjištěno, že největší specifickou aktivitu enzymů má IRE kmen. Rozdíl mezi kmeny je statisticky významný.

5.4.3 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5

Aktivita reduktas daunorubicinu (0,01 mM) byla měřena spektrofotometricky v prostředí pH 8,5. K měření byly použity frakce CYT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 11: Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 8,5 v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	CYT		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	0,09 ± 0,15	0,31 ± 0,31	0,43 ± 0,11



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 20: Porovnání specifické aktivity redukce daunorubicinu při pH 8,5 v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

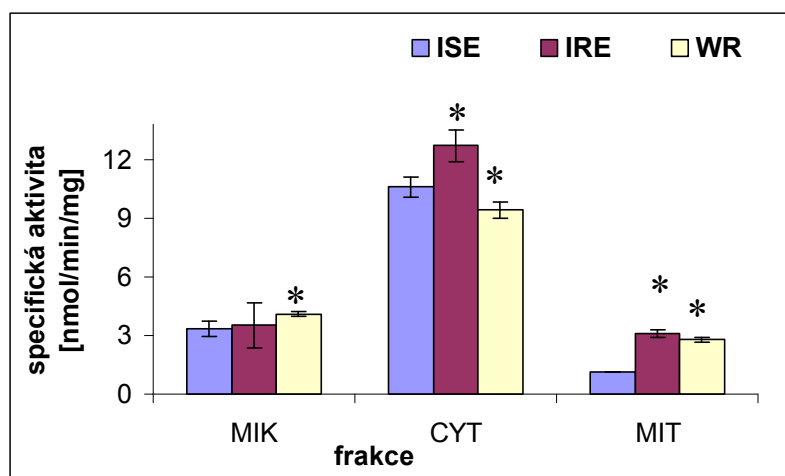
Porovnáním aktivit reduktas daunorubicinu v jednotlivých kmenech *H. contortus* bylo zjištěno, že největší specifickou aktivitu enzymů má WR kmen a nejnižší ISE kmen. Rozdíl mezi těmito kmeny je statisticky významný.

5.4.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

Aktivita reduktas DL-glyceraldehydu (10 mM) byla měřena v prostředí pH 6,0 na spektrofotometru. K měření byly použity frakce MIK, CYT, MIT všech tří kmenů *H. contortus*. Hodnoty uvedené v tabulce 12 jsou aritmetickým průměrem výsledků měření ± směrodatná odchylka.

Tab. 12: Specifická aktivita reduktas DL-glyceraldehydu v jednotlivých subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen IRE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen WR	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
MIK	3,32 ± 0,40	MIK	3,51 ± 1,15	MIK	4,10 ± 0,13
CYT	10,60 ± 0,52	CYT	12,70 ± 0,82	CYT	9,42 ± 0,42
MIT	1,13 ± 0	MIT	3,09 ± 0,19	MIT	2,78 ± 0,14



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 21: Porovnání specifické aktivity redukce DL-glyceraldehydu ve frakcích MIK, CYT, MIT ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

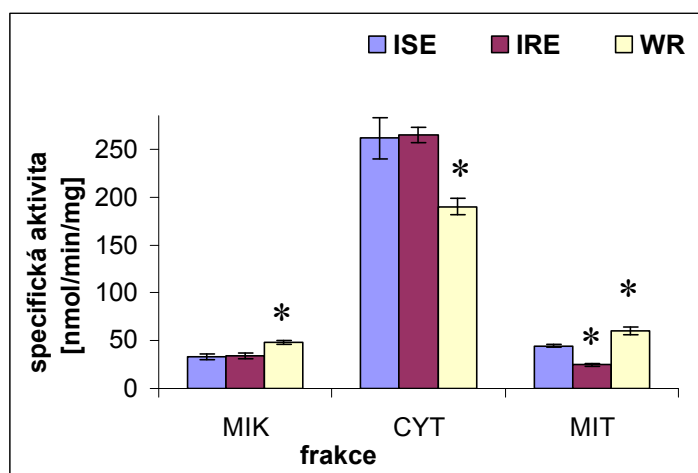
Z porovnání aktivit reduktas v jednotlivých kmenech vlasovky vyplývá, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů WR kmen. V cytosolické frakci vykazuje největší aktivitu reduktas IRE kmen a nejnižší WR kmen. Ve frakci MIT má největší aktivitu IRE kmen. Rozdíly mezi kmeny jsou statisticky významné.

5.4.5 Stanovení aktivity reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu

Aktivita reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu (1 mM) byla měřena v prostředí pH 6,0 na spektrofotometru. Ke stanovení aktivity enzymu byly použity frakce MIK, CYT, MIT všech tří kmenů *H. contortus*. Hodnoty uvedené v tabulce 13 jsou aritmetickým průměrem výsledků měření ± směrodatná odchylka.

Tab. 13: Specifická aktivita reduktas 4-pyridinkarboxaldehydu v jednotlivých subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen IRE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen WR	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
MIK	33,20 ± 2,62	MIK	34,08 ± 3,33	MIK	48,06 ± 2,24
CYT	261,65 ± 21,84	CYT	264,80 ± 8,38	CYT	190,10 ± 8,54
MIT	44,64 ± 1,30	MIT	24,63 ± 1,55	MIT	59,79 ± 4,00



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 22: Porovnání specifické aktivity redukce 4-pyridinkarboxaldehydu ve frakcích MIK, CYT, MIT ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

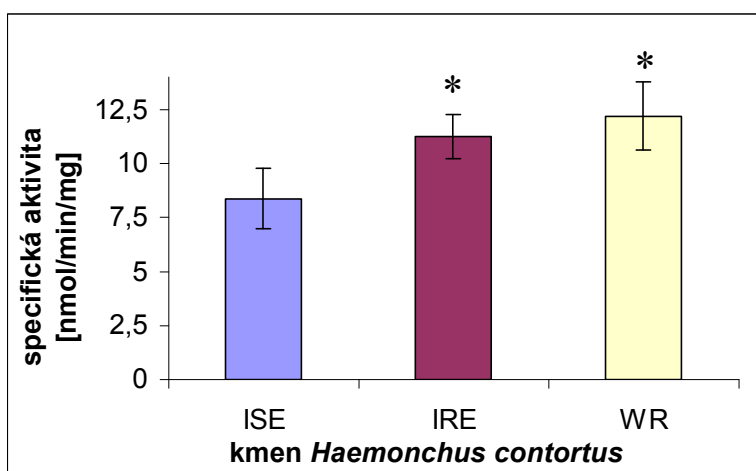
Porovnáním aktivit reduktas v jednotlivých kmenech bylo zjištěno, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů WR kmen. V cytosolické frakci vykazuje nejnižší specifickou aktivitu WR kmen. Ve frakci MIT má největší aktivitu WR kmen a nejnižší IRE kmen. Rozdíly jsou statisticky významné.

5.4.6 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu

Stanovení aktivity acenaftenoldehydrogenasy spočívá v měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP^+ na NADPH. Měření bylo provedeno na spektrofotometru Perkin v prostředí pH 8,9 (viz Kapitola 4.2.6.6). Ke stanovení aktivity enzymu byly použity frakce CYT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 14: Specifická aktivita acenaftenoldehydrogenasy v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	CYT		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	8,37 ± 1,41	11,24 ± 1,03	12,20 ± 1,56



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 23: Porovnání specifické aktivity acenaftenoldehydrogenasy v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

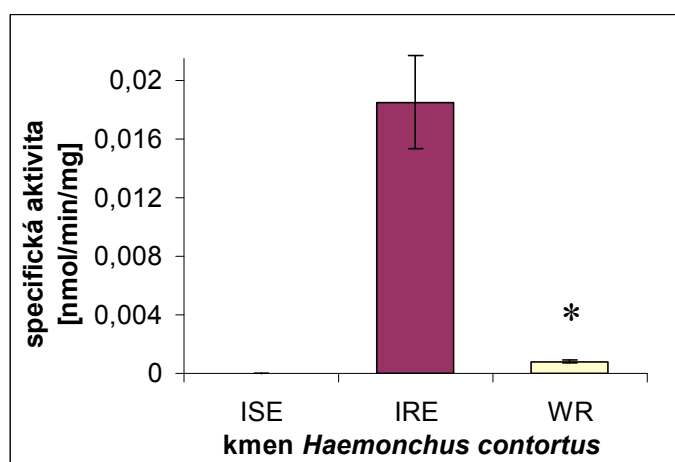
Porovnáním aktivit acenaftenoldehydrogenas v jednotlivých kmenech *H. contortus* bylo zjištěno, že největší specifickou aktivitu enzymů má WR kmen a nejnižší ISE kmen. Rozdíly mezi kmeny jsou statisticky významné.

5.4.7 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu

Metoda je založena na inkubaci frakce CYT všech tří kmenů ISE, IRE a WR s oracinem. Následně byla provedena extrakce a HPLC stanovení metabolitu dihydrooracinu (DHO) (viz. Kapitola 4.2.6.7). Ve vzorcích byl nalezen jak (+)-DHO, tak (-)-DHO.

Tab. 15: Specifická aktivita reduktas oracinu v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

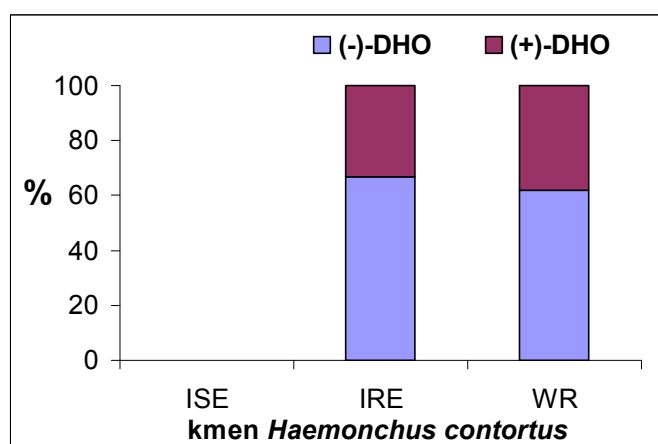
	CYT	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	(+)-DHO [%]	(-)-DHO [%]
Kmen	ISE	ND	ND	ND
	IRE	0,019 ± 0,003	33,10	66,90
	WR	0,0008 ± 0,0001	37,97	62,03



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 24: Porovnání specifické aktivity reduktas oracinu v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

V ISE kmeni nebyla nalezena žádná aktivita reduktas oracinu. Oracin byl nejvíce redukován v IRE kmeni. Rozdíly mezi kmeny jsou statisticky významné.



Obr. 25: Procentuální zastoupení enantiomerů dihydrooracinu v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

Z měření vyplývá, že oracin nebyl redukován v ISE kmeni *H. contortus*. IRE kmen přednostně vytváří (-)-DHO (66,9 %), méně (+)-DHO (33,1 %). WR kmen taktéž tvoří přednostně (-)-DHO (62,03 %), méně (+)-DHO (37,97 %).

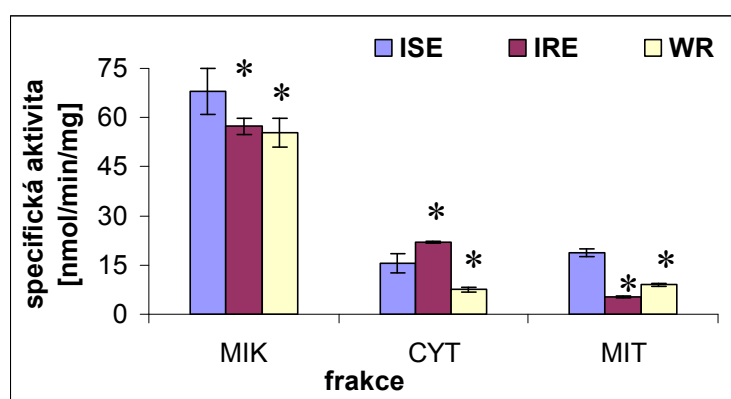
5.5 Stanovení aktivity oxidačních enzymů

5.5.1 Stanovení aktivity peroxidasy pomocí o-fenylendiaminu dihydrochloridu (OPD)

Aktivita peroxidasy byla stanovena oxidací o-fenylendiaminu. Vzniklý 2,2'-diaminoazobenzen byl stanoven spektrofotometricky (viz Kapitola 4.2.7.1). Ke stanovení aktivity byly použity všechny frakce MIK, CYT a MIT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 16: Specifická aktivita peroxidasy v jednotlivých subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen IRE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen WR	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
MIK	67,97 ± 7,05	MIK	57,29 ± 2,48	MIK	55,43 ± 4,48
CYT	15,49 ± 2,87	CYT	22,02 ± 0,37	CYT	7,56 ± 0,74
MIT	18,65 ± 1,16	MIT	5,18 ± 0,26	MIT	8,97 ± 0,36



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 26: Porovnání specifické aktivity peroxidasy ve frakcích MIK, CYT, MIT ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

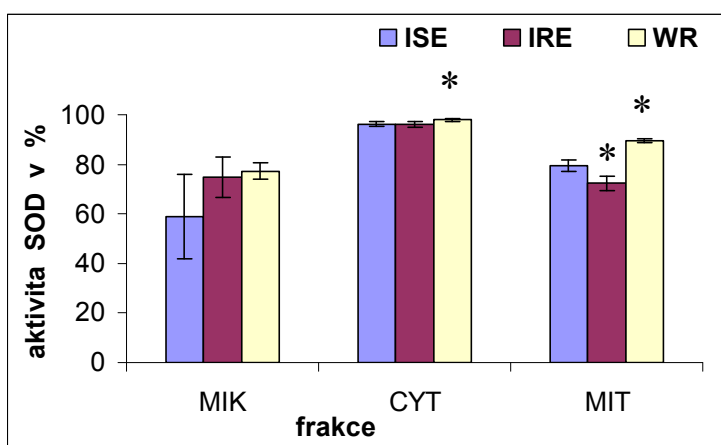
Porovnáním aktivit peroxidasy v jednotlivých kmenech bylo zjištěno, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů ISE kmen a nejnižší WR kmen. V cytosolické frakci vykazuje největší specifickou aktivitu enzymů IRE kmen a nejnižší WR kmen. Ve frakci MIT má největší aktivitu enzymů ISE kmen a nejnižší IRE kmen. Všechny rozdíly jsou statisticky významné.

5.5.2 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)

Metoda je založena na přeměně WST-1 (water-soluble tetrazolium salt) na WST-1 formazan, který je zbarvený v důsledku redukce superoxidovým aniontem (viz Kapitola 4.2.7.2). Hodnoty uvedené v tabulce 17 jsou aritmetickým průměrem výsledků měření \pm směrodatná odchylka. Získané výsledky představují aktivitu SOD neboli její inhibiční podíl vyjádřený v %. K měření byly použity všechny frakce MIK, CYT a MIT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 17: Aktivita superoxiddismutasy v jednotlivých subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Inhibiční podíl %	Kmen IRE	Inhibiční podíl %	Kmen WR	Inhibiční podíl %
MIK	58,89 \pm 16,98	MIK	74,74 \pm 8,16	MIK	77,32 \pm 3,12
CYT	96,29 \pm 0,94	CYT	96,11 \pm 1,05	CYT	97,87 \pm 0,55
MIT	79,37 \pm 2,25	MIT	72,40 \pm 2,87	MIT	89,63 \pm 0,78



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 27: Porovnání aktivity superoxiddismutasy ve frakcích MIK, CYT, MIT ve třech kmenech *H. contortus*

Porovnáním aktivit superoxiddismutas v jednotlivých kmenech bylo zjištěno, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů WR kmen a nejnižší ISE kmen. Rozdíly nejsou statisticky významné. V cytosolické frakci vykazuje největší specifickou aktivitu WR kmen. Ve frakci MIT má největší aktivitu WR kmen a nejnižší IRE kmen. Rozdíly v aktivitě SOD v cytosolických a mitochondriálních frakcích jsou statisticky významné.

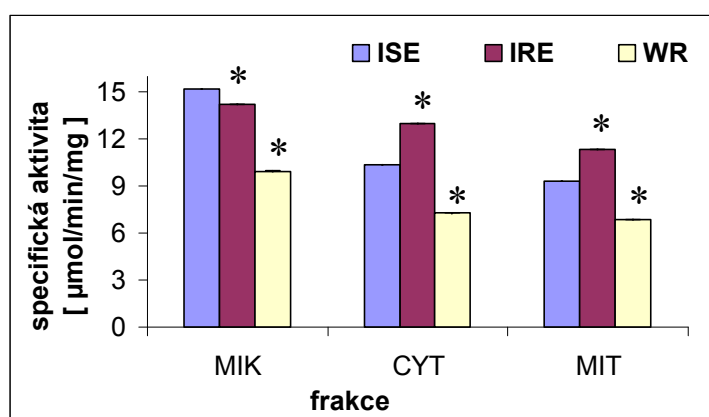
5.6 Stanovení aktivity katalasy

Stanovení aktivity katalasy je založeno na použití fluorescenčního substrátu odvozeného od europium-tetracyklinu (viz Kapitola 4.2.8).

Aktivita katalasy byla vypočtena podle standardu katalasy. Hodnota aktivity byla vztažena na 1 mg bílkoviny, což je specifická aktivita enzymu a [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$].

Tab. 18: Specifická aktivita katalasy v jednotlivých subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]	Kmen IRE	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]	Kmen WR	Specifická aktivita [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
MIK	15,18 \pm 0,01	MIK	14,20 \pm 0,01	MIK	9,96 \pm 0,01
CYT	10,35 \pm 0,01	CYT	13,01 \pm 0,005	CYT	7,27 \pm 0,01
MIT	9,30 \pm 0,01	MIT	11,34 \pm 0,003	MIT	6,86 \pm 0,01



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 28: Porovnání specifické aktivity katalasy ve frakcích MIK, CYT, MIT ve třech kmenech *H. contortus*

Porovnáním aktivit katalas v jednotlivých kmenech bylo zjištěno, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů ISE kmen a nejnižší WR kmen. V cytosolické frakci vykazuje největší specifickou aktivitu IRE kmen a nejnižší WR kmen. Ve frakci MIT má největší aktivitu katalasy IRE kmen a nejnižší WR kmen. Všechny nalezené rozdíly jsou statisticky významné.

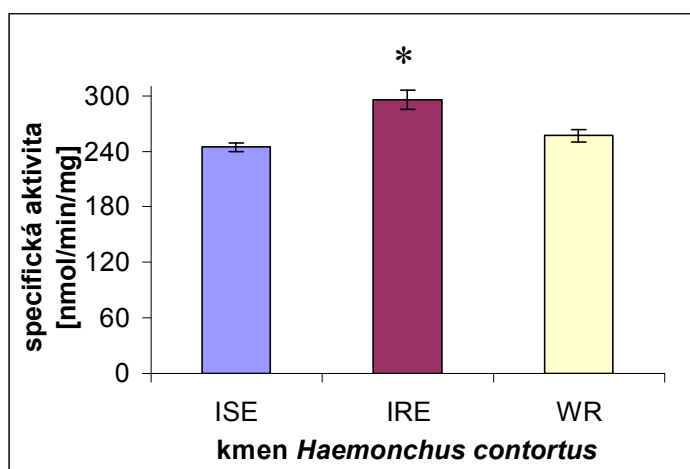
5.7 Stanovení aktivity konjugačních enzymů

5.7.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Princip metody je založen na spektrofotometrickém stanovení tvorby S-2,4-dinitrophenylglutathionu (viz Kapitola 4.2.9.1). Ke stanovení aktivity enzymu byly použity frakce CYT všech tří kmenů *H. contortus*.

Tab. 19: Specifická aktivita glutathion-S-transferasy (GST) v cytosolických frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	CYT		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	244,31 ± 4,45	295,83 ± 10,33	256,65 ± 6,34



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 29: Porovnání specifické aktivity GST v cytosolických frakcích ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

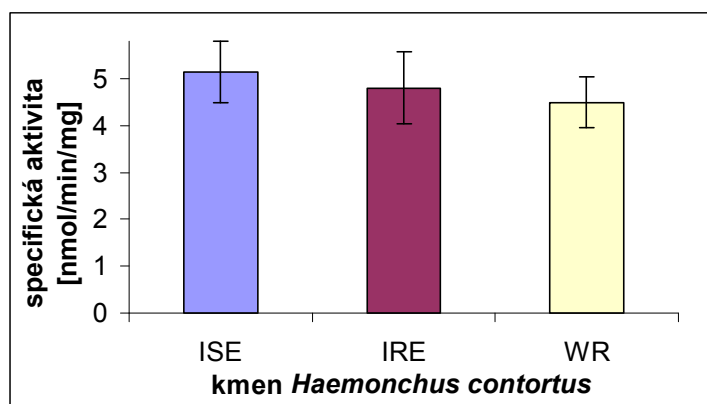
Porovnáním aktivit GST v jednotlivých kmenech vlasovky bylo zjištěno, že největší specifickou aktivitu enzymů má IRE kmen. Rozdíl v aktivitě vůči ISE kmeni je statisticky významný.

5.7.2 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glucosyltransferasy (UGlCT)

Princip metody je založen na spektrofotometrickém stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid za enzymové katalýzy UGT nebo na p-nitrofenolglukosid za enzymové katalýzy UGlCT (viz. Kapitola 4.2.9.2). Ke stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy byly použity frakce MIK všech tří kmenů *H. contortus* a pro stanovení UDP-glucosyltransferasy byly použity frakce MIK a MIT všech tří kmenů *H. contortus*. Výsledná aktivita byla vztažena na mg bílkoviny.

Tab. 20: Specifická aktivita UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) v mikrosomálních frakcích kmene ISE, IRE, WR

Frakce	MIK		
Kmen	ISE	IRE	WR
Specifická aktivita [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka	5,14 ± 0,66	4,80 ± 0,77	4,49 ± 0,55

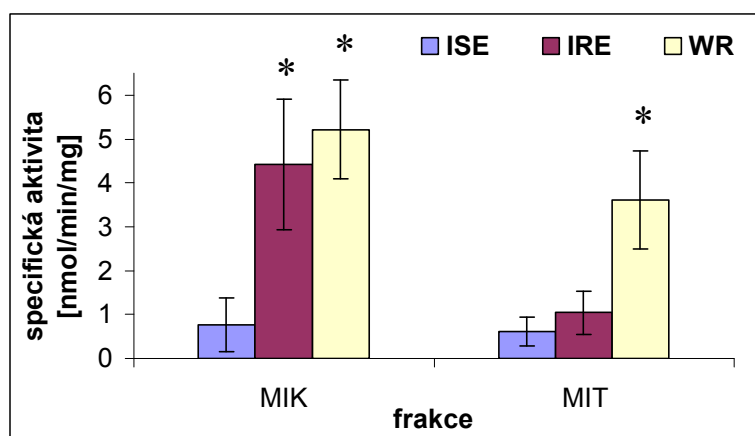


Obr. 30: Porovnání specifické aktivity UGT ve frakcích MIK ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

Z porovnání aktivit UGT v jednotlivých kmenech vlasovky vyplývá, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů ISE kmen a nejnižší WR kmen. Rozdíly ale nejsou statisticky významné.

Tab. 21: Specifická aktivita UDP-glycosyltransferasy (UGlT) ve frakcích MIK a MIT kmene ISE, IRE, WR

Kmen ISE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen IRE	Specifická aktivita [nmol/min/mg]	Kmen WR	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
MIK	0,77 ± 0,61	MIK	4,42 ± 1,49	MIK	5,21 ± 1,13
MIT	0,62 ± 0,32	MIT	1,04 ± 0,49	MIT	3,60 ± 1,11



* signifikantní rozdíl vůči ISE kmeni ($p \leq 0,05$)

Obr. 31: Porovnání specifické aktivity UGlT ve frakcích MIK a MIT ve třech kmenech *Haemonchus contortus*

Porovnáním specifické aktivity UGlT v mikrosomálních a mitochondriálních frakcích bylo zjištěno, že největší specifickou aktivitu enzymu vykazuje White-River kmen a nejnižší ISE kmen. Rozdíly mezi kmeny jsou statisticky významné.

6. DISKUSE

Helmintózy jsou nemoci způsobené parazitujícími červy a ohrožují zdravotní stav hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Chovatelům hospodářských zvířat působí tyto nemoci obrovské finanční ztráty, které jsou každoročně odhadovány v řádech stovek miliónů dolarů (Coyne et al. 2001).

V rámci farmakoterapie a farmakoprolaxe jsou využívána širokospektrá anthelmintika, která pomáhají snížit dopad řady parazitických onemocnění. Hojně používání anthelmintik však vedlo k rozvoji rezistence na anthelmintika, která je dnes celosvětově rozšířená (Coyne et al. 2001).

Mechanismů navození rezistence u červů je řada typů. U některých kmenů *Haemonchus contortus* rezistentních na některá benzimidazolová anthelmintika byla prokázána bodová mutace v genu pro β -tubulin (Köhler 2001). Mutace chrání mikrotubuly parazita před účinkem benzimidazolů. Další obranné strategie helmintů představují snížená absorpce léčiva, zrychlený odtok léčiva z buňky a zvýšená inaktivace léčiva. Výsledkem je snížená koncentrace i účinek léčiv v buňkách. Tyto mechanismy rezistence jsou založené na zvýšené aktivitě membránových transportérů nebo biotransformačních enzymů. Biotransformační enzymy fungují ve všech organismech jako účinná obrana proti možným negativním vlivům xenobiotik. Schopnost biotransformačních enzymů inaktivovat anthelmintika pomocí biotransformace představuje výhodnou obrannou strategii u parazitů (Cvilinear et al. 2008a).

Cílem této práce bylo porovnání metabolismu anthelmintik a aktivit biotransformačních enzymů u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Pro testování byly vybrány tři kmeny *H. contortus*: citlivý na anthelmintika – ISE kmen, rezistentní na benzimidazolová anthelmintika – IRE kmen, rezistentní na všechna anthelmintika – WR kmen.

Byl sledován metabolismus anthelmintik albendazolu (ABZ) a flubendazolu (FLU) pomocí *in vitro* inkubace subcelulárních frakcí tří kmenů vlasovky slezové s anthelmintiky. Zároveň byl sledován metabolismus FLU pomocí *ex vivo* kultivace tří kmenů vlasovky v CO₂ inkubátoru v médiu s FLU. Dále byly zkoumány a porovnávány aktivity biotransformačních enzymů: aktivity redukčních, oxidačních a konjugačních enzymů v subcelulárních frakcích jednotlivých kmenů *H. contortus*.

K experimentům byly použity subcelulární frakce CYT, MIK a MIT vlasovek. Frakce CYT při izolaci subcelulárních frakcí homogenátu tkání savců obsahuje především cytosol, frakce MIK převážně mikrosomy a frakce MIT především mitochondrie. Hodnoty aktivity byly vztaženy na mg proteinu, čímž byla získána specifická aktivita. Z tohoto důvodu bylo nutné stanovit koncentrace bílkoviny ve frakcích MIK, CYT a MIT všech tří kmenů vlasovky metodou BCA.

Benzimidazolová anthelmintika se běžně užívají k léčbě parazitózy vyvolané druhem *Haemonchus contortus*. Cílem experimentu bylo porovnat *in vitro* metabolismus anthelmintik ABZ a FLU v jednotlivých kmenech vlasovky. Oxidaci ABZ na ABZSO katalyzují především jaterní mikrosomální oxidasy, flavinmonooxygenasa a cytochrom P4503A jsou zodpovědné za konverzi ABZ na ABZSO a přeměna ABZSO na ABZSO₂ je ovlivněna pouze cytochromem P4501A (Virkel et al. 2004), proto nebyla při zkoumání metabolismu ABZ použita frakce CYT. Pro zjištění metabolismu ABZ v mitochondriích a mikrosomech byly použity frakce MIT a MIK. Specifická aktivita mikrosomálních a mitochondriálních oxidas v jednotlivých kmenech vlasovky byla měřena při různých koncentracích ABZ - 1 μM, 5 μM a 10 μM. Docházelo k tvorbě jak ABZSO, tak ABZSO₂. Bylo zjištěno, že ve frakci MIK je při koncentraci ABZ 10 μM největší specifická aktivita oxidas ABZ na ABZSO v ISE kmeni a nejnižší v IRE kmeni. Při koncentraci ABZ 1 μM nebyl ve frakci MIK nalezen ABZSO₂ v žádném kmeni *H. contortus* a při koncentraci 5 μM nebyl detekován v IRE kmeni. Při koncentraci ABZ 10 μM má největší specifickou aktivitu oxidas ABZ na ABZSO₂ ISE kmen a nejnižší IRE kmen, stejně jako při oxidaci ABZ na ABZSO. Ve frakci MIT má při koncentraci ABZ 10 μM nejnižší specifickou aktivitu oxidas ABZ na ABZSO i na ABZSO₂ WR kmen. Porovnáním aktivit oxidas ABZ v jednotlivých kmenech ve frakcích MIK a MIT jsme zjistili, že rezistentní kmeny vlasovky katalyzují sulfoxidaci ABZ s nižší intenzitou než citlivý ISE kmen.

Pro sledování biotransformace FLU byla vybrána jen frakce CYT z každého kmene vlasovky, protože podle výsledků z experimentů prováděných různými autory dochází k redukci FLU jen v cytosolických frakcích a jen za použití koenzymu NADPH (např. Cvilink et al. 2008a). Specifická aktivita cytosolických reduktas v jednotlivých kmenech *H. contortus* byla měřena při různých koncentracích FLU - 1 μM, 5 μM a 10 μM. Ve frakcích byl nalezen jediný metabolit - redukovaný flubendazol (FLU-R). Redukce představuje hlavní cestu biotransformace FLU u *H. contortus* (Cvilink et al. 2008a). Tímto měřením bylo zjištěno, že při koncentraci 1 μM nedochází k redukci FLU v žádném kmeni *H. contortus*. Při koncentraci FLU 5 μM a 10 μM byla nejmenší specifická aktivita reduktas v WR kmeni. Porovnáním cytosolické redukce FLU

u jednotlivých kmenů bylo zjištěno, že nejmenší aktivitu reduktas má WR kmen a aktivita u ISE a IRE kmene je srovnatelná.

Výsledky tedy ukázaly, že všechny tři kmeny *H. contortus* metabolizují ABZ i FLU pomocí biotransformačních enzymů I. fáze. ABZ je metabolizován sulfoxidací a FLU redukcí karbonylové skupiny (Cvilink et al. 2008a).

Zároveň byla provedena *ex vivo* inkubace tří kmenů *H. contortus* s FLU o koncentraci 1 μM a 10 μM v CO_2 inkubátoru po dobu 24 hod. Ve vzorcích homogenátu vlasovek i v kultivačním médiu byl nalezen FLU a FLU-R. V homogenátu je při koncentraci FLU 1 μM množství FLU-R srovnatelné u všech třech kmenů vlasovky a při koncentraci FLU 10 μM je největší množství FLU-R v IRE kmeni. Tento výsledek však není přesný, protože v homogenátu s koncentrací FLU 10 μM kmene WR nebylo nalezeno žádné množství FLU-R, pravděpodobně v důsledku chybné extrakce. Homogenát byl získán z 20 kusů *H. contortus*, proto bylo množství FLU-R vztaženo na 1 vlasovku. V médiu byly zjištěny stejné výsledky jako v homogenátu. Při koncentraci FLU 1 μM je množství FLU-R srovnatelné u všech třech kmenů a při koncentraci FLU 10 μM je největší množství FLU-R v IRE kmeni.

Cílem diplomové práce bylo také stanovit biotransformační aktivitu ve třech kmenech *H. contortus* vůči modelovým substrátům, které se běžně užívají při biotransformačních studiích u laboratorních a hospodářských zvířat (Bártíková et al 2009). Aktivity enzymů redukujících karbonylovou skupinu byly zkoumány pomocí různých substrátů - metyrapon, daunorubicin, DL-glyceraldehyd, 4-pyridinkarboxaldehyd a oracin. Ke stanovení byly použity frakce MIK, CYT, MIT všech tří kmenů ISE, IRE, WR. Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny v subcelulárních frakcích nalezené v jednotlivých kmenech jsou pro názornost uvedené v přehledných tabulkách 22, 23, 24.

Nejvýznamnější z hlediska redukční aktivity jsou rezistentní kmeny IRE a WR, ve kterých byly nalezeny redukční reakce u všech substrátů. Největší specifickou aktivitu má IRE kmen při redukci metyraponu, daunorubicinu (pH 6,0), DL-glyceraldehydu ve frakci CYT a MIT, 4-pyridinkarboxaldehydu ve frakci CYT. WR kmen vykazuje největší specifickou aktivitu při redukci daunorubicinu (pH 8,5), DL-glyceraldehydu ve frakci MIK, 4-pyridinkarboxaldehydu ve frakci MIK a MIT. V ISE kmeni nebyla ve frakci CYT aktivita reduktas daunorubicinu (pH 6,0) detekována.

Tab. 22: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakcích MIK, CYT a MIT kmene ISE

	ISE		
	MIK	CYT	MIT
Metyraponreduktasa		0,34 ± 0,15	
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0)		ND	
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5)		0,09 ± 0,15	
DL-glyceraldehydreduktasa	3,32 ± 0,40	10,60 ± 0,52	1,13 ± 0
4-pyridinkarboxaldehydreduktasa	33,20 ± 2,62	261,65 ± 21,84	44,64 ± 1,30

Tab. 23: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakcích MIK, CYT a MIT kmene IRE

	IRE		
	MIK	CYT	MIT
Metyraponreduktasa		1,96 ± 0,47	
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0)		1,45 ± 0,18	
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5)		0,31 ± 0,31	
DL-glyceraldehydreduktasa	3,51 ± 1,15	12,70 ± 0,82	3,09 ± 0,19
4-pyridinkarboxaldehydreduktasa	34,08 ± 3,33	264,80 ± 8,38	24,63 ± 1,55

Tab. 24: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakcích MIK, CYT a MIT kmene WR

	WR		
	MIK	CYT	MIT
Metyraponreduktasa		1,70 ± 0,46	
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0)		1,09 ± 0,18	
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5)		0,43 ± 0,11	
DL-glyceraldehydreduktasa	4,10 ± 0,13	9,42 ± 0,42	2,78 ± 0,14
4-pyridinkarboxaldehydreduktasa	48,06 ± 2,24	190,10 ± 8,54	59,79 ± 4,00

Acenaftenol je typickým substrátem pro enzymy z podrodiny AKR1C. Zjistilo se, že největší specifickou aktivitu enzymů má ve frakci CYT WR kmen a nejnižší ISE kmen.

Metoda stanovení redukční aktivity pomocí oracinu je založena na inkubaci frakce CYT všech tří kmenů ISE, IRE a WR s oracinem a HPLC stanovení metabolitu dihydrooracinu. Z měření vyplývá, že oracin nebyl redukován v ISE kmeni *H. contortus*. Nejvíce byl oracin redukován IRE kmenem. IRE kmen přednostně vytváří (-)-DHO (66,9 %), méně (+)-DHO (33,1 %). WR kmen taktéž tvoří přednostně (-)-DHO (62,03 %), méně (+)-DHO (37,97 %).

Tyto výsledky dokazují, že *H. contortus* je schopen účinně redukovat aldehydy i ketony. Redukční enzymy tak chrání vlasovky před toxickým působením xenobiotik nesoucích karbonylovou skupinu (Cvilink et al. 2008a).

Je pozoruhodné, že aktivita enzymů redukujících karbonylovou skupinu modelových substrátů je vyšší u rezistentních kmenů než u citlivého kmene, na rozdíl od biotransformace ABZ a FLU *in vitro*, kde nám vyšly výsledky opačné. Příčinou může

být odlišný mechanismus vzniku rezistence na anthelmintika. Snížená aktivita oxidas ABZ a reduktas FLU u rezistentních kmenů může spočívat ve zvýšené aktivitě membránových transportérů, čímž se buď sníží prostup anthelmintik do organismu parazita, nebo se naopak zvýší aktivní odstranění léčiv z parazita (Kerboeuf et al. 2003). Zvýšená redukční aktivita vůči modelovým substrátům je pravděpodobně dána zvýšenou aktivitou biotransformačních enzymů.

Dále byly zkoumány aktivity oxidačních enzymů, konkrétně peroxidasa a superoxidodismutasa (SOD). Systém antioxidačních enzymů, které chrání helminty před působením oxidačního stresu, je dnes relativně dobře prozkoumán (Cvilink et al. 2009).

Aktivita peroxidasy byla stanovena oxidací o-fenylendiaminu. Ke stanovení aktivity byly použity všechny frakce MIK, CYT a MIT všech tří kmenů *H. contortus*. Bylo zjištěno, že ve frakci MIK a MIT má největší specifickou aktivitu enzymů ISE kmen a oba rezistentní kmene mají aktivitu nižší. V cytosolické frakci vykazuje nejnižší specifickou aktivitu enzymů WR kmen. Peroxidasová aktivita je u všech tří kmenů vlasovky slezové nejvyšší ve frakci MIK, na rozdíl od motolice kopinaté, kde byla nalezena ve frakci MIK aktivita peroxidasy nejnižší a nejvyšší naopak v CYT frakci (Bártíková et al. 2010).

SOD katalyzuje přeměnu superoxidového aniontu na peroxid vodíku a molekulární kyslík. Aktivita SOD byla měřena ve všech subcelulárních frakcích kmene ISE, IRE, WR. Ve všech třech frakcích vykazuje největší specifickou aktivitu WR kmen. SOD je pravděpodobně jeden z hlavních oxidačních enzymů u červů (Cvilink et al. 2009).

Stanovení aktivity katalasy je založeno na použití fluorescenčního substrátu odvozeného od europium-tetracyklinu. Ke stanovení aktivity byly použity všechny frakce MIK, CYT a MIT všech tří kmenů *H. contortus*. Zde ovšem ve všech třech frakcích vykazuje nejmenší specifickou aktivitu WR kmen. V mikrosomální frakci má největší specifickou aktivitu ISE kmen, ve frakci CYT a MIT IRE kmen. Katalasa chrání larvy i dospělé formy *H. contortus* před peroxidem vodíku (Cvilink et al. 2009).

Nakonec byly sledovány aktivity konjugačních enzymů. Glutathion-S-transferasa (GST) v cytosolických frakcích, UDP-glukuronosyltransferasa (UGT), protože je vázaná na mikrosomální membránu (Mizuma et al. 1982), byla stanovena v mikrosomálních frakcích a UDP-glucosyltransferasy (UGlcT) ve frakcích MIK a MIT (u všech tří kmenů).

V jednotlivých kmenech vlasovky byly zjištěny relativně vysoké hodnoty specifické aktivity GST. Největší specifickou aktivitu enzymů má IRE kmen, aktivita kmenů ISE a WR je srovnatelná. GST byly detekovány u mnoha červů, zahrnující

nematody, motolice a tasemnice. GST je jeden z nejdůležitějších detoxikačních enzymů II. fáze u parazitů (Cvilink et al. 2009) a jeho aktivita je vyšší u rezistentních kmenů než u citlivých kmenů *H. contortus* (Kerboeuf, Aycardi 1999).

Aktivita UGT byla měřena vůči p-nitrofenolu. Porovnáním aktivit UGT v jednotlivých kmenech vlasovky bylo zjištěno, že ve frakci MIK má největší specifickou aktivitu enzymů ISE kmen a nejnižší WR kmen.

Pro stanovení aktivity UGlcT byl použit taktéž substrát p-nitrofenol. V mikrosomálních a mitochondriálních frakcích vykazuje největší specifickou aktivitu enzymu White-River kmen a nejnižší ISE kmen. Z toho vyplývá, že *H. contortus* je schopen deaktivovat xenobiotika konjugací s kyselinou glukuronovou i konjugací s glukózou. Glukosidace však probíhá hlavně v rostlinách, velmi vzácně v živočiších. O'Hanlon zaznamenal konjugaci s glukózou v metabolismu endogenních ekdysteroidů u *Ascaris suum* a *Parascaris equorum in vitro* (Cvilink et al. 2009). Konjugace struktury anthelmintika (ABZ, FLU, FLU-R) s glukózou, jako jediná reakce 2. fáze biotransformace těchto léčiv, byla popsána i u vlasovky slezové (Cvilink et al. 2008b),

Z výsledků je patrné, že aktivity biotransformačních enzymů jsou u ISE, IRE a WR kmene *H. contortus* někdy odlišné, někdy se liší jen málo. V některých případech byla aktivita enzymů vyšší u rezistentních kmenů, někdy u ISE kmene. Rozdílné aktivity biotransformačních enzymů u jednotlivých kmenů vlasovky by mohly být zapříčiněné rozdílnými mechanismy rezistence u IRE a WR kmene. Jak už bylo řečeno, způsobů navození rezistence je mnoho. Častokrát dochází ke kombinacím více mechanismů rezistence najednou. Může se jednat o zvýšenou aktivitu (expresi) biotransformačních enzymů, o změnu v genu pro transportní P-glykoprotein (Xu et al. 1998) nebo o bodovou mutaci v genu pro β -tubulin (Köhler 2001). Ať už se jedná o jakýkoliv mechanismus rezistence, všechny způsobují sníženou účinnost anthelmintik u *H. contortus*.

7. ZÁVĚR

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

Z infikovaných ovcí byly izolovány citlivé a rezistentní kmeny *H. contortus* : citlivý (ISE) kmen, BZ-rezistentní (IRE) kmen a multirezistentní White-River (WR) kmen. Ze získaných vlasovek byly připraveny subcelulární frakce – MIT (mitochondriální), CYT (cytosolické) a MLK (mikrosomální).

V předložené práci bylo dokázáno, že při *in vitro* inkubaci všechny tři kmeny vlasovky slezové metabolizují ABZ sulfoxidací a FLU redukcí karbonylové skupiny, přičemž rezistentní kmeny vlasovky katalyzují biotransformaci ABZ i FLU s nižší intenzitou než citlivý ISE kmen. Při *ex vivo* inkubaci tří kmenů *H. contortus* s FLU byly v kultivačním médiu i v homogenátu vlasovek zjištěny stejné výsledky.

U jednotlivých kmenů vlasovky byly stanoveny i specifické aktivity vybraných biotransformačních enzymů vůči modelovým substrátům. Z hlediska redukční aktivity je významné její zvýšení u rezistentních kmenů IRE a WR vůči citlivému ISE kmeni. Největší specifickou aktivitu GST, konjugačního enzymu, podílejícího se na detoxikacích xenobiotik, vykazuje rezistentní IRE kmen.

Z výsledků je patrné, že v některých případech byla aktivita enzymů vyšší u rezistentních kmenů a někdy u citlivého kmene. Různé aktivity biotransformačních enzymů mohou být způsobeny odlišnými mechanismy vzniku rezistence u jednotlivých kmenů.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABZ	albendazol
AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
BZ	benzimidazolová anthelmintika
DHO	dihydrooracin
DMSO	dimethylsulfoxid
FLU	flubendazol
GST	glutathion-S-transferasa
GSH	glutathion
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
ISE	kmen citlivý na anthelmintika
IRE	kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika
NADH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidu
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
ND	nebylo detekováno
OPD	o-fenylendiamin dihydrochlorid
SOD	superoxiddismutasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UGlCT	UDP-glukosyltransferasa
WR	White-River kmen

LITERATURA

- Alvarez L. I., Imperiale F. A., Sánchez S. F., Murno G. A., Lanusse C. E.: Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep, *Veterinary Parasitology* 2000, 94, 75-89.
- Angulo-Cubillan F.J., Garcíá-Coiradas L., Cuquerella M. 2007. Relation *Haemonchus contortus-ovina*. *Revista Científica*, ISSN 0798-2259.
- Bártíková H., Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Skálová L., Szotáková B.: Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis, *J. vet. Pharmacol. Therap.* 33, (2009) 56–62.
- Bártíková H, Vokřál I, Skálová L, Lamka J, Szotáková B: In vitro oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*, *Xenobiotica*. 2010 Sep; 40(9):593-601.
- Bruschi F., Lucchi N. W.: Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites: no doubt on their evasive role, *Acta Parasitologica*, 2001, 46(4), 233-241.
- 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.
- Coyne C. P., Brake D.: Characterisation of *Haemonchus contortus*-derived cell populations propagated *in vitro* in a tissue culture environment and their potential to induce protective immunity in sheep, *Int J Parasitol.* 2001, 31 (4): 359 – 76.
- Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubeňová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L.: Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 151 (2008a) 242-248.
- Cvilink, V., Skálová, L., Szotáková, B., Lamka, J., Kostianen, R., Ketola, R.: LC–MS–MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008b) 337-343.
- Cvilink V., Lamka J., Skálová L., 2008. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug metabolism reviews*, 02/2009, Vol. 41, No 1, 8-26.

- Ducháček L., Lamka J.: Veterinární vademecum pro farmaceuty. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 2006.
- Fleming S. A., Craig T., Kaplan R. M., Miller J. E., Navarre Ch., Rings M.: Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants, *J Vet Intern Med* 2006; 20: 435–444.
- Ghisi M., Kaminsky R., Mäser P.: Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes, *Veterinary Parasitology* 144 (2007) 313–320.
- Hyndman D., Bauman D. R., Heredia V. V., Penning T. M.: The aldo-keto reductase superfamily homepage, *Chemico-Biological Interactions* 143 – 144 (2003) 621 – 631.
- 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.
- 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., Aycardi J.: Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity, *Parasitol Res* (1999) 85: 713-718.
- Kerboeuf D, Blackhall W, Kaminsky R, von Samson-Himmelstjerna G.: P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance, *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Sep;22(3):332-46.
- King C. D., Rios G. R., Green M. D., Tephly T. R.: UDP-Glucuronosyltransferases, *Current Drug Metabolism* (2000) 1, 143-161.
- Köhler P.: The biochemical basis of anthelmintic action and resistance, *International Journal for Parasitology* 31 (2001) 336 – 345.
- Kuběnová M. (2007): *Haemonchus contortus* – metabolismus anthelmintik a dalších modelových xenobiotik *in vitro*. Rigorózní práce. Katedra biochemických věd Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové.
- Le Jambre L. F., Gill J. H., Lenane I. J., Lacey E.: Characterisation of an avermectin resistant strain of australian *Haemonchus contortus*, *International Journal for Parasitology* 25: (1995) 691-698.
- 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.

- Mizuma T., Machida M., Hayashi M., Awazu S.: Correlation of drug conjugative metabolism rates between *in vivo* and *in vitro*: glucuronidation and sulfation of p-nitrophenol as a model compound in rat J.Pharm.Dyn 5, 811-817 (1982).
- 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.
- O'Hanlon G. M., Cleator M., Mercer J. G., Howells R. E., Rees H. H., (1991), Metabolism and fate of ecdysteroids in the nematodes *Ascaris suum* and *Parascaris equorum*. Mol Biochem Parasitol 47: 179-187.
- Papadopoulos E.: Anthelmintic resistance in sheep nematodes, Small Ruminant Research 76 (2008) 99–103.
- Riou M., Guégnard F., Le Vern Y., Kerboeuf D.: Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics, Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2003) 52, 180–187.
- 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.
- Salinas AE, Wong MG: Glutathione-S-transferases, A review, Curr Med Chem. 1999 Apr; 6(4):279-309.
- Tiwari J., Kumar S., Kolte A. P., Swarnkar C. P., Singh D., Pathak K.: Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique, Veterinary parasitology 2006, 138: 301 – 307.
- van Wyk J. A., Gareth F.B.: The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment, Vet. Res. 33 (2002) 509 – 529.
- van Wyk J. A., Malan F. S., Gerber H. M., Alves R. M.: Two field strains of *Haemonchus contortus* resistant to rafoxanide, Onderstepoort J Vet Res. 1987 Jun; 54(2):143-6.
- Velík J., Baliharová V., Fink-Gremmels J., Bull S., Lamka J., Skálová L.: Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes, Research in Veterinary Science 76 (2004) 95–108.
- Waller P. J., Chandrawathani P.: *Haemonchu contortus*: Parasite problem No. 1 from tropics – polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology, Tropical Biomedicine, 2005, 22 (2): 131 – 137.

- Waller P. J.: Management and control of nematode of small ruminants in the face of total anthelmintic failure, *Tropical. Biomedicine*, 2004, 21 (2): 7 – 13.
- Webb L. J., Miles K. K., Kessler F. K.: Analysis of substrate specificities and tissue expression of rat UDP-glucuronosyltransferases UGT, *Drug. Metab. Dispos* 33 (1): 77 – 82, 2004.
- Wilce M. C. J., Parker M. W.: Structure and function of glutathione S-transferases, *Biochimica et Biophysica Acta* 1205 (1994) 1-18.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R., Prichard R. (1998) Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91: 327-335.
- <http://pubs.ext.vt.edu/410/410-027/410-027.html> [cit. 2011-18-02]