

## Abstrakt

Největší ekonomické ztráty v produkci dobytka jsou spojeny s gastrointestinálními parazitózami. *Haemonchus contortus* je jeden z nejvíce patogenních parazitů malých přežvýkavců (ovcí, koz). Parazit vykazuje značnou přizpůsobivost vůči zevním podmínkám a dnes je v podstatě světově rozšířen. Zásadním problémem při léčbě haemonchózy je rezistence *H. contortus* vůči řadě anthelmintik, hlavně benzimidazolového typu. Na vývoji rezistence se mohou podílet biotransformační enzymy parazita, které ho chrání před toxickými účinky anthelmintik. Cílem předložené rigorózní práce bylo studovat biotransformaci benzimidazolového anthelmintika flubendazolu u *H. contortus*. Dále byla tato práce zaměřená na poznání dalších biotransformačních aktivit tohoto parazita vůči vybraným modelovým xenobiotikům. Výsledky prokázaly, že cytosolické NADPH-dependentní enzymy *H. contortus* deaktivují flubendazol redukcí karbonylové skupiny. Výrazná redukční aktivita byla nalezena i vůči dalším xenobiotikům. Byla také zjištěna významná aktivita glutathion-S-transferas, která může účinně napomáhat další deaktivaci anthelmintik. Znalost biotransformačních enzymů parazitů přispěje k detailnějšímu pochopení mechanismu rezistence.

## Abstract

Most economic losses in ruminant are associated with gastrointestinal parasite infections. *Haemonchus contortus* is one of the most pathogenic parasites of small ruminants (sheep, goat). *H. contortus* exhibits considerable adaptability to unfavourable conditions and its occurrence is world-wide. Today, the treatment of haemonchosis is complicated due to resistance of *H. contortus* to common anthelmintics, especially those with benzimidazole structure. Biotransformation enzymes, that protect parasite against toxic effect of anthelmintics, may contribute to development of resistance. The aim of this project was to study the biotransformation of benzimidazole anthelmintic flubendazole in *H. contortus* and to find out biotransformation of other model xenobiotics. The results showed that cytosolic NADPH-dependent enzymes of *H. contortus* deactivate flubendazole via reduction of its carbonyl group. Substantial reduction of other xenobiotics was also found. Significant activity of glutathion S- transferases may aid to anthelmintics further deactivation. The new information about biotransformation enzymes of parasites contribute to understanding of mechanism of resistance.

# OBSAH

OBSAH.....	5
1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U HELMINTŮ.....	8
2.1.1 Fáze I.....	9
2.1.2 Fáze II.....	15
2.1.3 Fáze III.....	17
2.2 <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> .....	18
2.2.1 Vlasovka slezová a její vývojový cyklus.....	18
2.2.2 Onemocnění a diagnostika.....	20
2.2.3 Kontrola a léčba.....	20
2.3 REZISTENCE.....	25
3. CÍL PRÁCE.....	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	31
4.1.1 Chemikálie.....	31
4.1.2 Přístroje.....	32
4.1.3 Biologický materiál.....	32
4.2 PRACOVNÍ POSTUP.....	33
4.2.1 Příprava pufrů a médií.....	33
4.2.2. Příprava subcelulárních frakcí.....	35
4.2.3 BCA stanovení bílkoviny.....	36
4.2.4 Sledování metabolismu FLU u vlasovky slezové <i>in vitro</i> .....	38
4.2.5 Stanovení aktivity oxidačních biotransformačních enzymů.....	40
4.2.6 Stanovení aktivity redukčních biotransformačních enzymů.....	43
4.2.7 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu.....	48
4.2.8 Stanovení aktivity konjugačních enzymů.....	49
5. VÝSLEDKY.....	53
5.1 Stanovení koncentrace bílkoviny.....	53
5.2 Sledování metabolismu FLU u vlasovky slezové <i>in vitro</i> .....	54
5.2.1 Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi.....	54
5.2.2 Inkubace red. FLU se subcelulárními frakcemi.....	55
5.2.3 Stanovení kinetických parametrů FLU ve frakci B.....	56
5.3 Stanovení aktivity oxidačních enzymů.....	57
5.3.1 Stanovení aktivity pentoxyresorufin-O-depentylasy (PROD).....	57
5.3.2 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD).....	57
5.4 Stanovení aktivity redukčních enzymů.....	58
5.4.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu.....	58
5.4.2 Stanovení kinetických parametrů redukce metyraponu ve frakci B.....	58
5.4.3 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 6,0.....	59
5.4.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu.....	60
5.4.5 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5.....	61
5.4.6 Stanovení redukční aktivity pomoci oracinu.....	61
5.5 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu.....	62
5.6 Stanovení aktivity konjugačních enzymů.....	63

5.6.1 Stanovení aktivity UGT .....	63
5.6.2 Stanovení aktivity GST .....	63
5.6.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy.....	64
6. DISKUSE .....	65
7. ZÁVĚR.....	69
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	70
LITERATURA .....	71

# 1. ÚVOD

Helmintózy hospodářských, domácích i volně žijících zvířat jsou celosvětovým problémem a způsobují značné ekonomické ztráty. V chovech přežvýkavců jsou největší ekonomické ztráty spojeny s gastrointestinálními parazitárními infekcemi. Z původců těchto infekcí je obzvláště patogenní vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) způsobující hostiteli těžkou anémii a hypoalbuminemii, v řadě případů vedoucí až k úhynutí hostitele.

Kontrola parazitóz v chovech je především soustředěna na podávání anthelmintik. Mezi nejčastěji používané látky patří benzimidazolové deriváty. Jejich neracionální užívání vedlo v mnoha zemích k rozšíření rezistence u cílových druhů parazitů. K tomu, aby bylo možné se s tímto problémem vypořádat, je nutné nejprve poznat mechanismus navození rezistence a procesy, které s tím souvisí. V této souvislosti jsou zkoumány také biotransformační enzymy, které mohou do určité míry chránit parazity před toxickými účinky antihelmintik a tím přispívat k vývoji rezistence helmintů.

Předložená rigorózní práce se zaměřuje na studium biotransformace xenobiotik u vlasovky slezové. V projektu byla sledována biotransformace anthelmintika flubendazolu a testovány aktivity biotransformačních enzymů vůči vybraným modelovým substrátům. K biotransformačním studiím byly použity subcelulární frakce homogenátu vlasovek slezových. Dospělci vlasovky slezové byli získáni ze slezu experimentálně infikovaných ovcí.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK U HELMINTŮ

Svět, ve kterém všechny organismy žijí je chemický komplex a ne všechny sloučeniny jsou využívány pro růst a reprodukci, ale organismy jsou vystaveny značnému množství chemických látek, jež nemají fyziologickou hodnotu a mohou být dokonce toxické. Tyto sloučeniny nazýváme xenobiotika.

Xenobiotikum může podléhat v organismu jednomu ze tří osudů.

- (1) Může být odstraněno v nezměněné podobě.
- (2) Může dojít ke spontánní neenzymatické přeměně na jinou sloučeninu. To se děje, když je xenobiotikum vystaveno určitým fyziologickým podmínkám, jako je vysoké pH, nebo když dojde ke kontaktu s reaktivní fyziologickou molekulou.
- (3) Molekula xenobiotika může být enzymaticky metabolizována, tj. biotransformace.

Nejčastěji dochází ve tkáních k poslední cestě a obvykle dochází k detoxikaci, ačkoli některé sloučeniny mohou být aktivovány (Precious, Barret 1989).

Xenobiotika jsou metabolizovány ve třech fázích. V první fázi hydrolytické, oxidační nebo redukční enzymy zavádějí do molekuly reaktivní skupiny, např. hydroxylové, karboxylové, aminoskupiny nebo thiolové skupiny. V druhé fázi dochází ke konjugaci s nízkomolekulární sloučeninou, jako je aminokyselina, cukr, glutathion nebo anorganický ion (fosfát, sulfát) anebo organický ion (acetát, propionát). Sloučeniny, které již obsahují reaktivní skupiny, mohou být přímo konjugovány bez potřeby 1. fáze metabolismu. Třetí fáze zahrnuje exkreci nebo sekvestraci.

Detoxikační mechanismy u helmintů nebyly dosud rozsáhle studovány, přestože význam léčby a rozvoje rezistence je zřejmý (Barret 1997). Pro parazity zahrnují xenobiotika sekundární rostlinné metabolity z hostitelské stravy, polutanty životního prostředí, složky imunitní odpovědi hostitele a anthelmintika (Precious, Barret 1989).

## 2.1.1 Fáze I

### 2.1.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou monooxygenasy, které katalyzují oxidaci řady endogenních a exogenních sloučenin u bakterií, hub, rostlin, hmyzů a obratlovců. Cytochromy fungují tak, že konečná oxidasa získává elektrony z NADPH prostřednictvím NADPH-cytochrom P450-reduktasy nebo z NADH prostřednictvím cytochromu *b<sub>5</sub>*. Zatímco cytochromy P450 jsou široce rozšířeny v přírodě, pokusy detekovat je u paraziticky i volně žijících červů byly neúspěšné. Enzymové preparáty z řady nematod a cestod byly neschopné oxidovat modelové substráty metabolizované P450 u savců a hmyzů. Pokusy detekovat cytochrom P450 spektrofotometricky v mikrosomální frakci *Moniezia expansa*, *Ascaris lumbricoides*, *Haemonchus contortus* a *Heligmosomoides polygyrus* byly všechny neúspěšné stejně jako detekce P450 za použití chemických induktorů. U *Caenorhabditis elegans* byly identifikovány dvě sekvence genů, které vykazaly podobnost se známými sekvencemi cytochromu P450 a také byly nalezeny nízké monooxygenasové aktivity P450 u volně žijících larev *H. polygyrus*. Je možné, že tyto nízké hladiny aktivity P450 souvisí se syntetickými funkcemi cytochromu P450, např. při syntéze leukotrienů nebo prostaglandinů a nejedná se o detoxikační reakce. Je také možné, že monooxygenasy P450 jsou u helmintů substituovány peroxidasami nebo některými jinými oxidačními enzymy jako jsou flavinové monooxygenasy. Nepřítomnost P450 u parazitických červů může souviset s anaerobní nebo mikroaerobní povahou parazitů, třebaže jsou helminté schopni jiných oxidačních reakcí, jako je přeměna prolinu na hydroxyprolin. Další příčinou absence CYP450 může být potřeba omezit peroxidaci lipidů membrán. Ve srovnání s jinými organismy mají helminti vysoké procento nenasycených mastných kyselin v membránových lipidech a cytochrom P450 je významným zdrojem superoxidových radikálů (Barrett 1997).

Cytochrom P450 je zodpovědný za rezistenci řady sloučenin u hmyzu, avšak je relativně málo známá úloha a význam tohoto enzymového systému u helmintů (Kotze et al. 2006). Studie s dospělci *H. contortus* ukazující epoxidaci aldrinu *in vitro* (Kotze 2000) a oxidační metabolismus moxidectinu v homogenátu z červů

naznačují úlohu cytochromu P450 v metabolismu xenobiotik u dospělého stádia (Kotze 2006).

### 2.1.1.2 Redukční enzymy

Helminté se v 1.fázi metabolismu xenobiotik spoléhají především na redukční nebo hydrolytické reakce. U červů byla nalezena řada hydrolas, zahrnující O- a N-deacetylasy, dále byly nalezeny enzymové systémy schopné redukovat aldehydy a ketony a také spíše neobvyklé azo- a nitroreduktasy (Barrett 1997).

Karbonylové sloučeniny jsou široce rozšířeny v přírodě a představují opravdovou hrozbu pro žijící organismy, protože jsou schopny reagovat s buněčnými makromolekulami. Aldehydy a ketony jsou škodlivé pro buňku, protože se mohou kovalentně vázat se sekundárními aminoskupinami a thiolovými skupinami proteinů. Určité aldehydy jsou mutagenní díky schopnosti interagovat s DNA. V buňce je ochrana proti reaktivním karbonylovým sloučeninám zajištěna několika rodinami detoxifikačních enzymů, zahrnující aldo-ketoreduktasy (AKR), aldehyddehydrogenasu, aldehydoxidasu, alkoholdehydrogenasu a glutathion-S-transferasu (O'Connor 1999).

Reduktasy karbonylu jsou enzymy schopné přeměňovat širokou paletu karbonylových sloučenin na odpovídající alkoholy. Existují tři nadrodiny oxidoreduktas, které katalyzují oxidaci a redukci široké řady alkoholických a aldehydických sloučenin fyziologického nebo farmakologického významu:

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

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

SDR jsou rozpustné proteiny, nejčastěji diméry nebo tetramery, obsahující přibližně 270 aminokyselin na monomer a charakterizované katalytickou triádou



(Ser, Tyr a Lys) v aktivním místě. AKR jsou většinou monomerické, NAD(P)H dependentní enzymy, o délce asi 320 aminokyselin s aktivním místem obsahujícím tetradu Tyr, His, Asp a Lys.

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

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

Nadrodinu AKR lze na základě sekvenční podobnosti rozdělit do sedmi rodin (AKR1 – AKR7) díky poznatkům získaných z molekulárního klonování. Znalost biochemických vlastností a fyziologických úloh těchto reduktas neдрží krok s pokusy molekulárního klonování.

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

A – aldehydreduktasy (savčí), AKR1A

B – aldoreduktasy

C – hydroxysteroiddehydrogenasy

D –  $\Delta^4$ -3-ketosteroid-5 $\beta$ reduktasy

E – aldehydreduktasy (rostlinné)

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

Nejlépe popsané AKR enzymy jsou aldehydreduktasa (AKR1A1) a aldoreduktasa (AKR1B1). AKR1A1 přednostně katalyzuje NADPH-dependentní redukci alifatických aldehydů, aromatických aldehydů a biogenních aminů, kdežto AKR1B1 lépe katalyzuje NADPH-dependentní redukci aldopentos a aldohexos. Méně dobře je porozuměno hydroxysteroiddehydrogenasam z podrodiny AKR1C

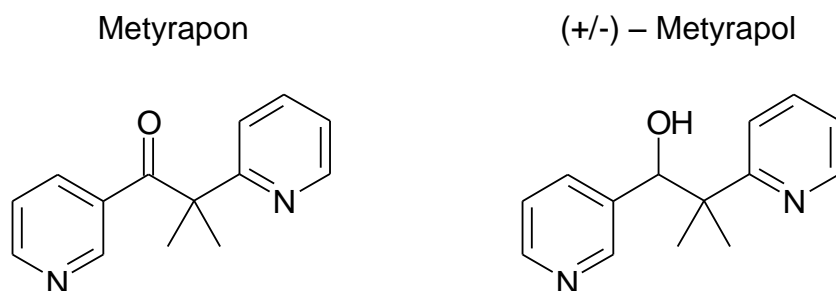
(dříve označované jako dihydrodioldehydrogenasy, DD), které katalyzují oxidačně/redukční přeměny derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, steroidních hormonů a žlučových kyselin. U člověka existují alespoň čtyři různé izoenzymy, a to AKR1C1 (tzv. DD1 nebo-li 20 $\alpha$ -hydroxysteroiddehydrogenasa (HSD)), AKR1C2 (tzv. DD2 nebo žlučové kyseliny vázající protein), AKR1C3 (tzv. typ II 3 $\alpha$ -HSD) a AKR1C4 (DD4 nebo-li typ I 3 $\alpha$ -HSD) (O'Connor et al. 1999).

Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) je rozsáhlá skupina enzymů s NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasovou aktivitou. Karbonylreduktasy (CR) hrají důležitou roli v metabolismu léčiv, jako např. daunorubicinu, metyraponu, acetoexamidu (Terada 2000).

Pro stanovení aktivit reduktas byly použity tyto substráty: metyrapon, daunorubici, DL-glyceraldehyd a oracin.

### METYRAPON

Metyrapon, aromatický keton (2-methyl-1,2-di-3-pyridylpropan-1-on), je redukován v jeho ketonické funkční skupině na odpovídající alkoholický metabolit metyrapol (obr.1). Tato biotransformace je zprostředkována karbonylreduktasou (EC 1.1.1.184) a aldehydreduktasou (EC 1.1.1.2), jak ukazuje použití specifických inhibitorů. Studie redukce metyraponu provedené na klidových buňkách *Mycobacterium aurum* v přítomnosti kvercetrinu nebo fenobarbitalu ukázaly, že oba inhibitory mají vliv na biotransformaci metyraponu. Kvercetrin indikuje značnou spoluúčast karbonylreduktasy (SDR) a fenobarbital indikuje účast aldehydreduktasy při redukci metyraponu. Tvorba metyrapolu se děje v přítomnosti buď NADPH nebo NADH jako kofaktoru (Combourieu et al. 2004).

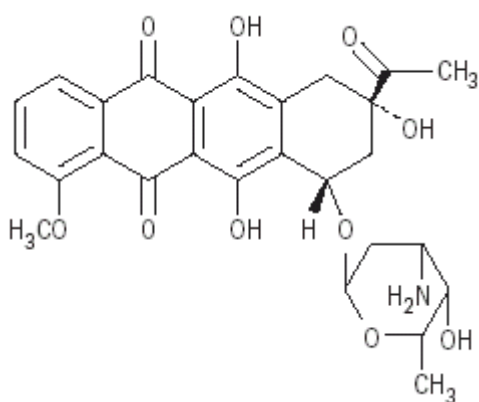


Obr. 1: Metyrapon a jeho metabolit.

## DAUNORUBICIN

Daunorubicin (obr. 2) je antracyklinové antibiotikum izolované ze *Streptomyces ceruleorubidus*. Je to červený krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě.

Daunorubicin je metabolizován především cytosolickými reduktasami karbonylu na C13-ol metabolit. Karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184), AKR1C2 (EC 1.3.1.20) vykazují redukční aktivitu při pH 6,0 a aldehydreduktasa AKR1A (EC 1.1.1.2) vykazuje aktivitu při pH 8,5 (Schröterová 2004).



Obr. 2: Daunorubicin.

## DL-GLYCERALDEHYD

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

## ORACIN

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

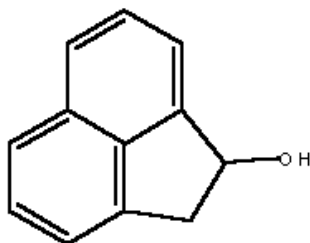
11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 (11 $\beta$ -HSD 1, EC 1.1.1.146) se účastní u oracinu redukce karbonylu v mikrosomální frakci jater potkana. 11 $\beta$ -HSD

1 je mikrosomální enzym, jehož fyziologická úloha spočívá v reversibilní oxidoredukci glukokortikoidů. Navíc se 11 $\beta$ -HSD 1 ukazuje jako multifunkční enzym, který katalyzuje redukci nesteroidních karbonylových sloučenin, tím se podílí na detoxikaci různých aldehydů a ketonů (Wsól et al. 2004).

Redukce karbonylu biologicky a farmakologicky aktivních karbonylových sloučenin odpovídající alkoholům je především zprostředkována cytosolickými NADPH-dependentními enzymy. Cytosolická karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184) hraje pozoruhodnou úlohu v redukci karbonylu xenobiotik a je specificky inhibována quercetrinem. Karbonylreduktasa je široce rozšířená v tkáních člověka a jiných savců, katalyzuje NADPH-dependentní redukci různých karbonylových sloučenin. Bylo zjištěno, že na redukci oracinu se také podílí cytosol, k redukci dochází přednostně v anaerobních podmínkách a za účasti NADPH. Podle citlivosti ke kvercetrinu (99% inhibice) je za tvorbu DHO v cytosolu jater potkana pravděpodobně zodpovědná karbonylreduktasa (Szoťáková et al. 2000).

### ACENAFTENOL

Acenaftenol (1,2-dihydroacenaphthylen-1-ol) je substrátem enzymů AKR1C1, AKR1C4. AKR1C mají buď extrémně nízkou nebo nedetekovatelnou reduktasovou aktivitu u většiny dikarbonylů, aromatických a alifatických aldehydů, ketonů. Avšak ukázalo se, že mohou katalyzovat oxidaci 1-acenaphtenolu (obr. 3). Nízká katalytická aktivita AKR1C enzymů a jejich omezené rozšíření v lidských tkáních ukazuje, že snad zaujímají specifické detoxifikační reakce, které se odlišují od ostatních zástupců této nadrodiny. Je možné, že lidské jaterní AKR1C4 a AKR1C1 přítomné v játrech, ledvinách a varlatech inaktivují a udržují správné hladiny steroidních hormonů (O'Connor 1999).



Obr. 3: Chemický vzorec acenaftenolu.

## 2.1.2 Fáze II

Hlavní rozdíl fáze II ve srovnání s fází I je její syntetický charakter. K syntéze je zapotřebí určitá endogenní složka. Reakce II. fáze zasahují do endogenního metabolismu a soutěží s endogenními látkami o společný enzym obsazením jeho aktivního místa. Ze syntetického charakteru konjugací plyne i jejich endergonní charakter a závislost na dodávce energie. Konjugace výrazně zvyšuje polární charakter produktů; ten je obvykle tak vysoký a stupeň ionizace téměř úplný, že konjugát už není schopen pronikat do buněk a je efektivně vylučován (Barnová et al. 1991).

Ve srovnání se savčím hostitelem se metabolismus fáze II jeví podobně limitovaný jako u fáze I. Helminté zřejmě nejsou schopni konjugovat fenoly a karboxylové kyseliny s glycinem nebo glukuronovou kyselinou, tak jako je tomu u obratlovců. Byla u nich však prokázána schopnost N-acetylace při deaktivaci biogenních aminů a konjugace s glukózou, sulfáty či fosfáty v metabolismu ekdysteroidů. Bioaktivní peptidy jsou inaktivovány aminopeptidasami, endopeptidasami a deamidazami. Základní reakcí metabolismu fáze II je konjugace s glutathionem, která je katalyzována glutathion-S-transferasou (GST) (Barrett, 1997).

### 2.1.2.1 Glutathion-S-transferasa

Glutathion-S-transferasy (GST) jsou multifunkční proteiny, které byly nalezeny téměř ve všech rostlinných a živočišných tkáních. Jedná se o dimery s molekulovou hmotností přibližně 50kDa. Každý monomer má vazebné místo pro glutathion (G-site) a pro vodík (H-site). Transferasy jsou obvykle přítomny v tkáních jako série isoenzymů, které mohou být buď homo- nebo heterodimery. Isoenzymy jsou často tkáňově specifické. Nejvyšší hodnoty GST aktivity byly naměřeny u tříd Cestoda a Trematoda, nižší u Nematoda. Aktivita u gastrointestinálních parazitů je vyšší než u parazitů krevních či tkáňových. To může souviset s cytoplazmatickým tegument, který činí Cestoda a Trematoda citlivější na přítomnost xenobiotik a sekundárních metabolitů v gastrointestinálním

traktu hostitele. U savců je asi 10% GST aktivity spojeno s mikrosomy, avšak zdá se, že u helmintů jsou GST pouze v cytoplasmě. Všichni dosud zkoumaní parazité obsahovali několik GST isoenzymů, ačkoliv ve většině případů byl jeden isoenzym hlavní a několik minoritních. Všechny dosud izolované isoenzymy u Platyhelminthes jsou homodimery s identickými podjednotkami, u Nematod byly nalezeny i heterodimery.

Savčí cytoplasmatické GST isoenzymy mohou být rozděleny na základě jejich enzymatických vlastností a podle N-konce aminokyselinové sekvence do čtyř nadrodin alfa, mí, pí a théta. Pokusy na enzymy červů za použití modelových substrátů a inhibitorů ukazují, že nezapadají do tohoto schématu. U Nematod byla nalezena směs alfa, mí a pí typu. GST dosud izolované z Cestod jsou nejpodobnější mí třídě savčích GST.

U obratlovců a hmyzů může být aktivita GST indukována a u savců existuje xenobiotické regulační místo a regulace oxidačním stresem spojená s transferasovým genem. U tasemnice *H. diminuta* vzrůstají hladiny GST po expozici fenobarbitalem, byla také zjištěna indukce aktivity GST xenobiotiky u *Echinococcus granulosus* a *Schistosoma mansoni* (Barrett, 1997).

#### **2.1.2.2 UDP-glukuronosyltransferasa (UGT)**

UDP-glukuronosyltransferasy jsou integrální proteiny s hlavní částí proteinu obsahující katalytickou doménu lokalizovanou v lumen endoplazmatického retikula. Oblast 15 – 20 aminokyselin C-konce je upevněna v membráně endoplazmatického retikula. Předpokládá se, že aglykon vázající místo je na N-konci polypeptidu UGT, které je v oblasti proteinu, jež vykazuje největší variabilitu mezi UGT isoenzymy. UDP-glukuronovou kyselinu vázající doména je ve vysoce konzervativní polovině C-konce proteinu (Coffman et al. 1996).

UDP-glukuronosyltransferasy jsou rodinou enzymů 2. fáze metabolismu, které katalyzují konjugaci xenobiotik s glukuronovou kyselinou a vznikají glukuronidy. Tyto konjugáty směřují ke snížení biologické aktivity, ke snížení distribuce a zvýšení exkrece z těla (Webb et al. 2004).

### 2.1.3 Fáze III

Konjugace s glutathionem normálně snižuje chemickou reaktivitu. Konjugáty s glutathionem jsou však značnými inhibitory GSH dependentních enzymů. Z tohoto důvodu musí být konjugáty s GSH z buňky odstraněny 3. fází metabolismu. V savčích tkáních jsou konjugáty s GSH transportovány z buněk prostřednictvím ATP dependentního transportního mechanismu. Savci jsou schopni dalšího metabolismu GSH konjugátů například na kyselinu merkapturovou. Zvýšení počtu tegumentálních transportních míst může být jedním z mechanismů zahrnutých ve vývoji lékové rezistence.

GST je součástí antioxidačního obranného systému parazita, a aby byl efektivní, musí působit na povrchu parazita nebo v jeho blízkosti. GST a glutathion peroxidasa mohou být aspoň přechodně vystaveny na povrchu motolic a tasemnic, zatímco sekreční formy těchto dvou enzymů byly popsány u hlístic. Jestliže tyto mimotělní enzymy jsou katalyticky aktivní, mohly by být spojeny s určitou formou tegumentálního transportního mechanismu.

U parazitických helmintů chybí důkaz přeměny konjugátů na další deriváty. Pokusy změřit aktivity enzymů katalyzujících tyto reakce vedla jen k nízkým hodnotám u jednoho z nich – cystein konjugát  $\beta$ -lyasy. Konjugáty s glutathionem jsou tedy exkretovány v nezměněné podobě a to prostřednictvím pumpy o základních charakteristikách shodných s membránovým přenašečem u savců. Pumpa pro GSH konjugáty u tasemnic je docela aktivní, srovnatelná se savčím systémem.

Alternativou metabolismu a transportu může být sekvestrace. V buňkách dochází k sekvestraci prostřednictvím proteinů specificky vázících toxické sloučeniny. U nematod byly nalezeny metalothioneiny, bílkoviny vázící toxické kovy (Pb, Zn, Cd). V savčích i parazitárních buňkách se nalézají dvě hlavní skupiny proteinů vázící xenobiotika: ligandiny Y a Z. Ligandiny Y jsou v podstatě GSH-transferasy schopné vázat řadu neutrálních i nabitých sloučenin a těžké kovy. Ligandiny Z jsou nízkomolekulární bílkoviny vázící mimo jiné mastné kyseliny, jejich CoA deriváty, steroly, lysofosfolipidy, nepolární organické sloučeniny (hem, bilirubin). Nová třída těchto proteinů, která je schopná vázat

nasycené i nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (ale ne jejich CoA estery), steroidy a řadu antihelmintik (nikoliv však benzimidazoly, ivermektin a prazikvantel), byla objevena v *M. expanza*. Tyto bílkoviny mají kromě detoxifikační funkce i funkci transportní, usnadňují například přesun antihelmintika na specifické místo uvnitř parazitární buňky (Barrett, 1997).

## **2.2 HAEMONCHUS CONTORTUS**

### **2.2.1 Vlasovka slezová a její vývojový cyklus**

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je převládající gastrointestinální parazit u ovcí a koz (Tiwari et al. 2006). Náleží do třídy Secernatea, podtřídy Rhabditia, řádu Strongylida, čeledi Trychostrongylidae. Samečci jsou velcí 10 až 20 mm a samičky 18 až 30 mm. Vajíčka jsou poněkud nažloutlá 70 až 85 µm dlouhá a 41 až 44 µm široká.

Dospělí samečci a samičky žijí ve slezu přežvýkavců. Samička klade denně 5000 až 10000 vajíček, které se dostávají do prostředí ve výkalech ([www.ucdnema.ucdavis.edu](http://www.ucdnema.ucdavis.edu)).



Obr. 4: Vlasovka slezová.

*Haemonchus* má přímý vývojový cyklus, který probíhá přes tři larvální stádia (L1-3). Životní cyklus je rozdělen na dvě fáze: volně žijící stádium a parazitické stádium uvnitř hostitele. Vajíčka jsou uvolněna do prostředí ve výkalech a z něj se



vyvíjí přes první (L1) a druhé (L2) larvální stádium infekční L3. *Haemonchus contortus* je pozřen spolu s trávou a následně putuje do slezu, kde se larva vyvíjí do sexuálně zralého dospělého stádia.

Environmentální podmínky mají hlavní vliv na populaci parazitů. Vlasovka slezová je dobře adaptována na teplé a vlhké prostředí. Řada studií zkoumala environmentální proměnné, jež determinují úspěch vývojového procesu vnějších stádií *H. contortus*, od vajíčka k 3. larválnímu stádiu. Pro haemonchózu ovcí byla zjištěna spodní hranice teploty 18°C a minimální měsíční srážky 50 mm. Optimální podmínky pro vývoj z vajíčka po L3 je 28°C a vlhkost nad 70%, vývoj je omezen nebo zastaven při teplotě pod 9°C. Vývoj vnějších larválních stádií a ukončení jejich životního cyklu je omezeno v chladnějším mírném klimatu (Waller 2005).

*H. contortus* spolu s dalšími parazity dobytka vykazuje značnou ekologickou a biologickou plasticitu vůči nepříznivým podmínkám, jak vnějšího prostředí, tak prostředí hostitele. V současnosti se *H. contortus* stává významným také v oblastech mírného podnebí. Podrobné ekonomické hodnocení znovu ukazuje, že hlavní ztráty se týkají spíše živočišné produkce než mortality.

Jak bylo výše zmíněno, životní prostředí má zásadní vliv na rozvoj nematodóz. Onemocnění je determinováno především počasím, jmenovitě teplotou a množstvím srážek. Jestliže je jedna z těchto podmínek nepříznivá (teplota a/nebo vlhkost je příliš nízká), může dojít k přerušení vývoje od vylíhnutých vajíček k larválním stádiím. Tedy teplota i srážky jsou důležitými parametry, které řídí tento proces v mírném podnebí, zatímco v tropech/subtropech jsou limitujícím faktorem pouze srážky, teplota je vždy dostatečně vysoká pro vývojový proces. Tedy, ve vlhkých tropech/subtropech jsou podmínky na pastvách příznivé víceméně nepřetržitě. V mírném pásu bývají často období, kdy je omezen vývojový proces, kdy je redukována larvální dodávka, a tyto období lze využít ke kontrole onemocnění.

Na rozdíl od chovu dobytka v mírných oblastech, kde je prováděno zimní ustájení a/nebo chybí pastva, chov v tropech/subtropech je charakterizován celoroční pastvou. Tak je larvální dodávka víceméně nepřetržitá a všechen dobytek je pravděpodobně infikován. I když farmáři v řadě tropických/subtropických oblastech nemají finanční prostředky, znalosti nebo i vůli ošetřovat zvířata pomoci léků, jsou zde případy zemí se zcela opačným přístupem (Waller et al. 2004).

## 2.2.2 Onemocnění a diagnostika

*H. contortus* zůstává ve slézu přichycen na mukózu nebo je volný v obsahu slézu, a protože se živí krví, je častým klinickým projevem infekce anémie (Alvarez et al. 2000). Způsobuje hypoalbuminémii a často vede ke snížení obsahu proteinů. Může také vést k rychlejšímu úhynu mladých ovcí oproti jiným helmintózám (Alvarez et al. 2000). Je známé, že v průběhu fatální hemonchózy se mění barva spojivek z tmavě červené u zdravých ovcí, přes světle růžovou až k prakticky bílé jako výsledek progresivně se zhoršující anémie. Jednotlivé stupně anémie projevující se ve spojivkové mukózní membráně lze zkoumat jak fotografováním mukózní membrány, tak určením hematokritu (van Wyk, Bath 2002).

Dobytěk s těžkou infekcí *H. contortus* ztrácí odolnost, má bledé dásně a spojivky. Tyto znaky ukazují na velmi vysoké zatížení zvířete parazitem, EPG je víc než 10000. Přírůstek váhy a výtěžek vlny klesá na nulu (nebo dochází k úbytku váhy). U zvířata s lehčím zatížením (EPG je 500 až 2000) může dojít k omezení růstu vlny, snížení produkce mléka a redukci růstu ([www.wormboss.com.au](http://www.wormboss.com.au)).

*H. contortus* je patrně jediným nematodem ovcí a koz, který může být přesně diagnostikován bez použití laboratorního testování. Běžným příznakem je akutní anémie. *H. contortus* je považován za nejvíce patogenního parazita malých přežvýkavců, má vysoký biotický potenciál a může způsobit ztráty ve všech živočišných třídách. Ačkoliv se vyskytují smíšené infekce s jinými nematody, jsou vajíčka tohoto parazita stále dominantní na pastvách (Waller 2005).

## 2.2.3 Kontrola a léčba

Helmintózy jsou velkým medicínským problémem jak u lidí, tak u domácích zvířat. Navíc helmintózy dobytka způsobují značné ekonomické ztráty, především v oblastech s rozšířenou pastvou. Naštěstí dostupnost bezpečných a širokospektrých anthelmintik pomohla redukovat dopad řady parazitóz. Moderní anthelmintika jsou vysoce účinná vůči dospělým i nedospělým stádiím všech důležitých gastrointestinálních nematod stejně jako proti mnoha extraintestinálním

červům. Řada těchto léčiv je dobře snášena hostitelem a v některých případech probíhá léčba v jedné orální dávce (Köhler 2001).

Ačkoliv anthelmintika poskytují mnoho ekonomických výhod, jejich hojně používání přineslo i určité nevýhody. Nejdůležitější v tomto ohledu je vývoj rezistence parazitů přežvýkavců na anthelmintika. Dalšími velkými riziky jsou rezidua v mléce a mase a riziko náhodné ekotoxicity prostřednictvím vystavení vlivu léčiv u bezobratlých (včely, motýli) v okolním prostředí (Coyne, Brake 2001).

### 2.2.3.1 Anthelmintika

Známými cílovými místy léčiv jsou proteiny, a to iontové kanály, enzymy, strukturální bílkoviny a transportní molekuly (tab.1) (Köhler 2001)

Tab.1 :Cílová místa běžně používaných anthelmintik.

<b>Iontové kanály</b>	<b>Mikrotubuly</b>	<b>Bioenergetika</b>	<b>Neznámý mechanismus</b>
Tetrahydropyrimidiny (Pyrantel, Morantel)	Benzimidazoly	Salicylanilidy (Closantel)	Praziquantel
Imidazothiazoly (Levamisol)		Chlorované sulfonamidy (Clorsulon)	Triclabendazol
Makrocyclické laktony (Ivermektin)			
Piperazin			

### **Benzimidazoly**

Zavedení thiabendazolu (TBZ) v roce 1961 znamenalo průlom v léčbě gastrointestinálních parazitóz. Díky širokému spektru účinku TBZ a jeho nízké toxicitě u savců se stal standardem proti kterému se posuzují další odvozené benzimidazoly (BZ) (Lacey, Gill 1994).

Dřívější studie účinku těchto sloučenin u helmintů ukázaly, že způsobují ultrastrukturální změny v intestinálních buňkách obličejných červů i v tegumentálních buňkách tasemnic. Na základě mizení cytoplasmatických mikrotubulů, bylo usouzeno, že benzimidazoly vedou k inhibici mikrotubuly zprostředkovaného

transportu sekrečních vesikulů . Tyto předložené léčivem navozené fyziologické reakce byly současně podpořeny sledováním, že letální účinek fenbendazolu u *H. contortus* je spojen s inhibicí transportu sekrečních vesikulů ve střevě následované rozptýlením obsahu vesikul. Biochemická podstata působení BZ je založena na schopnosti vázat se s vysokou afinitou na podjednotku mikrotubulu, tubulin, tím se poruší struktura a funkce mikrotubulu. Studie s klasickým antimitotickým činidlem kolchicinem ukázaly, že se tato látka váže na tubulin přednostně při polymerizaci. Data získána z fluorescenční spektroskopie ukázala, že kolchicin vázající místo je na monomeru beta-tubulinu. Podobný mechanismus může být zodpovědný za inhibici polymerace tubulinu u BZ, zdá se tedy, že vázající místo těchto látek je na beta-tubulinu. Mikrotubuly jsou vysoce dynamické, všudypřítomné buněčné organely, které slouží různým vitálním funkcím zahrnující mitózu, pohyb a transport ve všech eukaryontních buňkách. Mnoho těchto struktur existuje v dynamickém rovnovážném stavu, ve kterém je v rovnováze spojování a rozpojování podjednotek. V takovémto systému interakce léčivo-tubulin vyústí v posun rovnovážného stavu, dojde ke ztrátě sítě mikrotubulů a kumuluje se volný tubulin. Mikrotubuly hrají klíčovou roli v řadě buněčných procesů, jejich látkou navozená destrukce může vést ke smrti organismu. Podstata vysoké selektivní toxicity benzimidazolových anthelmintik není zcela jasná, ale zdá se, že vazba léčiva s červem musí být silnější a irreverzibilní ve srovnání s vazbou na savčí tubulin (Köhler 2001).

V předložené práci byla sledována biotransformace anthelmintika ze skupiny BZ, a to flubendazolu. Flubendazol je p-fluorovaný analog mebendazolu, tj. methyl-(5-(4-fluorobenzoyl)-1-H-benzimidazol-2-yl)karbamát s širokým spektrem účinku proti hlísticím a tasemnicím. Biologická dostupnost flubendazolu a anthelmintický účinek závisí na perzistenci hladiny účinné látky v gastrointestinálním traktu a plazmě hostitele. Předpokladem pro úplnou účinnost je také dostatečně dlouhá doba kontaktu s parazitem. U přežvýkavců je účinnost všeobecně vyšší než u monogastrických zvířat, zejména masožravců a to díky delšímu zadržování látky v batoru a slepém střevě. Krátká střevní pasáž u masožravců podmiňuje nízkou biologickou dostupnost. Jak bylo výše popsáno vazbou léčiva na volný tubulin je inhibována polymerizace tubulinu na mikrotubuly. Dochází ke snížení příjmu a intracelulárního transportu živin a substrátu. Zejména

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

### **Agonisté nikotinu**

Tyto nejlépe komerčně dostupné antinematoda projevují svůj účinek v nervovém systému parazita. Zástupci této skupiny působí jako agonisté acetylcholinu a patří sem levamisol, tetrahydropyrimidiny (pyrantel a morantel) a některé další strukturně příbuzné sloučeniny. Současné studie používají elektrofyziologické techniky, aby ukázaly, že povrch somatických svalových buněk nematoda má nikotinové acetylcholinové receptory, jež mohou být otevřeny pomocí nikotinových anthelmintik. Navázání těchto sloučenin na odpovídající místo excitačního receptoru vede k depolarizaci a spastické paralýze svalů červa a výsledkem je vypuzení parazita.

Nikotinový receptor obratlovců je dokonale prozkoumaný iontový kanál řízený ligandem pentamerní struktury sestavený z různých podjednotek. Detaily biochemické podstaty nikotinového receptoru u nematod zatím nebyly odhaleny, ale rysy podjednotkové sekvence a farmakologický profil tohoto kanálu se podobá receptoru u obratlovců. Selektivní toxicita sloučenin této skupiny je pravděpodobně založena na jedinečných vlastnostech nikotinového receptoru nematod, které se zdají být farmakologicky odlišné od homologních receptorů u vyšších živočichů (Köhler 2001).

### **Makrocyclické laktony**

Tato třída sloučenin zahrnuje avermektiny (např. ivermektin a doramektin) a nedávno vyvinuté milbemyctiny (moxidektin), jež postrádají glykosidickou substituci. Zástupci obou tříd antiparasitik jsou velmi účinné antinematoda, insekticidy a akaricidy. Tyto léčiva jsou široce používána k léčbě nematodóz zvířat, ale jsou to také léky volby u humánní onchocerkózy.

Makrocyclické laktony způsobují paralýzu somatické svaloviny červa a inhibují příjem potravy blokováním faryngeální pumpy. Vyhladovění červa je nematocidním účinkem těchto sloučenin. Somatická svalovina je přece jen méně citlivá k ivermektinu než farynx, proto v terapeutických koncentracích působí jako inhibitory.

Studie jasně ukázaly, že fyziologickým místem působení těchto látek je rodina glutamátových receptorů spojených s chloridovými kanály, jež jsou specifické pro bezobratlé a obsahují  $\alpha$  podjednotky. Tyto kanály jsou ionotropní inhibiční membránové proteiny, které fylogeneticky souvisí s GABA<sub>A</sub> chloridovými kanály obratlovců a jsou také tvořeny spojením podobných podjednotek. Zdá se, že ivermektin působí jako agonista glutamátu a prodlužuje otevření receptoru. Navázání ivermektinu vede k irreverzibilnímu proudění chloridových iontů, což způsobuje hyperpolarizaci buněčné membrány a paralýze svalů. Experimenty ukázaly, že místo vazající ivermektin je na  $\alpha$ -podjednotce zatímco glutamát vazající místo je lokalizováno na  $\beta$ -podjednotce. Mechanismus citlivosti ivermektinu u obličných červů je vysoce komplexní a zahrnuje souhru mezi různými  $\alpha$ -typy glutamátových kanálů jak ve faryngeálních svalech, tak v extrafaryngeálních neuronech. Selektivní účinek makrocyclických laktonů na parazita je vysvětlen působením na odlišných chloridových kanálech, které jsou jedinečné pro bezobratlé, ale chybí u obratlovců. Avšak ve vyšších koncentracích může ivermektin interagovat nejen s chloridovými kanály nematoda, ale také s GABA receptorem spojeným s chloridovým kanálem, což ukazuje, že tyto látky mohou být toxické pro obratlovce s poškozenou hematoencefalickou bariérou. Závažné CNS účinky léčby ivermektinem u obratlovců mohou být sníženy pomocí P-glykoproteinové pumpy v hematoencefalické bariéře (Köhler 2001).

### **Další anthelmintika**

Snad s výjimkou oxamnichinu a odvozených sloučenin, je mechanismus účinku méně prozkoumán než u výše zmíněných látek. Starší látka, piperazin, působí jako GABA agonista otevírající chloridové kanály přítomné na somatických svalových buňkách. Navázání na tyto receptory vede ke zvýšení propustnosti buněčné membrány pro chloridové ionty a výsledkem je relaxace svaloviny a paralýza červa. Oxamnichin působí na helminta *Schistosoma mansoni*.

Primární cíl salicylanilidů a nitrofenolů a jejich selektivní toxicita u motolic, tasemnic a krev sajících nematod není zatím zcela zřejmá. Zástupci této skupiny zasahují do tvorby ATP rozpojením mitochondriální oxidační fosforylace (Köhler 2001).

### 2.2.3.2 Další metody

Primární metodou kontrolování gastrointestinálních infekcí způsobených nematody (GIN) je použití anthelmintik, ale tato strategie vedla ke zvýšení prevalence rezistence na anthelmintika. V posledních letech byly zkoumány nové alternativy chemické kontroly GIN malých přežvýkavců zahrnující použití hub, které ničí larvy, vakcinaci proti *H. contortus* a krmení rostlinami, které obsahují kondenzované třísloviny.

Kondenzované třísloviny jsou dlouhořetězcové polyfenolické sekundární látky produkované rostlinami, které mohou vázat bílkoviny nebo jiné makromolekuly. Existuje řada zpráv o potenciálně dobrých (nízká dietní hladina kondenzovaných tříslovin) a nežádoucích (vysoká koncentrace tříslovin) nutričních účincích u zvířat krměných píci s obsahem kondenzovaných tříslovin, a to především díky vlivu těchto sloučenin na metabolismus proteinu. Jiné zprávy informují o prospěchu tříslovin, jež redukovaly u dobytka infekce oblémi červy (Shaik et al. 2006).

Již bylo provedeno několik pokusů vyvinout vakcíny k prevenci a terapeutickému řízení onemocnění, které bylo způsobeno rezistentními parazity. Byly popsány jedinečné antigenní a biochemické charakteristiky buněčné linie izolované z životaschopných *H. contortus* L<sub>3</sub> a *in vitro* rozmnožené v prostředí tkáňové kultury. Jednotlivé studie hodnotily antigenní specifickou humorální imunní odpověď, jež byla indukována po i. m. podání imunogenů vytvořenými *H. contortus* – odvozenými buněčnými liniemi (Coyne, Brake 2001).

## 2.3 REZISTENCE

Nejobektivnějším kritériem pro definování lékové rezistence druhu je jeho schopnost růst a vyvíjet se v přítomnosti takové koncentrace léčiva, které buď citlivou populaci usmrtí nebo inhibuje její růst (Stringfellow 1988).

Rezistence na anthelmintika byla poprvé popsána roku 1957 u parazita *H. contortus*, který byl vystaven prolongované fenothiazinové expozici. Rezistence se stala problémem i v novějších třídách anthelmintik. Zdá se, že se rezistence vyskytuje ve všech třídách anthelmintik používaných k léčbě nematodóz. Byla zaznamenána zkřížená rezistence i boční rezistence (Coyne, Brake 2001). Boční

rezistence znamená situaci, kdy parazité rezistentní k jednomu antihelmintiku určité chemické třídy zároveň jeví rezistenci k dalším látkám téže skupiny. Vyskytuje se například u benzimidazolů, imidothiazolů a avermektinů.

O zkřížené rezistenci mluvíme v případě, kdy je parazit rezistentní na antihelmintika z různých chemických skupin. Vyskytuje se například mezi imidothiazoly a organofosfáty (Sangster 1999).

Rozšířené používání a nevhodné dávkování anthelmintik vede ve spojení s dalšími faktory k lékové rezistenci, znamenající hrozbu léčby helmintóz. Význam a rozšíření lékové rezistence je silně spojeno s gastrointestinálními nematodózami přežvýkavců a koňů. Rezistence parazitů na anthelmintika může být také definována jako ztráta citlivosti v populaci červů, kteří byli dříve citliví na dané léčivo. V tomto procesu chemoterapie selektivně odstraňuje citlivé červy z geneticky heterogenní populace, což vede k zvýšení počtu jedinců nesoucích geny udělující lékovou rezistenci, které jsou přeneseny na potomstvo. Geny pro rezistenci se v průběhu několika generací kumulují tak, že se zvyšuje počet červů v populaci schopných přežít následující léčbu. Znalost mechanismu účinku antihelmintika a rozvoje rezistence může být využita při hledání cest k překonání parazitární rezistence nebo při vývoji nových léčiv (Köhler 2001).

Mechanismus vzniku rezistence je částečně známý u benzimidazolů, nikotinových agonistů, antiparazitik ze skupiny makrocyclických laktonů a oxamnichinu, zatímco biochemická podstata rezistence u ostatních látek (např. u praziquantelu, salicylanilidů) je zcela neznámá.

Mechanismus benzimidazolové rezistence byl intenzivně zkoumán. Zjistilo se, že rezistentní červi ztratili afinitu vazebného místa pro tyto látky na podjednotce mikrotubulu, což dokazují zkoušky s navázanými radioligandy. Studie molekulární genetiky ukázaly, že rezistence na BZ u helmintů je spojena s výběrem specifických alel jednoho nebo dvou různých izotypů  $\beta$ -tubulinu. Při experimentálním infikování ovcí za použití *H. contortus*, se vyskytla ztráta alel izotypu 1 velmi rychle a byla následována výběrem červů nesoucích delecii izotypu 2. V dalších studiích využívajících PCR techniku byl testován v izolátu z vlasovek vztah mezi BZ rezistencí a náhradou fenylalaninu za tyrosin v poloze 200 genu kódujícího  $\beta$ -tubulin. Rezistence na benzimidazoly u nematod spojena s jedinou záměnou aminokyseliny (fenylalanin za tyrosin) v pozici 200 v molekule  $\beta$ -tubulinu byla demonstrována také u jiného parazita přežvýkavců, u *Teladorsagia*



*circumcincta*. Experimentální důkazy získané z pokusů s *H. contortus* a dalšími červy z čeledi Trychostrongylidae jasně ukazují, že počáteční rezistence na BZ je spojena s bodovou mutací v  $\beta$ -tubulin izotyp 1 genu a že výsledkem další selekce je kompletní ztráta alel izotypu 2 v populaci. Pro vysokou úroveň rezistence je však třeba uvažovat o dalších mechanismech (Köhler 2001).

Biochemický mechanismus vzniku rezistence u nikotinových agonistů je, podobně jako u BZ, spojen se změnou v cílovém místě. Levamisol rezistentní červi vážou látku méně pevně než citliví jedinci. Studie ukázaly, že dochází ke změně levamisol vázačího místa na  $\beta$  podjednotce nikotinového receptoru a změna podjednotkové struktury receptoru u červů vede k rezistenci na anthelmintika ze skupiny nikotinových agonistů.

Rezistence na makrocyclické laktony je celosvětově rozšířená. Data získaná z různých studií jsou sporná a ukazují, že působení makrocyclických laktonů a mechanismu rezistence není zcela porozuměno. Byla zjištěna mutace genů kódujících  $\alpha$  podjednotku glutamátového receptoru. Dalším terčem rezistence může být P-glykoprotein, který zprostředkovává eflux léčiva.

Zdá se, že hlavním mechanismem rezistence u helmintů je ztráta receptorů nebo snížení afinity cílového místa pro léčivo (Köhler 2001).

Pro odhalení rezistence na anthelmintika u obličných červů lze použít následující metody:

- Test redukce počtu vajíček v trusu (FECRT – fecal egg count reduction test), kdy se porovnává EPG (počet vajíček v 1 g trusu) v den aplikace a o 10 – 14 dní později. Testovaná populace červů je rezistentní, jestliže je redukce EPG nižší než 95%.
- Test líhnutí larev (EHA – egg hatch assay) se používá k detekci benzimidazolové rezistence. Metoda je založena na ovocidním účinku BZ a schopnosti vajíček rezistentních kmenů líhnout se ve vyšší koncentraci BZ než je tomu u citlivých kmenů.
- Test vývinu larev (LDA – larval development assay) je spolehlivý při detekci benzimidazolové a levamisolové rezistence. Metoda je založená na schopnosti larev obličných červů přežít a vyvíjet se v prostředí s různou koncentrací anthelmintika.

Tyto testy jsou však limitovány nízkou citlivostí, vyššími náklady a jsou pracné. Naproti tomu jsou molekulární zkoušky rychlé, citlivější a levnější. Molekulární

testy detekují mutaci  $\beta$ -tubulin izotyp 1 genu v poloze 200, která je spojená s BZ rezistencí u obličných červů (Tiwari et al. 2006).

Souhrn opatření proti rezistenci vůči antihelmintikům se soustředí zejména na prevenci. Až na druhém místě jsou pokusy o zvládnutí již rozvinutého stavu. Při studiu možností prevence rezistence je nezbytné charakterizovat faktory, které působí při jejím vzniku a šíření. Těmito faktory jsou především: podávání nedostatečné dávky léčiva, vysoká frekvence dehelmintizace, kontinuální používání jednoho typu antihelmintika a přesuny zvířat nakažených rezistentními nematody (Čorba et al. 2001).

Nejdůležitějším opatřením, které zpomaluje vývoj rezistence je snížení frekvence používání antihelmintik. Toho lze docílit načasováním léčby tak, aby byla v souladu s environmentálními vlivy, které regulují rozšíření parazitů v přírodě. Úspěšnost tohoto schématu je obtížně měřitelná, protože původní rozšíření rezistence je většinou neznámé a další faktory, jako například počasí, nejsou konstantní. Tento postup zřejmě nezastaví rozvoj rezistence, ale může být efektivní v prodloužení doby účinnosti některých skupin antihelmintik (Sangster 1999).

Nejsnadněji se selekce uplatňuje při účinnosti léčiva 90-99,99%. Vyvarování se tomuto intervalu by mělo přinést výsledky. Vyšší účinnost znamená v podstatě úplné vymýcení populace a tak i rezistentních genů. Snížená účinnost pak představuje redukci selekčního tlaku (Sangster 1999).

Jednou z možností, jak zvýšit procento účinnosti nad hranici 99,99% a tak i potlačit vývoj rezistentních kmenů je používat kombinace antihelmintik. Například kombinace benzimidazolů s levamisolem byla v některých oblastech (Austrálie, Nový Zéland) dlouho používána, avšak ani tento postup rozvoji rezistence nezabránil (Waller 1994).

I přes širokou škálu antihelmintik používaných v prevenci a regulaci nálezů přežvýkavců a přes množství kontrolních programů zavedených do velkochovů stále chybí účinné opatření, které by šíření rezistence zastavilo. Jádrem problémů souvisejících s léčbou antihelmintiky je podle J. Williamse dlouhotrvající koncepce rozšířená v živočišné produkci, podle které stačí k obraně proti parazitům a jejich účinkům na hostitelský organismus používání antihelmintik. Spolu s rozvojem rezistence tento postup přináší znepokojení v oblasti environmentální toxicity,

tkáňových reziduí a nadměrných finančních investicích do vývoje nových antiparazitárních léčiv. Pokroky byly učiněny ve výzkumu alternativních metod ochrany před helminty, například použití vakcín, selekce odolných chovných kusů, regulátory růstu nematod (Williams 1997).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo:

- 1) Připravit subcelulární frakce homogenátu vlasovek slézových.
- 2) Studovat metabolismus flubendazolu, lokalizovat a charakterizovat enzymy metabolizující flubendazol a stanovit kinetické parametry.
- 3) Stanovit aktivity oxidačních, redukčních a konjugačních enzymů vůči modelovým xenobiotikům.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL

#### 4.1.1 Chemikálie

- 1-chlor-2,4-dinitrobenzen
- Acenaphtenol
- Albendazol
- Albendazolsulfoxid
- Daunorubicin
- Dimethylsulfoxid
- DL-glyceraldehyd
- Draselno-fosfátový pufr 0,1 M pH 6,0
- Flubendazol
- Flubendazol redukovaný
- Glutathion redukovaný
- Hovězí sérový albumin (BSA)
- Metyrapon
- $MgCl_2$  0,1 M
- NADPH
- Oracin
- Pentoxyresorufin (PROD)
- p-nitrofenol
- Tris pufr 0,1 M pH 8,9
- Tris-HCl pufr 0,1 M pH 7,4
- Tris-HCl pufr 0,2 M pH 8,5
- UDP-glukuronová kyselina

### 4.1.2 Přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- Concentrator 5301
- Čtečka Biorad, Microplate Leader, model 550
- Digitální pH – metr Jenway LTD 3020
- Laboratorní magnetická míchačka IKA Color Squid HytreI HTR 8068
- Laboratorní předvážky OWA Labor
- Luminiscenční spektrofotometr Perkin Elmer LS 50 B
- Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf
- Ultracentrifuga Sorvall OTD Combi
- Ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus Bandelin HD 2070
- UV – VIS spektrofotometr Unicam Helios  $\beta$
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC)

### 4.1.3 Biologický materiál

Jehňata ovce domácí (cca 2- 3 měsíce stará) byla infikována p.o. suspenzí s 5000 larvami L3 *H. contortus*. Po 6 týdnech byla jehňata usmrcena a slézy s vlasovkami převezeny do laboratoře. K získání živých dospělých vlasovek byla využita metoda agarových sít. Získané vlasovky byly opakovaně promyty fyziologickým roztokem (37°C) a následně zamraženy v hlubokomrazícím boxu na -80°C.

## **4.2 PRACOVNÍ POSTUP**

### **4.2.1 Příprava pufrů a médií**

#### ***Sodnofosfátový pufr 0,1M pH 7,4***

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

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

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

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

Navážka 2,42 g trishydroxymethylaminomethanu byla rozpuštěna ve 100 ml redestilované vody a pH upraveno přiléváním 0,2 M HCl na 8,5 za kontroly na pH-metru.

#### ***Tris-HCl pufr 0,1M 8,9***

Navážka 1,21 g trishydroxymethylaminomethanu byla rozpuštěna ve 100 ml redestilované vody a pH upraveno přiléváním 0,1 M HCl na 8,9 za kontroly na pH-metru.

#### ***Draselnofosfátový pufr 0,1M pH 6,0***

Nejprve byly připraveny jednotlivé složky: 0,1M roztok hydrogenfosforečnanu draselného a 0,1M roztok dihydrogenfosforečnanu draselného. Za stálého míchání a kontroly pH byly tyto roztoky slévány až bylo dosaženo požadované hodnoty pH 6,0.

### ***Fosfátový pufr 0,1M pH 6,5***

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

### ***Roztoky k experimentům in vitro***

Dále byl použit roztok FLU-redukovaný o koncentraci 10 $\mu\text{M}$ . Byl připraven roztok o koncentraci 1 mM rozpuštěním navážky FLU-redukovaného 3,15 mg v 10ml DMSO.

### ***Roztoky ke stanovení kinetických parametrů redukce FLU***

Pro stanovení kinetických parametrů redukce FLU bylo potřeba 6 roztoků o koncentracích 25, 50, 100, 250, 500, 1000 a 2500 $\mu\text{M}$ . Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10mM. Navážka FLU 3,134 mg byla rozpuštěna v 1ml DMSO.

Smísením 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku s 300  $\mu\text{l}$  DMSO vznikl roztok A o koncentraci 2,5mM (koncentrace v RM 25 $\mu\text{M}$ ).

Roztok B o koncentraci 1mM byl získán smísením 200  $\mu\text{l}$  roztoku A s 300  $\mu\text{l}$  DMSO (v RM 10 $\mu\text{M}$ ).

Roztok C o koncentraci 0,5mM byl připraven smísením 50 $\mu\text{l}$  roztoku A s 200  $\mu\text{l}$  DMSO (v RM 5 $\mu\text{M}$ ).



Roztok D o koncentraci 250 $\mu$ M byl připraven smísením 50 $\mu$ l roztoku A s 450  $\mu$ l DMSO (v RM 2,5 $\mu$ M).

Roztok E o koncentraci 100 $\mu$ M byl připraven smísením 50 $\mu$ l roztoku B s 450  $\mu$ l DMSO (v RM 1 $\mu$ M).

Roztok F o koncentraci 50 $\mu$ M vznikl smísením 100 $\mu$ l roztoku E se 100 $\mu$ l DMSO (v RM 0,5 $\mu$ M).

Roztok G o koncentraci 25 $\mu$ M vznikl smísením 100  $\mu$ l roztoku E s 300  $\mu$ l DMSO (v RM 0,25 $\mu$ M).

#### 4.2.2. Příprava subcelulárních frakcí

Vlasovky byly rozváženy po stejných dílech, bylo přidáno 12 ml 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4 a byla provedena homogenizace za snížené teploty ve skleněném homogenizátoru rotujícím pístem a sonikace ultrazvukovým hrotem (Sono puls). Homogenát byl přelit do kyvet a provedla se první centrifugace (centrifuga Heraeus, program 3, tj. 20 min. na 5000 g při 4°C). Supernatant byl přelit do čistých kyvet a byla provedena centrifugace na 20 000 g, po dobu 60 min. při 4°C (program 4) v téže centrifuze.

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

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

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

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

### 4.2.3 BCA stanovení bílkoviny

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

Byly připraveny roztoky:

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

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

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

#### Kalibrační křivka:

Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). V den potřeby byl připraven 1% roztok (0,25025 g BSA se doplnilo do 25 ml redestilovanou vodou). Z tohoto základního roztoku bylo naředěním připraveno šest roztoků (viz tabulka 2), které byly použity pro sestavení kalibrační křivky.

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

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

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

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

## 4.2.4 Sledování metabolismu FLU u vlasovky slezové *in vitro*

### 4.2.4.1. Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi

Frakce A,B,C byly inkubovány s flubendazolem a koenzymy NADH nebo NADPH. Současně byly připraveny slepé vzorky, a to se subcelulárními frakcemi inaktivovanými varem nebo bez biologického materiálu nebo bez substrátu.

Inkubační směs obsahovala: 3  $\mu$ l FLU

50  $\mu$ l biologického materiálu (frakce A, B, C)

100  $\mu$ l vodného roztoku NADH nebo NADPH

147  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,4

Celkový objem reakční směsi byl 300  $\mu$ l v každé mikrozkušavce.

Inkubace probíhala 30 min. při 37°C.

### 4.2.4.2 Inkubace redukováného FLU se subcelulárními frakcemi

Všechny tři frakce byly inkubovány s 10 $\mu$ M substrátem redukováným flubendazolem za přítomnosti NADPH v prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Byly provedeny vždy tři paralelní stanovení.

Inkubační směs obsahovala: 3  $\mu$ l roztoku redukováného FLU

97  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,4

100  $\mu$ l biologického materiálu (frakce A, B, C)

100 $\mu$ l vodného roztoku NADPH

Celkový objem inkubační směsi byl 300 $\mu$ l v každé mikrozkušavce.

Byly provedeny i inkubace slepých vzorků. Bylo smíseno 100 $\mu$ l biologického materiálu s 200 $\mu$ l pufru bez přítomnosti substrátu (od každé frakce jedno stanovení). Dále byl připraven slepý vzorek s obsahem 3 $\mu$ l roztoku redukováného

flubendazolu (o koncentraci 10 $\mu$ M) se 100 $\mu$ l roztoku NADPH a 197 $\mu$ l pufru, tedy bez obsahu biologického materiálu.

Inkubace probíhala v plastových mikrozkušavkách 60 minut při teplotě 37°C. Čas začal být měřen po přidání biologického materiálu do směsi.

#### **4.2.4.3 Stanovení kinetických parametrů redukce FLU ve frakci B**

Frakce B byla inkubována s flubendazolem, bylo vybráno šest koncentrací substrátu, přičemž od každé koncentrace proběhly čtyři paralelní inkubace.

Reakční směs obsahovala:

- 3  $\mu$ l substrátu
- 97  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,4
- 100  $\mu$ l biologického materiálu (frakce B)
- 100  $\mu$ l NADPH

Celkový objem reakční směsi byl 300  $\mu$ l v každé mikrozkušavce.

Byly inkubovány i slepé vzorky. Při jejich přípravě byl biologický materiál nahrazen pufrem. Od každé koncentrace substrátu byl inkubován jeden slepý vzorek. Byl také inkubován chemicky slepý vzorek (bez substrátu) s obsahem frakce B.

Vzorky byly inkubovány 60 min při 37°C.

#### **4.2.4.4 Extrakce**

Inkubace byla ukončena přidáním 30 $\mu$ l amoniaku. Ke směsi bylo přidáno 0,7 ml octanu ethylnatého a intenzivně třepáno 3 minuty na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách, poté bylo 600  $\mu$ l organické fáze přeneseno do připravené vialky a extrakt odpařen v koncentrátoru. Suché vzorky byly uschovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí HPLC.

#### **4.2.4.5 HPLC analýza**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie probíhala na Shimadzu LC chromatografu.

##### HPLC podmínky:

Autosampler:	SIL-10ADVP
Kolona:	LiChroCART 250x3 mm
Náplň:	LiChrospher 60 RP-select B (5 um)
Detektor:	spektrofluorimetrický RF-10AXL
Detekce:	$E_{ex} = 290 \text{ nm}$ $E_{em} = 320 \text{ nm}$
Mobilní fáze :	ACN : 0,025M fosfátový pufr (pH 3,07) = 3:7 (v/v)
Průtok mobilní fáze:	$0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
Nástřik:	50 ul
Čas:	25 min

### **4.2.5 Stanovení aktivity oxidačních biotransformačních enzymů**

#### **4.2.5.1 Stanovení aktivity pentoxyresorufindepentylasy (PROD)**

Metoda PROD se využívá ke stanovení aktivity isoformem CYP2B. Je založena na přidání substrátu petoxyresorufinu, relativně specifického pro tuto podrodinu, k mikrosomální frakci. CYP2B oxidačně dealkyluje tento substrát na fluoreskující produkt – resorufin a přírůstek fluorescence je měřen na spektrofluorimetru.

##### Reakční směs:

- 885  $\mu\text{l}$  pufr 0,1 M Tris-HCl pH 7,4
- 50  $\mu\text{l}$  kofaktor 0,1 M  $\text{MgCl}_2$
- 5  $\mu\text{l}$  substrát 0,5 mM v DMSO (dimethylsulfoxid)
- 10  $\mu\text{l}$  NADPH 50 mM v Tris pufru (0,4 mg NADPH/vzorek)

- 50 µl frakce A, resp. C
- 10 µl standardní přídavek resorufinu 0,34 µM

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml.

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

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

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

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

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

Pro výpočet aktivity platí vzorec:

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

a...aktivita

k...směrnice

A...intenzita fluorescence na začátku přídavku resorufinu

B...intenzita fluorescence na konci přídavku resorufinu

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

D...zředění

60..přepočet na minuty

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

#### **4.2.5.2 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)**

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

##### **Reakční směs:**

- 885  $\mu$ l pufr 0,1 M Tris-HCl pH 7,4
- 50  $\mu$ l kofaktor 0,1 M  $MgCl_2$
- 5  $\mu$ l substrát 0,5 mM v DMSO (dimethylsulfoxid)
- 10  $\mu$ l NADPH 50 mM v Tris pufru (0,4 mg NADPH/vzorek)
- 50  $\mu$ l frakce A, resp. C
- 10  $\mu$ l standardní přídavek resorufinu 0,34  $\mu$ M

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml.

Před vlastním měřením bylo nutno nastavit parametry na přístroji. Byly nastaveny parametry stejné jako při měření PROD (viz kap. 4.2.7.1).

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

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

Do kyvety byl napipetován pufr, kofaktor, specifický substrát a frakce A nebo C a byl spuštěn záznam na fluorimetru. Po 50 s byl do kyvety přidán NADPH, který spustil enzymovou reakci. Po 150 s byl do kyvety připipetován standardní přídavek resorufinu. Před měřením dalšího vzorku byl obsah kyvety odsát a kyveta byla



propláchnuta destilovanou vodou. Bylo provedeno měření tří paralelních vzorků pro frakci A a jedno měření pro frakci C.

Pro výpočet aktivity platí vzorec:

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

a...aktivita

k...směrnice

A...intenzita fluorescence na začátku přidavku resorufinu

B...intenzita fluorescence na konci přidavku resorufinu

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

D...zředění

60..přepočet na minuty

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

## **4.2.6 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<sup>+</sup> ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty (25°C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/NADP<sup>+</sup>  $\epsilon=6270 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reduktas.

Reakční směs v kyvetě: 930  $\mu\text{l}$  draselno-fosfátového pufru (0,1 M, pH 6,0)  
10  $\mu\text{l}$  substrátu (1 mM)  
10  $\mu\text{l}$  NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM  
50  $\mu\text{l}$  enzymu (frakce A, B nebo C)

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

#### **4.2.6.2. Stanovení kinetických parametrů redukce metyraponu ve frakci B**

Stanovení aktivity metyraponreduktas 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: Draselno-fosfátový pufr (0,1 M, pH 6,0)  
Substrátu (1 mM)  
NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM  
Frakce B

Objem reakční směsi v kyvetě byl vždy 1 ml. Byl napipetován pufr, NADPH a frakce B, směs byla protřepána na třepačce a byl připipetován substrát ve vzrůstající koncentraci (0,2 – 1,6 mM). Po promíchání byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios  $\beta$  při 340 nm. Byly měřeny tři paralelní vzorky.

Pro sestavení grafu a vypočtení kinetických parametrů byl použit program GraphPadPrism 4.

#### **4.2.6.3 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 6,0)**

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

Reakční směs v kyvetě: 930  $\mu\text{l}$  draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)  
10  $\mu\text{l}$  substrátu (0,01 mM)  
10  $\mu\text{l}$  NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM  
50  $\mu\text{l}$  enzymu (frakce A, B nebo C)

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

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

#### **4.2.6.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu**

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

Reakční směs v kyvetě: 930  $\mu\text{l}$  draselno-fosfátového pufru (0,1 M; pH 6,0)  
10 $\mu\text{l}$  substrátu (10 mM) – zásobní roztok 1 M  
10 $\mu\text{l}$  NADPH (0,3 mM) – zásobní roztok 30 mM  
50 $\mu\text{l}$  enzymu (frakce A, B nebo C)

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

#### **4.2.6.5 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu (pH 8,5)**

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

Reakční směs v kyvetě: 930  $\mu\text{l}$  TRIS – HCl pufru (0,2 M; pH 8,5)  
10  $\mu\text{l}$  substrátu (0,01mM)  
10  $\mu\text{l}$  NADPH (0,1 mM) – zásobní roztok 10 mM  
50  $\mu\text{l}$  enzymu (frakce A, B nebo C)

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

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

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

#### **4.2.6.6 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu**

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

Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala:

- 0,4  $\mu\text{mol}$  (0,15 mg) oracinu
- 0,6  $\mu\text{mol}$  NADPH
- 0,1 ml frakce B, resp. C

Do označených mikrozkušavek bylo napipetováno

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

Směs byla preinkubována 5 minut při 37°C. Poté bylo do mikrozkušavek připipetováno 0,1 ml frakce B, příp. C a reakční směs byla promíchána. Inkubace (při 37°C) byla ukončena po 30 minutách ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni a přidáním 30  $\mu\text{l}$  amoniaku naředěného 1:3 redestilovanou vodou o pH 10,5 – 10,8. Ke směsi bylo přidáno 0,7 ml octanu ethylnatého a intenzivně třepáno 2 minuty na třepačce. Mikrozkušavky byly vloženy do centrifugy. Centrifugace probíhala 3 minuty při 5000 otáčkách, poté byla horní vrstva byla přenesena do připravené vialky. Vytřepávání bylo zopakováno a spojené extrakty byly odpařeny v koncentrátoru. Suché vzorky byly uschovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí HPLC.

#### HPLC podmínky:

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

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

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita

x..... množství dihydrooracinu ve vzorku

30....doba inkubace

D.... zředění

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

#### **4.2.7 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu**

Stanovení aktivity acenaftenoldehydrogenas je založeno na měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP<sup>+</sup> na NADPH ve vzorku při 340 nm za laboratorní teploty.

Reakční směs v kyvetě: 930  $\mu$ l TRIS pufru (0,1 M; pH 8,9)  
10  $\mu$ l substrátu (1mM) – zásobní roztok 0,1M  
10  $\mu$ l NADP<sup>+</sup> (1 mM) – zásobní roztok 100 mM  
50  $\mu$ l enzymu (frakce A, B nebo C)

Celkový objem v kyvetě byl 1 ml. Pro stanovení byl použit TRIS pufr (0,1 M; pH 8,9). Zásobním roztokem substrátu byl 0,1 M roztok acenaftenolu ( $M_r = 170,2$ ) v DMSO.

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

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

## **4.2.8 Stanovení aktivity konjugačních enzymů**

### **4.2.8.1 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)**

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

#### Reakční směs:

- Substrát: 30  $\mu$ l p-nitrofenol (0,556 mM). Navážka 1,16 mg byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna v 15,00 ml redestilované vody.
- Konjugační činidlo: 30  $\mu$ l UDP-glukuronová kyselina. Navážka 1,05 mg byla rozpištěna v 1,5 ml redestilované vody.
- 20  $\mu$ l TRIS pufr pH 7,4.

- 20 µl enzymu
- Detergent: neionogenní detergent pro aktivaci UGT, pipetovaný objem byl vypočten podle koncentrace proteinu ve vzorku. Byl zvolen poměr detergent : protein (w/w) 1 : 2

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

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

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita

A..... absorbance

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

D..... zředění ve vzorku

30.... doba inkubace (min)

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



#### **4.2.8.2 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)**

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

##### Reakční směs:

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

Objem reakční směsi v kyvetě byl vždy 1 ml. Byl napipetován pufr, glutathion a frakce B, směs byla protřepána na třepačce a byl připipetován substrát. Po promíchání byla měřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru Helios  $\beta$  při 340 nm. Byly měřeny 3 paralelní vzorky. Frakci B bylo nutné naředit, protože absorbance přesahovala hodnotu 0,800. Byla sledována linearita měření a hodnota absorbance se odečítala po 30, 60, 90 a 120 sekundách. Pro výpočet aktivity enzymu byl použit rozdíl absorbancí naměřených v 30 a 90 sekundách. Od tohoto rozdílu byla odečtena hodnota absorbance slepého vzorku. Pro výpočet aktivity byl použit extinční koeficient S-2,4-dinitrofenylglutathionu.

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita

A..... absorbance

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

D..... zředění

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

#### **4.2.8.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy**

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

##### Reakční směs:

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

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

Aktivita byla vypočtena podle vzorce:

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

a..... aktivita

A..... absorbance

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

D..... zředění

Pro sestavení grafu a vypočtení kinetických parametrů byl použit program GraphPadPrism 4.

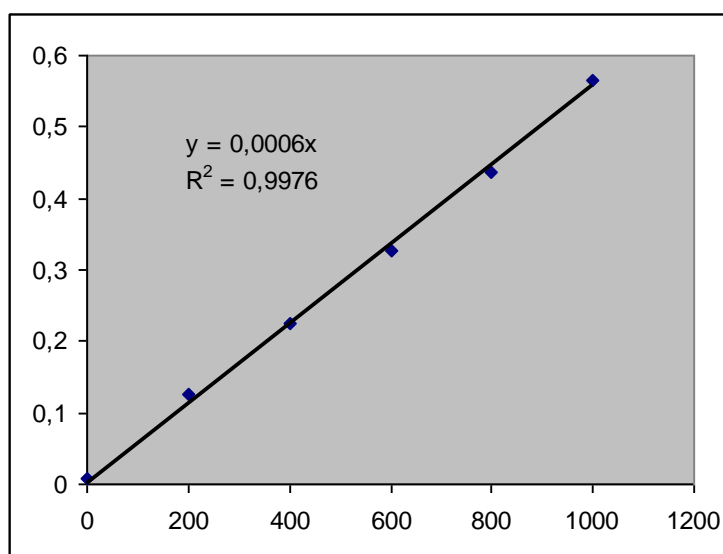
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Stanovení koncentrace bílkoviny

Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích získaných z vlasovek byla stanovena pomocí metody BCA stanovení (viz kapitola 4.2.2). Nejprve byla sestrojena kalibrační přímka pomocí standardního roztoku hovězího sérového albuminu. Kalibrační přímka byla sestrojena metodou lineární regrese (obr. 5).

#### Kalibrační křivka:

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



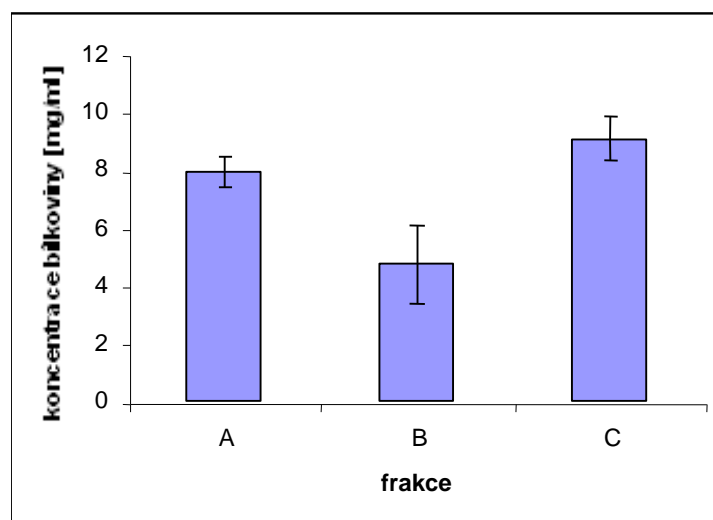
Obr. 5: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny.

U jednotlivých vzorků byla proměřena absorbance, od těchto naměřených hodnot odečtena absorbance slepého vzorku a z kalibrační přímky zjištěny hodnoty koncentrace bílkoviny ve frakci A, B, C (tab. 3).

Tab. 3: Koncentrace bílkoviny ve frakci A, B, C získaných z vlasovek (rovnice kalibrační přímky je  $y = 0,0006x$ ).

Frakce	Koncentrace bílkoviny [mg/ml]*
<b>A</b>	7,97 ± 0,52
<b>B</b>	4,82 ± 1,34
<b>C</b>	9,11 ± 0,75

\* - průměr z osmi měření



Obr. 6: Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích.

## **5.2 Sledování metabolismu FLU u vlasovky slezové *in vitro***

### **5.2.1 Inkubace FLU se subcelulárními frakcemi**

Frakce A, B, C byly inkubovány s flubendazolem a koenzymy NADH nebo NADPH. Současně byly připraveny slepé vzorky, a to se subcelulárními frakcemi inaktivovanými varem nebo bez biologického materiálu nebo bez substrátu (viz

kap. 4.2.4.1). Po následné extrakci inkubátu bylo pomocí HPLC stanoveno množství parentní látky a dvou hlavních metabolitů.

Byl nalezen pouze redukovaný flubendazol ve frakci B při inkubaci s NADPH, výsledky jsou v tab. 4. V žádné frakci nevznikal desethylkarboxyflubendazol.

Tab. 4: Specifická aktivita enzymu metabolizujícího flubendazol na redukovaný metabolit ve frakci B.

<b>Aktivita Frakce B [pmol/min/mg]</b>	
Vzorek 1	2,83
Vzorek 2	5,12
Vzorek 3	5,19
<b>průměr</b>	<b>4,38</b>
<b>smodch.</b>	<b>1,34</b>

## 5.2.2 Inkubace red. FLU se subcelulárními frakcemi

Jednotlivé frakce homogenátu vlasovek byly inkubovány se substrátem (redukovaný flubendazol 10 $\mu$ M) a koenzymem NADPH v prostředí pufru pH 7,4 (viz kap. 4.2.4.2). Po skončení inkubace byly v extraktu inkubátů změřeny koncentrace FLU. Výsledky jsou v tabulce 5.

Tab. 5: Srovnání biotransformace FLU v jednotlivých frakcích vlasovek

	<b>Koncentrace FLU [<math>\mu</math>M]</b>	<b>Specifická aktivita [nmol/min/mg]</b>
<b>Frakce A</b>	ND	ND
<b>Frakce B</b>	0,89 $\pm$ 0,59	0,31 $\pm$ 0,2
<b>Frakce C</b>	ND	ND

### 5.2.3 Stanovení kinetických parametrů FLU ve frakci B

Frakce B byla inkubována s flubendazolem, a to v koncentracích 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25  $\mu\text{M}$  a s NADPH. Po následné extrakci inkubátu bylo pomocí HPLC stanoveno množství redukovaného flubendazolu (viz kap. 4.2.4.3).

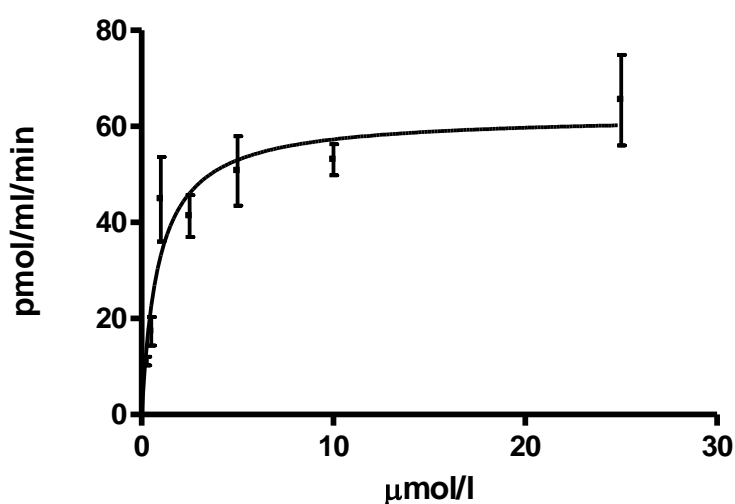
V tabulce 6 jsou vypočteny specifické aktivity enzymu redukujícího FLU pro jednotlivé koncentrace substrátu a na obr.7 je pak znázorněn graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci FLU.

Pomocí programu GraphPad Prism 4 byla zjištěna hodnota maximální rychlosti  $V_{\text{max}} = 62,37 \pm 4,7$  pmol/ml/min a Michaelisova konstanta  $K_M = 0,88 \pm 0,27$   $\mu\text{M}$ .

Tab. 6: Koncentrace redukovaného FLU a specifická aktivita ve frakci B

Koncentrace substrátu [ $\mu\text{M}$ ]	Koncentrace red.FLU [nM] *	Aktivita [pmol/ml/min] *
0,25	6,67 $\pm$ 1,1	11,12 $\pm$ 1,8
0,5	10,39 $\pm$ 3,5	17,32 $\pm$ 5,9
1	26,9 $\pm$ 10,5	44,83 $\pm$ 17,6
2,5	24,79 $\pm$ 5,2	41,32 $\pm$ 8,7
5	30,44 $\pm$ 7,5	50,73 $\pm$ 12,5
10	31,83 $\pm$ 3,9	53,06 $\pm$ 6,5
25	39,28 $\pm$ 11,3	65,47 $\pm$ 18,8

\* - průměr ze čtyř měření se směrodatnou odchylkou



Obr. 7: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.

## **5.3 Stanovení aktivity oxidačních enzymů**

### **5.3.1 Stanovení aktivity pentoxyresorufin-O-depentylasy (PROD)**

Ke stanovení aktivity pentoxyresorufin-O-depentylasy (PROD) byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídávkem resorufinu (viz kapitola 4.2.5.1). Aktivita enzymů byla stanovována ve frakci A a C.

Tab. 7: Specifická aktivita PROD ve frakci A [pmol/min/mg]

<b>Vzorek</b>	<b>Specifická aktivita [pmol/min/mg]</b>
1	0,51
2	1,12
3	0,08
<b>Průměr</b>	<b>0,57</b>
<b>Smodch.</b>	<b>0,52</b>

Vzhledem k omezenému množství biologického materiálu bylo provedeno pouze jedno měření pro frakci C. V této frakci byla zjištěna specifická aktivita **0,56 pmol/mg/min.**

### **5.3.2 Stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD)**

Ke stanovení aktivity ethoxyresorufin-O-dealkylasy (EROD) byla použita spektrofluorimetrická metoda se standardním přídávkem resorufinu (viz kapitola 4.2.5.2).

Nebyla nalezena aktivita EROD ani ve frakci A ani ve frakci C.

## **5.4 Stanovení aktivity redukčních enzymů**

Ke stanovení aktivit reduktas metyraponu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu při pH 6,0 a 8,5 byla použita spektrofotometrická metoda měření absorbance vždy ve čtyřech paralelních vzorcích. K měření byla použity jednotlivé frakce A, B, C (viz kapitola 4.2.6). Aktivita byla vyjádřena v  $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  a vztažením na mg bílkoviny jako specifická aktivita.

### **5.4.1 Stanovení aktivity reduktas metyraponu**

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

Tab. 8: Specifická aktivita reduktas metyraponu ve frakci B [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

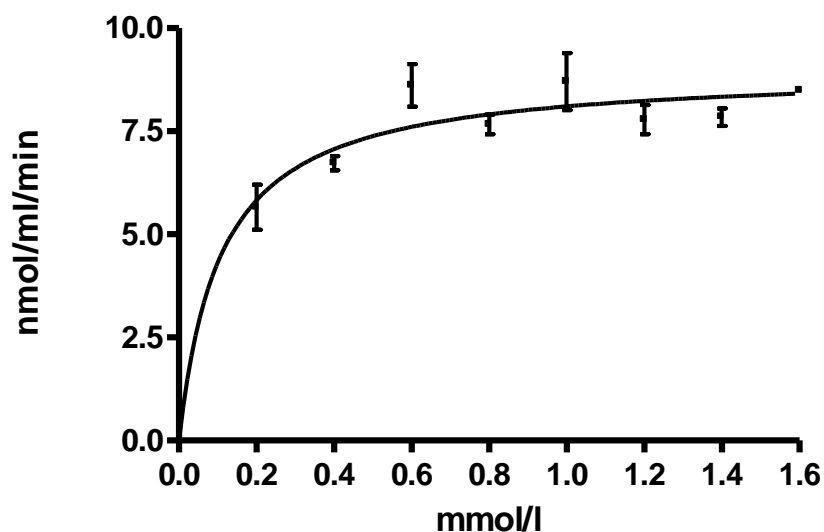
<b>Vzorek</b>	<b>Specifická aktivita [nmol/min/mg]</b>
1	0,99
2	1,65
3	0,83
4	0,83
<b>Průměr</b>	<b>1,07</b>
<b>Smodch</b>	<b>0,39</b>

Ve frakci A a ve frakci C nebyla aktivita reduktas metyraponu detekována.

### **5.4.2 Stanovení kinetických parametrů redukce metyraponu ve frakci B**

Ve frakci B byla sledována kinetika metyraponreduktasy v rozmezí koncentrací 0,2 – 1,6 mM.





Obr. 8: Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.

Zdánlivá Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) a maximální rychlost ( $V_{max}$ ) byly vypočteny podle rovnice Michaelise a Mentenové. Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu je na obr. 8. Z grafu byla odečtena hodnota  $V_{max}$   $8,98 \pm 0,36$  nmol/ml/min a hodnota  $K_m$  je  $0,11 \pm 0,03$  mM.

### 5.4.3 Stanovení aktivity reductas daunorubicinu pH 6,0

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

Tab. 9: Specifická aktivita reductas daunorubicinu při pH 6,0 ve frakci B [ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]

Vzorek	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
1	0,33
2	0,33
3	0,17
4	0,33
<b>průměr</b>	<b>0,29</b>
<b>smodch</b>	<b>0,08</b>

Ve frakci A a C nebyla aktivita daunorubicinreduktasy při pH 6,0 nalezena.

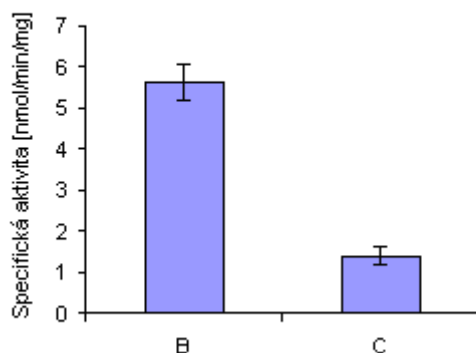
#### 5.4.4 Stanovení aktivity reduktas DL-glyceraldehydu

Aktivita reduktas DL-glyceraldehydu (10mM) byla měřena spektrofotometricky při pH 6,0.

Tab. 10: Specifická aktivita reduktas DL-glyceraldehydu [nmol/min/mg]

Specifická aktivita		Specifická Aktivita	
Frakce B	[nmol/min/mg]	Frakce C	[nmol/min/mg]
1	6,12	1	1,66
2	5,12	2	1,49
3	5,79	3	1,22
4	5,45	4	1,23
<b>průměr</b>	<b>5,62</b>	<b>průměr</b>	<b>1,40</b>
<b>smodch</b>	<b>0,43</b>	<b>smodch</b>	<b>0,21</b>

Ve frakci A nebyla aktivita nalezena.



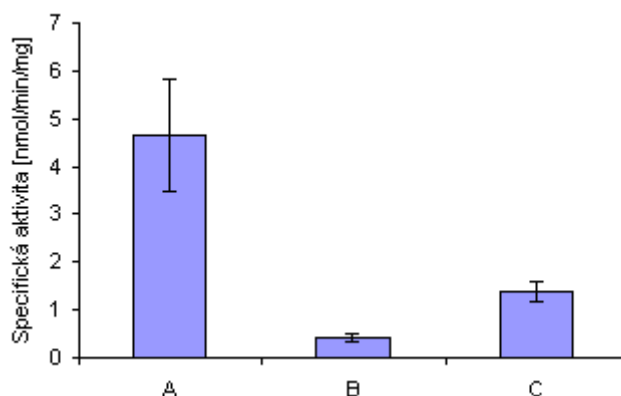
Obr. 9: Porovnání specifické aktivity redukce DL-glyceraldehydreduktasy ve frakci B a C.

### 5.4.5 Stanovení aktivity reduktas daunorubicinu pH 8,5

Aktivita aldehydreduktasy (EC 1.1.1.2) vůči daunorubicinu (0,01mM) byla měřena v prostředí pH 8,5. Naměřené hodnoty jsou zaneseny v tabulce 11.

Tab. 11: Specifická aktivita reduktas daunorubicinu při pH 8,5 [nmol/min/mg]

Frakce A	Specifická aktivita	Frakce B	Specifická aktivita	Frakce C	Specifická aktivita
1	6,40	1	0,49	1	2,28
2	4,30	2	0,33	2	1,75
3	4,10	3	0,33	3	1,75
4	3,80	4	0,49	4	1,49
<b>průměr</b>	<b>4,65</b>		<b>0,41</b>		<b>1,82</b>
<b>smodch</b>	<b>1,18</b>		<b>0,09</b>		<b>0,33</b>



Obr. 10: Porovnání specifické aktivity redukce daunorubicinu při pH 8,5 v jednotlivých frakcích.

### 5.4.6 Stanovení redukční aktivity pomocí oracinu

Metoda je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s oracinem a následné extrakci a HPLC stanovení jeho metabolitu dihydrooracinu (viz kapitola 4.2.6.6). Byla použita frakce B a frakce C.

Ve frakci B byla sledována aktivita karbonylreduktasy a ve frakci C aktivita 11 $\beta$ -HSD 1 vůči oracinu.

Tab. 12: Specifická aktivita reduktas oracinu ve frakci B a C

<b>Frakce</b>	<b>Specifická aktivita [pmol/min/mg]</b>
B	50,44 $\pm$ 1,2
C	7,09 $\pm$ 0,7

## **5.5 Stanovení aktivity dehydrogenas acenaftenolu**

Aktivita dehydrogenas acenaftenolu byla stanovena spektrofotometricky v prostředí pH 8,9. Metoda je založena na měření přírůstku absorbance způsobeném přeměnou NADP<sup>+</sup> na NADPH (viz kap. 4.2.7).

Tab. 13: Specifická aktivita dehydrogenas acenaftenolu ve frakci B [nmol/min/mg]

<b>Vzorek</b>	<b>Specifická aktivita [nmol/min/mg]</b>
1	2,15
2	2,64
3	2,97
4	3,14
<b>průměr</b>	<b>2,72</b>
<b>smodch</b>	<b>0,43</b>

Ve frakci A a C nebyla aktivita acenaftenolreduktas detekována.

## **5.6 Stanovení aktivity konjugačních enzymů**

### **5.6.1 Stanovení aktivity UGT**

Ke stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenolglukuronid v jednotlivých frakcích (viz kapitola 4.2.8.1).

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

Tab. 14: Specifická aktivita UGT ve frakci C [ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

<b>Vzorek</b>	<b>Specifická aktivita [nmol/min/mg]</b>
1	1,13
2	1,02
3	1,11
4	1,16
<b>průměr</b>	<b>1,1</b>
<b>smodch</b>	<b>0,06</b>

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

### **5.6.2 Stanovení aktivity GST**

Ke stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu (viz kapitola 4.2.8.2).

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

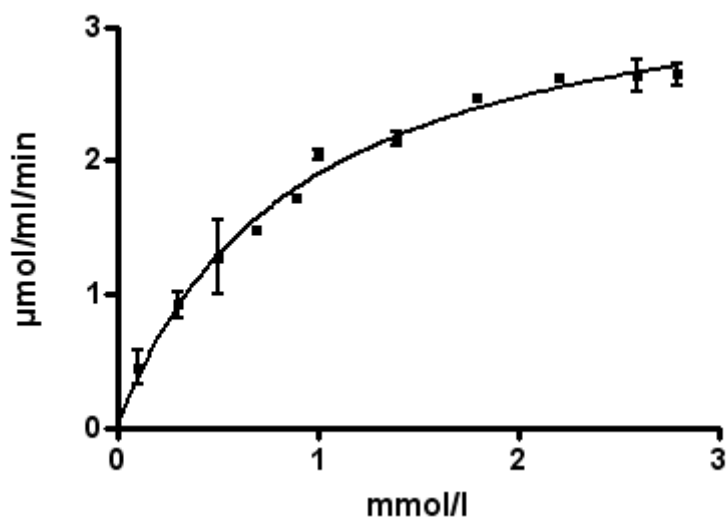
Tab. 15: Specifická aktivita GST ve frakci B [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]

Vzorek	Specifická aktivita [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ]
1	0,38
2	0,37
3	0,37
4	0,37
<b>průměr</b>	<b>0,37</b>
<b>smodch</b>	<b>0,005</b>

### 5.6.3 Stanovení kinetických parametrů glutathion-S-transferasy

Ke stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST) byla použita spektrofotometrická metoda stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu. Aktivita GST byla stanovována ve frakci B (viz kapitola 4.2.8.3).

Kinetika glutathion-S-transferasy ve frakci B byla studována v rozmezí koncentrací substrátu 0,1 – 3,0 mM. Zdánlivá Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) a maximální rychlost ( $V_{max}$ ) byly vypočteny podle rovnice Michaelise a Mentenové. Graf závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu je na obr. Z grafu byla odečtena hodnota  $V_{max}$   $3,44 \pm 0,16 \mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$  a hodnota  $K_m$  je  $0,82 \pm 0,10 \text{ mM}$ .



Obr. 11: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu

## 6. DISKUSE

Cílem této práce bylo zjistit, zda je vlasovka slezová schopna biotransformovat xenobiotika. Testování probíhalo *in vitro* v subcelulárních frakcích homogenátu vlasovek. Byla sledována biotransformace antihelmintika flubendazolu (FLU) a jeho metabolitu redukovaného flubendazolu (FLU-red.) vlasovkou slezovou. Dále byly sledovány oxidační přeměny xenobiotik, redukce karbonylové skupiny xenobiotik a konjugace xenobiotik s kyselinou glukuronovou a glutathionem. Jako modelové substráty byly využity látky, jejichž metabolické přeměny se běžně používají k testování aktivit určitých biotransformačních enzymů u lidí, laboratorních a hospodářských zvířat.

K pokusům byly použity subcelulární frakce A, B, C vlasovek. Izolace jednotlivých frakcí je založena na ultracentrifugaci homogenátu vlasovek. Frakce A při přípravě subcelulárních frakcí homogenátu tkání obsahuje především mitochondrie, frakce B převážně cytosol a frakce C především mikrosomy.

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

Cílem experimentu bylo zjistit, zda dochází k biotransformaci substrátu FLU a jak se na tomto procesu podílejí jednotlivé frakce. Při inkubaci frakcí s FLU byla naměřena aktivita jen ve frakci B, a to v přítomnosti NADPH jako kofaktoru enzymové reakce, vznikal jediný metabolit - redukovaný flubendazol. Ve frakci A a C nebyla aktivita zjištěna, stejně tak ani ve frakci B za použití NADH. Desethylkarboxyflubendazol, významný metabolit vznikající při biotransformaci FLU u prasat a drůbeže, nebyl v žádné frakci vlasovky detekován. Parazit je tedy schopen deaktivovat FLU redukcí karbonylové skupiny, přičemž se na této deaktivaci podílí enzymy frakce B (cytosol) a reakce je striktně NADPH dependentní. Cílem sledování biotransformace FLU ve frakci B v závislosti na koncentraci substrátu bylo stanovení kinetických parametrů redukce FLU – Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti. Byla zjištěna  $V_{\max} = 62,37 \pm 4,7$  pmol/ml/min a  $K_M = 0,88 \pm 0,27$   $\mu$ M.

Tato *in-vitro* studie dokázala, že vlasovky jsou schopny účinně biotransformovat flubendazol, což může být jeden z důvodů snížené účinnosti tohoto léčiva u *H. contortus*.

Dále byla provedena inkubace jednotlivých frakcí s FLU red. Cílem bylo zjistit, zda jsou enzymy vlasovky schopné zpětně oxidovat red. FLU na parentní látku nebo přeměňovat red. FLU na další metabolit první fáze biotransformace. Ve frakci B byla zjištěna reoxidace FLU red. Na FLU, ale ve frakci A a C k reoxidaci nedocházelo.

Jedním z cílů naší práce bylo testovat biotransformační aktivitu vlasovek vůči modelovým substrátům, které se běžně používají při biotransformačních studiích u laboratorních a hospodářských zvířat i u člověka.

Ve frakci A a C vlasovek byla stanovována aktivita pentoxyresorufindepentylasy (PROD) spektrofotometricky. Tato metoda se u savců využívá ke stanovení aktivity isoformu CYP2B. Ve frakci C byla nalezena velmi nízká specifická aktivita, a to 0,56 pmol/mg/min. S touto frakcí bylo provedeno pouze jedno měření pro nedostatek biologického materiálu. Také ve frakci A byla zjištěna aktivita PROD, průměrná hodnota byla srovnatelná s aktivitou ve frakci C. Aktivita dalšího oxidačního enzymu EROD nebyla detekována ani ve frakci A, ani ve frakci C. Aktivita cytochromu P450 nebyla u červů zatím jasně stanovena, i když existuje několik studií které se zabývají tímto enzymovým systémem u helmintů. Bylo zjištěno, že někteří parazité jsou schopni oxidovat albendazol a některé studie detekovaly aktivitu P450 u larválních stádií (Barrett 1998). Předpokládá se však, že hlavními reakcemi první fáze, jsou redukční reakce, což také potvrzuje tato práce (Precious, Barrett 1989).

V rigorózní práci byly stanovovány aktivity enzymů redukujících karbonylovou skupinu xenobiotik. Byly zjišťovány aktivity reduktas metyraponu, DL-glyceraldehydu, daunorubicinu při pH 6,0 a 8,5 v jednotlivých frakcích. Škála obvyklých modelových substrátů byla rozšířena o potenciální cytostatikum oracin.

Specifické aktivity nalezené v jednotlivých frakcích jsou pro názornost uvedené v přehledných tabulkách 16, 17, 18.

Nejvýznamnější z hlediska redukčních reakcí je frakce B, ve které byly nalezeny redukční reakce u všech použitých substrátů. Největší specifická aktivita byla detekována u DL-glyceraldehydreduktasy. Významná aktivita byla nalezena také u metyraponreduktasy a u tohoto enzymu byla stanovena maximální rychlost



$V_{\max}$   $8,98 \pm 0,36$  nmol/ml/min a hodnota  $K_M$   $0,11 \pm 0,03$  mM.  $K_M$  je koncentrace substrátu, při které je reakční rychlost rovna polovině maximální rychlosti. Hodnota  $K_M$  kolísá s druhem enzymu a povahou substrátu, a je také funkcí teploty a pH.

Ve frakci A byla nalezena pouze aktivita daunorubicinreduktasy při pH 8,5 a ve frakci C aktivita daunorubicinreduktasy při pH 8,5 a DL-glyceraldehydreduktasy. Tedy daunorubicinreduktasa při pH 8,5 byla nalezena ve všech subcelulárních frakcích vlasovek, přičemž největší její aktivita byla ve frakci A.

Tab. 16: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakci A

	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Metyraponreduktasa (AKR1C4, AKR1A, CR)	ND
DL-glyceraldehydreduktasa (AKR1A)	ND
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0) (CR, DD2)	ND
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5) (AKR1A)	4,65±1,18

Tab. 17: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakci B

	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Metyraponreduktasa (AKR1C4, AKR1A, CR)	1,07±0,39
DL-glyceraldehydreduktasa (AKR1A)	5,62±0,43
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0) (CR, DD2)	0,29±0,08
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5) (AKR1A)	0,41±0,09

Tab. 18: Specifické aktivity reduktas karbonylové skupiny ve frakci C

	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Metyraponreduktasa (AKR1C4, AKR1A, CR)	ND
DL-glyceraldehydreduktasa (AKR1A)	1,4±0,21
Daunorubicinreduktasa (pH 6,0) (CR, DD2)	ND
Daunorubicinreduktasa (pH 8,5) (AKR1A)	1,82±0,33

Metoda stanovení reduktas oracinu je založena na inkubaci jednotlivých frakcí s oracinem a HPLC stanovení metabolitu dihydrooracinu. Aktivita reduktasy karbonylu oracinu ve frakci B byla signifikantně větší než aktivita reduktas karbonylu oracinu ve frakci C. Specifická aktivita reduktasy karbonylu oracinu

v cytosolu byla  $50,44 \pm 1,2$  pmol/min/mg a specifická aktivita mikrosomální reductasy oracinu byla  $7,09 \pm 0,7$  pmol/min/mg.

Tyto výsledky ukazují, že reductasy u *H. contortus* vykazují značnou schopnost redukovat karbonylovou skupinu a tyto reakce jsou významné z hlediska 1. fáze biotransformace xenobiotik.

Acenaftenol je u člověka a potkana relativně specifickým substrátem pro enzymy z podrodiny AKR1C. Ve frakci B byla detekována aktivita acenaftenoldehydrogenasy, a to  $2,72 \pm 0,43$  nmol/min/mg, v ostatních frakcích nebyla tato aktivita zjištěna.

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

Aktivita UGT byla stanovována pomocí spektrofotometrické metody, a to ve všech frakcích. Ale pouze ve frakci C byla zjištěna aktivita UGT vůči p-nitrofenolu, hodnota specifické aktivity je  $1,1 \pm 0,06$  nmol/mg/min. Ve frakci A a B nebyla detekována žádná aktivita UGT. Barrett (1997) uvádí, že červi nekonjugují xenobiotika s kyselinou glukuronovou, avšak v této práci bylo zjištěno, že *in vitro* konjugace probíhá. Je tedy možné, že helminté nemají ve skutečnosti UDP-glukuronovou kyselinu jako konjugační činidlo k dispozici, a tak nedochází k detoxikaci xenobiotik touto cestou, ale jsou schopni využít aktivovanou glukózu.

Aktivita GST byla stanovena ve frakci B pomocí metody spektrofotometrického stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu. V experimentu byla zjištěna aktivita GST ( $0,37 \pm 0,005$   $\mu$ mol/mg/min) vůči 1-chlor-2,4-dinitrobenzen. Tento enzym je pravděpodobně hlavním detoxikačním mechanismem u vlasovky a červů obecně. Byla zjištěna vyšší aktivita GST u tasemnic a motolic, u hlístic je aktivita nižší (Barrett 1997).

U GST byla také sledována kinetika konjugace ve frakci B v rozmezí koncentrací 0,1 – 3,0 mM. Hodnoty kinetických parametrů GST pro substrát 1-chlor-2,4-dinitrobenzen byly vypočteny podle rovnice Michaelise a Mentenové. Za daných podmínek byla zjištěna hodnota  $V_{\max} = 3,44 \pm 0,16$   $\mu$ mol/ml/min a  $K_M = 0,82 \pm 0,1$  mM.

Ze získaných výsledků vyplývá, že u vlasovky slezové jsou významné především redukční enzymy a konjugační reakce. Parazit disponuje značnou aktivitou reductas karbonylové skupiny xenobiotik a glutathion-S-transferas a tyto enzymy jsou pravděpodobně jeho důležitým detoxikačním systémem.

## 7. ZÁVĚR

- 1) Z vlasovek slezových, získaných ze slezu experimentálně infikovaných ovcí byly připraveny subcelulární frakce. Tyto frakce byly označeny A, B a C a odpovídají v tomto pořadí frakci mitochondriální, cytosolické a mikrosomální při analogickém zpracování homogenátu živočišných tkání.
- 2) V předložené rigorózní práci bylo dokázáno, že *Haemonchus contortus* biotransformuje FLU na redukovaný metabolit, což vede k deaktivaci léčiva. Na této redukci se podílí enzymy frakce B a reakce je NADPH-dependentní. Byly stanoveny kinetické parametry redukce FLU ve frakci B:  $V_{\max} = 62,37 \pm 4,7$  pmol/ml/min a  $K_M = 0,88 \pm 0,27$   $\mu$ M.
- 3) V jednotlivých frakcích vlasovky slezové byly sledovány aktivity vybraných biotransformačních enzymů vůči modelovým xenobiotikům. Byla nalezena nízká monooxygenasová aktivita (PROD). Významná je redukce karbonylu xenobiotik, na této redukci se podílí zejména frakce B. Dále byla detekována aktivita acenaftenoldehydrogenasy. Z konjugačních enzymů byla nalezena aktivita UGT a GST. Zdá se, že hlavní úlohu v detoxikaci hrají u parazita redukční reakce a konjugace s glutathionem.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	bicinchonová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
BZ	benimidazolová anthelmintika
CR	karbonylreduktasa
CYP	cytochrom P450
DD	dihydrodioldehydrogenasa
DMSO	dimethylsulfoxid
FLU	flubendazol
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
$K_M$	Michaelisová konstanta
NADH	redukována forma nikotinamidadeninukleotidu
NADPH	redukována forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
ND	nebylo detekováno
PROD	pentoxyresorufindepentylasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
$V_{max}$	maximální rychlost enzymové reakce

# 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.
- Barnová, E. et al.: *Lékařská chemie a biochemie*, Praha: Avicenum 1991. 661 s. ISBN 80-201-0114-4.
- Barret J.: Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121 (1998) 181 – 183.
- Barret J.: Helminth detoxification mechanisms. *Journal of Helminthology* (1997) 71, 85 – 89.
- Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Maser E., Delort A. M.: Evidence of metyrapone reduction by two *Mycobacterium* strains by <sup>1</sup>H 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.
- Crosas B., Cederlund E., Torres D., Jörnvall H., Farres J., Parés X.: A vertebrate aldo-keto reductase active with Retinoids and ethanol. *The Journal of Biological Chemistry* 22, 2001, 19132 – 19140.
- Čorba J., Várady M., Konigová A.: Antihelmintická rezistencia, Aktuálny stav na Slovensku, *Slovenský veterinársky časopis*, 26, 145-150, 2001.

- <http://www.ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/eht156html/nemas/haemonchuscontortus>
- <http://www.wormboss.com.au>
- 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.
- Köhler P.: The biochemical basis of anthelmintic action and resistance, *International Journal for Parasitology* 31 (2001) 336 – 345.
- Kotze A.C., Dobson R.J., Chandler D.: Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus columbriformis* in vitro: Potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Veterinary Parasitology* 136 (2006) 275 - 282.
- Kotze A.C., McClure S.J.: *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. *International Journal for Parasitology* 31 (2001) 1563 – 1571.
- Kotze A.C.: Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *International Journal for Parasitology* Vol. 27, 33 – 40, 1997.
- Lacey E., Gill J. H.: Biochemistry of benzimidazole resistance, *Acta Tropica*, 56 (1994) 245 – 262.
- 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.
- Precious W.Y., Barret J.: Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today*, vol. 5, no. 5, 1989.

- Sangster N. C.: Anthelmintic resistance: past, present and future, *International Journal for Parasitology* 29, 115-124, 1999
- Shaik S. A., Terrill T. H., Miller J. E., Kouakou B., Kannan G., Kaplan R. M., Burke J. M., Mosjidis J.A.: *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats, *Veterinary Parasitology*, 2006, 141, 273 – 278.
- Schröterová L., Kaiserová H., Baliharová V., Velík J., Geršl V., Kvasničková E.: The effect of new lipophilic chelators on the activities of the cytosolic reductases and P450 cytochromes involved in the metabolism of antracycline antibiotics: studies in vitro, *Physiol. Res.* 55: 683 – 691, 2004.
- Stringfellow F.: An in vitro test for drug resistance in *Haemonchus contortus*, *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 1988, 55 (1), 19 – 23.
- Szotáková B., Skálová L., Wsól V., Kvasničková E.: Reduction of potential anticancer drug oracin in the rat liver in-vitro, *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, 52: 495 – 500.
- Terada T., Sugihara Y., Nakamura K., Sato R., Inazu M., Masamoto M.: Cloning and bacterial expression of monomeric short-chain dehydrogenase/reductase (carbonyl reductase) from CHO – K1 cells, *Eur. J. Biochem.* 267, 2000, 6849 – 6857.
- 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.

- 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.
- Waller P. J.: The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock, *Acta Tropica*, 1994, 56, 233-243.
- Williams J. C.: Anthelmintic treatment strategies: current status and future, *Vet. Parasitol.*, 1997, 72, 461-70.
- Wsól V., Szotáková B., Skálová L., Maser E.: The novel anticancer drug oracin: different stereospecificity and cooperativity for carbonyl reduction by purified human liver 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Toxicology*, 197, 2004, 253 – 261.