

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

**Biotransformace vybraných anthelmintik
u tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Hana Bártíková, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Aneta Bečanová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Aneta Bečanová

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Haně Bártíkové, Ph.D., dále Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a Mgr. Ivanovi Vokřálovi, Ph.D. za metodické vedení, cenné rady a pomoc při experimentální práci. Rovněž děkuji za možnost vypracovat diplomovou práci v rámci projektu financovaného Grantovou agenturou České republiky (číslo projektu P502/10/0217).

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Aneta Bečanová

Školitel: Mgr. Hana Bártíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Biotransformace vybraných anthelmintik u tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*)

Biotransformace anthelmintik je proces, kterým se helminti brání vůči negativnímu působení cizorodých látek. Je proto základním faktorem, který způsobuje snižování účinnosti anthelmintik, rozvoj rezistence, a tak i selhávání farmakoterapie helmintóz. Proto je biotransformace anthelmintik a aktivita biotransformačních enzymů u helmintů důležitým cílem výzkumu.

Tento experiment byl zaměřen na biotransformaci albendazolu, flubendazolu a mebendazolu u tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) a na aktivitu jejich biotransformačních enzymů.

Tasemnice byly získány ze střev ovcí. Biotransformace benzimidazolů byla stanovena v *in vitro* a v *ex vivo* experimentech. Flubendazol a mebendazol byly biotransformovány mnohem více než albendazol. Aktivita antioxidantních enzymů, které se rovněž mohou účastnit metabolizace anthelmintik, byla detekována hlavně v cytosolu, cytochromy P450 ani flavinové monooxygenasy detekovány nebyly. Redukční enzymy byly stanoveny prostřednictvím specifických substrátů, k redukci docházelo nejvíce v cytosolu. Z konjugačních enzymů byla v mikrosomech a mitochondriích detekována UDP-glukuronosyltransferasa a UDP-glukosyltransferasa, glutathion-S-transferasa byla detekována v cytosolu.

Klíčová slova: biotransformace, anthelmintika, tasemnice ovčí, *Moniezia expansa*, biotransformační enzymy

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Aneta Bečanová

Supervisor: Mgr. Hana Bártíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biotransformation of selected anthelmintics in sheep tapeworm (*Moniezia expansa*)

Biotransformation of anthelmintics is a process that prevents the parasite from adverse effects of xenobiotics. Therefore, it is the main factor that causes the reduction of an anthelmintic effect, resistance development and thus the failure of drug therapy of helminthosis. Therefore many studies focused on anthelmintics biotransformation in helminths have been published.

This experiment was aimed at the biotransformation of albendazole, flubendazole and mebendazole in the sheep tapeworm (*Moniezia expansa*) and the activity of its biotransformation enzymes.

Tapeworms were obtained from sheep intestines. Biotransformation of benzimidazoles was determined in *in vitro* and *ex vivo* experiments. Flubendazole and mebendazole were metabolized in much greater extent than albendazole. The activity of antioxidative enzymes, which also can participate in drug biotransformation, was detected mainly in the cytosol. Neither cytochromes P 450 nor flavin-containing monooxygenases were detected. Reductive enzymes were determined by means of specific substrates, the reduction occurred mostly in the cytosol. The conjugation enzymes UDP-glucuronosyltransferase and UDP-glucosyltransferase were detected in microsomes and mitochondria; glutathione-S-transferase was detected in the cytosol.

Key words: biotransformation, anthelmintics, sheep tapeworm, *Moniezia expansa*, biotransformation enzymes

OBSAH

1	Úvod	9
2	Třída tasemnice (<i>Cestoda</i>)	10
2.1	Charakteristika třídy tasemnice (<i>Cestoda</i>)	10
2.1.1	Obecná charakteristika	10
2.1.2	Strobila	10
2.1.3	Scolex	11
2.1.4	Tegument	11
2.1.5	Rozmnožovací soustava	12
2.1.6	Vývoj	13
2.2	Tasemnice ovčí (<i>Moniezia expansa</i>)	14
2.3	Terapie a prevence monieziózy	17
3	Benzimidazoly	18
3.1	Mechanismus účinku	18
3.2	Albendazol	19
3.3	Mebendazol	21
3.4	Flubendazol	22
3.5	Rezistence na anthelmintika	24
3.5.1	Mechanismy vzniku rezistence	25
4	Biotransformace xenobiotik	27
4.1	I. fáze biotransformace	28
4.1.1	Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi	29
4.1.1.1	Cytochromy P450	29
4.1.1.2	Peroxidasy	30
4.1.1.3	Flavinové monooxygenasy	31
4.1.1.4	Další enzymy s oxidační aktivitou	31
4.1.2	Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi	32
4.1.3	Enzymy biotransformující cizorodé látky hydrolytickými reakcemi	33
4.2	II. fáze biotransformace	33
4.2.1	Konjugace s glutathionem	34
4.2.2	Konjugace s kyselinou glukuronovou	35
4.2.3	Sulfonace, acetylace, methylace	35
4.2.4	Konjugace se sacharidy	37
4.3	III. fáze biotransformace	37
5	Cíl práce	39

6	Biologický materiál, chemikálie, přístroje	40
6.1	Biologický materiál	40
6.2	Chemikálie	40
6.3	Přístroje	41
7	Pracovní postup.....	43
7.1	Příprava pufrů.....	43
7.2	Příprava subcelulárních frakcí.....	43
7.3	BCA stanovení bílkoviny	45
7.4	Biotransformace anthelmintik <i>in vitro</i>	47
7.5	Biotransformace anthelmintik <i>ex vivo</i>	50
7.5.1	Stanovení anthelmintik v homogenátu	50
7.5.1.1	Homogenizace tasemnic po inkubaci.....	50
7.5.1.2	Stanovení anthelmintik v homogenátu.....	51
7.5.2	Stanovení anthelmintik v médiu	52
7.6	Stanovení aktivity oxidačních enzymů.....	53
7.6.1	Stanovení aktivity katalasy	53
7.6.2	Stanovení glutathionreduktasové aktivity.....	55
7.6.3	Stanovení peroxidasy.....	57
7.6.4	Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD).....	58
7.6.5	Stanovení aktivity flavinové monooxygenasy (FMO).....	61
7.6.6	Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450	62
7.7	Stanovení aktivity redukčních enzymů	64
7.7.1	Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí 4-pyridinkarboxaldehydu	64
7.7.2	Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí daunorubicinu	65
7.7.3	Stanovení aktivity karbonylreduktasy (CBR) pomocí menadionu	66
7.7.4	Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí acenaftenolu.....	67
7.7.5	Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí metyraponu	68
7.8	Stanovení aktivity konjugačních enzymů.....	69
7.8.1	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)	69
7.8.2	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glukosyltransferasy (UGlcT).....	70
8	Výsledky.....	73
8.1	Stanovení bílkoviny	73
8.2	Biotransformace anthelmintik <i>in vitro</i>	74
8.3	Stanovení anthelmintik v homogenátu	76
8.3.1	Biotransformace albendazolu	76
8.3.2	Biotransformace mebendazolu	77
8.3.3	Biotransformace flubendazolu.....	78
8.4	Stanovení anthelmintik v médiu.....	79

8.5	Stanovení oxidačních enzymů.....	81
8.5.1	Stanovení katalasy	81
8.5.2	Stanovení glutathionreduktasové aktivity.....	82
8.5.3	Stanovení peroxidasy.....	83
8.5.4	Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD).....	84
8.5.5	FMO, CYP.....	85
8.6	Stanovení aktivity redukčních enzymů	85
8.7	Stanovení konjugačních enzymů.....	87
8.7.1	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)	87
8.7.2	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glukosyltransferasy (UGlcT).....	88
9	Diskuse	90
9.1	Biotransformace anthelmintik	90
9.2	Aktivita biotransformačních enzymů	93
10	Závěr	97
11	Použité zkratky.....	98
12	Seznam obrázků	101
13	Seznam tabulek	102
14	Použitá literatura	103

1 Úvod

Helmintózy jsou jedny z nejčastějších onemocnění zvířat, které mohou vést k velkým ztrátám v chovech, a to hlavně snížením produktivity zvířat, v horších případech i jejich vymíráním.

Tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) parazituje u koz, ovcí, skotu, srnčí, jelení a další zvěře. Může být velmi patogenní, způsobovat koliky nebo dokonce úhyny mláďat, např. jehňat (Volf et al. 2007). Jako všichni jedinci čeledi *Anoplocephalidae* vyžadují mezihostitele a definitivního hostitele (Denegri et al. 1998). Vajíčka se dostávají do vnějšího prostředí s trusem, kde jsou pozřena mezihostitelem, tzn. roztoči řádu *Oribatidae*. Definitivní hostitel se pak nakazí na pastvě pozřením roztoče s trávou (Jurášek et al. 1993).

Léčba monieziózy je založena zejména na podávání anthelmintik (benzimidazolů). Nicméně v posledních letech se vyskytují důkazy o tom, že farmakoterapie helmintóz selhává. To je způsobeno hlavně vzrůstající rezistencí vůči anthelmintikům.

Jedním z mechanismů rezistence je i biotransformace anthelmintik v těle parazita. Takto se parazit brání působení anthelmintika jako cizorodé látky stejně jako všichni ostatní živočichové.

K terapii monieziózy se mimo jiné používají i anthelmintika albendazol (ABZ), flubendazol (FLU) a mebendazol (MBZ). ABZ se biotransformuje oxidací na biologicky aktivní albendazol-sulfoxid (ABZ-SO) a neaktivní albendazol-sulfon (ABZ-SO₂). U FLU a MBZ dochází v průběhu biotransformace k redukci jejich karbonylové skupiny na hydroxylovou za vzniku redukováných metabolitů (FLU-R a MBZ-R).

Právě míra biotransformace anthelmintik úzce souvisí se selháváním farmakoterapie nejen moniezióz, ale i dalších helmintóz, a tím i s rozvojem rezistence parazitů. Proto je na místě se této problematice věnovat.

Teoretická část

2 Třída tasemnice (Cestoda)

„Mezi laiky, kteří považují tasemnice za ta nejnižší, zdegenerovaná stvoření, se stále velmi často vyskytuje strach a pověry. Odpor, který lidé vůči těmto živočichům mají, většinou vychází ze skutečnosti, že žijí ve střevě a můžeme je vidět, jen když jsou vyloučeny s trusem hostitele. Navíc se zdá, že se objevují spontánně. A tajemství vždy doprovází strach. Nakonec jejich přítomnost v některých případech způsobuje nemoci, které jsou špatně léčitelné. Nicméně díky vědeckému přístupu se míra porozumění tasemnicím zvyšuje a ukazuje se, že jsou jednou z nejúchvatnějších skupin živočichů v celé živočišné říši. Jejich komplikovanému životnímu cyklu a složitým vztahům mezi parazity a hostiteli může konkurovat pouze několik málo organismů.“ (Roberts et al. 2009)

2.1 Charakteristika třídy tasemnice (Cestoda)

2.1.1 Obecná charakteristika

Asi 5000 známých druhů tasemnic parazituje u všech skupin obratlovců, přičemž nejvyšší počet řádů tasemnic se nachází u paryb a ryb. Až na výjimečné případy jde o parazity, kteří mají vícehostitelské životní cykly a místem lokalizace je trávicí soustava obratlovců (Volf et al. 2007).

Tasemnice mají typicky vytvořený scolex (hlavičku) a segmentovanou strobilu (tělo). Na scolexu jsou umístěny nápadné přichycovací orgány (Volf et al. 2007). Všichni jedinci třídy *Cestoda* jsou extrémně dorsoventrálně zploštělí a mohou dosahovat délky až několika metrů. Dospělí jedinci parazitují ve střevech jejich hostitelů, kde jsou ukotveny právě pomocí přichycovacích orgánů (Mehlhorn 2008).

2.1.2 Strobila

Strobila je tvořena jednotlivými články (proglotidy), které představují samostatné reprodukční jednotky. Tasemnice jsou až na výjimky hermafroditi, takže

v každém článku je samčí i samičí reprodukční soustava (Volf et al. 2007). Počet článků může být různý – od tří do několika tisíc (Sedlák 2005). U polyzoických¹ druhů se průběžně diferencují nové články v přední části strobily procesem zvaným strobilace. Nově vznikající články zaujmají místo těch starších, ty se posouvají k zadní části strobily, během čehož pohlavně vyzrávají. Když dosáhnou konce strobily, buňky pohlavních orgánů splývají a vznikají vajíčka. Splývat mohou buňky pohlavních orgánů z jednoho článku, z různých článků jedné strobily i z různých článků jiné tasemnice, vždy záleží na druhu. Když článek dosáhne konce strobily, buď se oddělí a neporušený odchází se stolicí, nebo se rozruší a uvolňuje vajíčko, tento proces se nazývá apolýza (Roberts et al. 2009).

2.1.3 Scolex

Většina tasemnic nese na předním konci strobily hlavičku (scolex) (Roberts et al. 2009). Na scolexu jsou přichycovací orgány, kruhové přísavky (mohou být doplněny háčky) nebo podélné štěrby (borthrie) (Sedlák 2005). Pomocí přichycovacích orgánů se tasemnice ukotvují ke střevní stěně (Roberts et al. 2009). Velká část tasemnic řádu *Cyclophyllidea* má terminálně uložený zasunovatelný chobotek (rostellum), obvykle opatřený háčky různého tvaru a počtu (Volf et al. 2007). Hlavička obsahuje hlavní neurální ganglia a na přední části nese mnoho smyslových zakončení detekujících mechanické i chemické podněty. Mezi hlavičkou a tělem se nachází relativně nediferenciovaná oblast krček, kde se nacházejí kmenové buňky, ze kterých vznikají nové články (Roberts et al. 2009).

2.1.4 Tegument

Povrch těla je tvořen tegumentem (neodermis), tedy povrchovým syncytiem s buněčnými těly zanořenými pod vrstvu podpovrchové svaloviny. Typickým znakem

¹Polyzoické - tělo je tvořeno několika články (*Echinococcus*) nebo mnoha články (*Taenia*).

Monozoické - tělo je nečlánkované, resp. tvořeno jedním článkem (*Caryophyllidea*) (Volf et al. 2007)

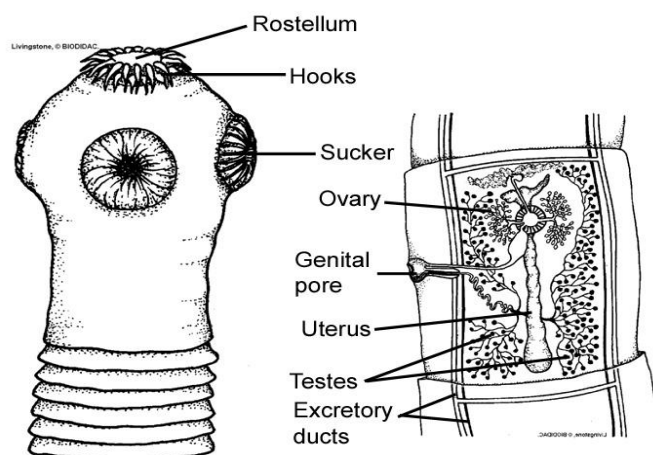
povrchu tasemnic je přítomnost mikrotrichů (přeměněné mikroklky), které jsou vně kryty glykokalyxem. Podle některých názorů se mikrotrichy vsouvají mezi mikrovilly střevních klků hostitele (Sedlák 2005) a slouží ke zvětšení absorpční plochy tegmentu (Roberts et al. 2009). Vzhledem k absenci trávicí soustavy je syncytium hlavním místem příjmu živin. Vnější části tegmentu zajišťují i ochranu v prostředí hostitele (např. inhibice trávicích enzymů hostitele) (Volf et al. 2007), také tam probíhají reakce zlepšující absorpci živin (Roberts et al. 2009). Vnitřní vrstva je ohraničena vrstvou pojivové tkáně (bazální lamina). Ta je následována tenkou vrstvou svaloviny (Bogitsh et al. 2005).

2.1.5 Rozmnožovací soustava

Tasemnice jsou až na výjimky hermafroditi, takže v každém článku je samčí i samičí reprodukční soustava (Volf et al. 2007). Některé rody mají dvě sady genitálií v segmentu, zatímco několik druhů, jejichž hostitelé jsou vodní ptáci, mají jednu samčí a dvě samičí soustavy v každém článku (Roberts et al. 2009).

Jak článek postupuje ke konci strobily, rozmnožovací orgány vyžívají a spermie a oocyty splývají. Samčí orgány obvykle vyžívají první a produkují spermie, které jsou skladovány, dokud nevyzrají ovaria. Tento proces se nazývá protandrie nebo androgynie. V některých druzích však dozrávají jako první ovaria, v tomto případě se jedná o protogynii nebo gynandrii. Tento asynchronní vývoj může být adaptací chránící tasemnici před samooplozením článků (Roberts et al. 2009).

Vývody obou pohlavních soustav ústí velmi často do společného genitálního atria (Volf et al. 2007).



Obrázek 1 Hlavička a zralý článek tasemnice (BIODIDAC: A bank of digital resources for teaching 2012)

Zasunovatelný chobotek (rostellum), háčky (hooks), přísavka (sucker), samičí pohlavní orgány (ovary), genitální pór (genital pore), děloha (uterus), samčí pohlavní orgány (testes), vylučovací kanálky (excretory ducts)

2.1.6 Vývoj

Tasemnice mají obvykle dva hostitele, jako např. rod *Taenia* (jednoho mezihostitele a definitivního hostitele), v některých skupinách jsou však i zástupci s tříhostitelskými cykly. Všechny tasemnice jsou oviparní² a vajíčka se do vnějšího prostředí dostávají se stolicí definitivního hostitele, a to izolovaně po opuštění článku uterinním pórem (anapolyze) nebo uvnitř jednoho či několika uvolněných článků (apolyze). Ve vajíčku se buď v mateřském organismu, či až ve vnějším prostředí vytváří první larva, tzv. lykofora (dekakant podle přítomnosti 10 embryonálních háčků) u skupin *Gyrocotylidea* a *Amphylinidea*, anebo onkosféra (hexakant) u podtřídy *Eucestoda*. Onkosféra může být někdy obklopena ciliárním obalem pro pohyb ve vodě, pak je označována jako koracidium (Volf et al. 2007). Onkosféra se vylíhne před nebo po tom, co je pozřena mezihostitelem, z jeho střeva pak přechází do extraintestinálního prostoru (Robets et al. 2009). Larvy druhého stadia v mezihostitelích jsou označovány jako metacestodi a podle morfologie mají různé názvy (např. procerkoid, plerocerkoid,

² Tzn. vejcorodé

cysticerkoid, cysticerkus) (Volf et al. 2007). Přeměna metacestod v dospělé potom probíhá ve střevě v tomtéž nebo jiném hostiteli (Roberts et al. 2009).

Když juvenilní tasemnice dosáhne tenkého střeva jejího definitivního hostitele, určitý podnět způsobí excystaci a tasemnice začne růst a pohlavně vyzávat. Někteří jedinci řádu *Pseudophyllidea* potřebují k vyzávání pouze zvýšení teploty těla na teplotu jejich hostitele. Dále je vývoj ovlivněn dalšími podmínkami zahrnujícími velikost juvenilní tasemnice, druh helminta, velikost a potravu hostitele, přítomnost dalšího parazita a imunitní stav ve střevě hostitele (Roberts et al. 2009).

Přenos mezi hostiteli se až na výjimky realizuje perorálně, tasemnice spoléhají z hlediska přenosu na potravní řetězce (Volf et al. 2007). Pohlavně vyspělí jedinci žijí ve střevě, v jeho vychlípeninách nebo vzácněji i v tlustém střevě jedinců všech tříd obratlovců. Jako mezihostitelé pak slouží jak obratlovci, tak bezobratlí, nejčastěji se jedná o korýše, hmyz, měkkýše, roztoče a kroužkovce (Roberts et al. 2009).

2.2 Tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*)

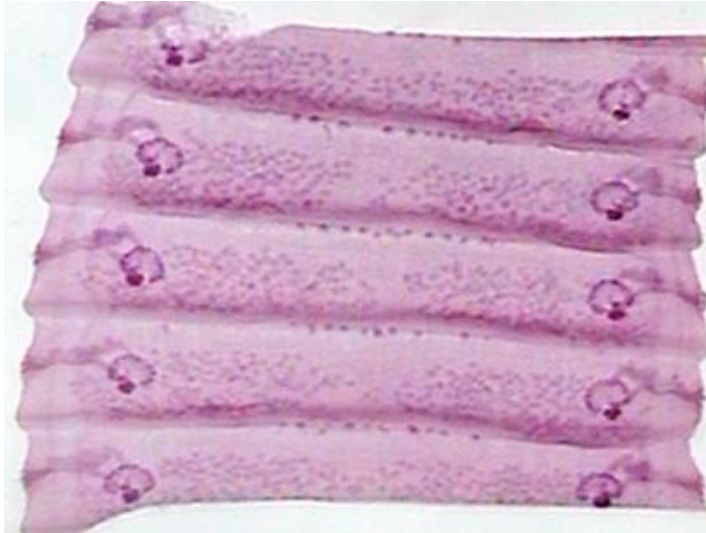
Třída: *Cestoda* (tasemnice)

Řád: *Cyclophyllidea* (kruhovky)

Čeleď: *Anoplocephalidae* (tasemnicovití) (BioLib - *Moniezia expansa* (tasemnice ovčí) 2012)



Obrázek 2 *Moniezia expansa* (Internal Parasites of Sheep and Goats 2012)

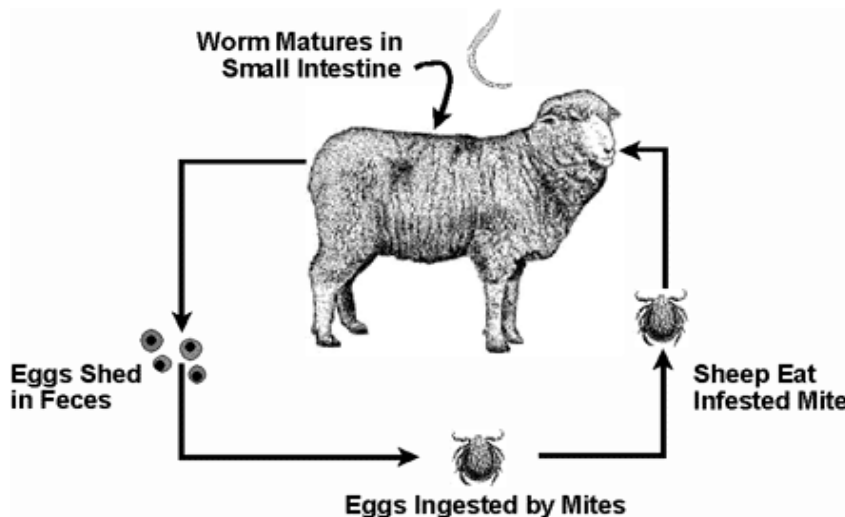


Obrázek 3 Detailní zobrazení článků (*Moniezia expansa*) (Cestodes 2008)

Moniezia expansa (Rudolfi 1810) dosahuje délky 6-10 metrů a šířky 10-16 mm. Scolex je malý, kulatý, laločnatý se 4 přísavkami, které jsou bez háčků a mají štěrbinovitý otvor. Krček chybí nebo je velmi krátký. Články strobily jsou široké 16 mm a dlouhé jen 3 mm (Jurášek 1987). Barva dospělců je bílá až žlutavá. Otvory vyústění pohlavních žláz jsou umístěny oboustranně a mezičlánkové žlázy jsou umístěny v jedné řadě po celé šířce mezičlánkového prostoru. Vajíčka jsou nepravidelně trojhranná až čtverhranná a jejich velikost se pohybuje od 50 do 85 μm (Tluchoř et al. 2006). Vajíčka obsahují zvláštní pyriformní aparát (embryo s obaly má hruškovitý tvar) (Volf et al. 2007).

Vajíčka se dostávají do vnějšího prostředí s trusem, tam jsou požírána roztoči řádu *Oribatidae*. Onkosféra proniká do tělní dutiny roztoče a za 1-4 měsíce se mění na cysticerkoid (Jurášek et al. 1993), který přežívá v hostiteli až 22 měsíců (Jurášek 1987). Definitivní hostitel se pak nakazí na pastvě pozřením roztoče s trávou. Prepatentní perioda je asi 6 týdnů a po 3 měsících tasemnice hostitele spontánně opouští (Jurášek et al. 1993).

M. expansa parazituje u koz, ovcí, skotu, srnčí, jelení a další zvěře (Volf et al. 2007).



Obrázek 4 Životní cyklus tasemnice ovčí (Parasite Control and Prevention 2008)

Vajíčka tasemnice jsou vylučována s trusem definitivního hostitele. Na pastvě jsou pozřena mezihostitelem, ve kterém tasemnice prodělávají částečný vývoj. Po pozření mezihostitele dospívají v tenkém střevě definitivního hostitele.

Nachází se v pastevních oblastech. K prvnímu výskytu dochází u jehňat už v půlce května a do července stoupá, už v červnu se objevují první klinické příznaky. Výskyt monieziózy závisí na aktivitě mezihostitelů na jaře a v létě (Jurášek et al. 1993).

Klinický obraz závisí na intenzitě nakažení, věku a fyziologickém stavu zvířete. Nejčastěji onemocní jehňata ve věku 1 ½ až 8 měsíců. Při slabých nákazách jsou příznaky nevýrazné. Při silných jsou výrazné a často končí uhynutím. Choroba začíná enteritidou s prudkým průjmem, v trusu se objevují fragmenty strobily. Zvířata jsou slabá, těžko vstávají, obloukovitě ohýbají hřbet a defekace je bolestivá. Následuje nechutenství, zhubnutí, anémie, nervové poruchy (manéžové pohyby a křeče), zvýšená salivace, agonie a uhynutí (Jurášek 1987).

Diagnóza se stanovuje hledáním charakteristických článků v okolí anu nebo stanovením vajíček v trusu (Mehlhorn 2008), postmortálně nálezem akutní katarální enteritidy s možnou progresí do hemoragické enteritidy, dále to jsou degenerativní změny v myokardu, hemoragické infiltráty v mozku, exudát v přirozených tělních dutinách a nález velkého počtu tasemnic ve střevě (Tluchoř et al. 2006).

2.3 Terapie a prevence monieziózy

Prevence a léčba helmintóz zvířat zahrnuje kombinaci zoohygienických opatření a využívání velmi rozsáhlé skupiny značně různorodých léčiv s anthelmintickými účinky. Mnohá anthelmintika mohou mít současně účinky proti více třídám helmintů nebo i proti původcům zevních parazitóz. Antiparazitární přípravky jsou často založeny na kombinaci anthelmintik nebo anthelmintik a antiectoparazitik (Lamka & Ducháček 2008).

Anticestoda jsou chemicky velmi různorodou skupinou. Z benzimidazolů se používají albendazol, mebendazol, oxibendazol, fenbendazol, flubendazol a febantel. Z dalších chemických skupin se pak používá niklosamid, praziquantel, epsiprantel, nitroscanat a arekolin. Pro přežvýkavce jsou indikovány právě benzimidazoly (Lamka & Ducháček 2008).

V oblastech častého výskytu se provádí na jaře dehelmintizace všech jehňat 1 měsíc po výhonu na pastvu, která se po 30 dnech opakuje. Jehňata mladší než 1 měsíc se neodčervují. Vhodná je pastva na suchých, mezihostiteli nezamořených pastvinách. Plochy kolem ovčínů je vhodně obdělávat, pastviny ošetřovat a hnojit (Vrzgula et al. 1986).

3 Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou používány od roku 1961. Patří mezi ně thiabendazol, albendazol, kambendazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, oxfendazol a oxibendazol (Bodeček & Koudela 2010).

Benzimidazoly jsou nejširší chemickou skupinou používanou pro léčbu endoparazitóz zvířat. Tato skupina zahrnuje analogy thiabendazolu a karbamáty benzimidazolu. Substitucí vedlejších řetězců na benzimidazolové jádro pak vznikají jednotlivé látky. Novější benzimidazoly jsou charakteristické novými substituenty na benzimidazolovém jádře a nahrazením thiazolového kruhu methylykarbamátem. Tato nová generace má pak delší poločas vylučování, vyšší účinnost a širší spektrum účinku (Danaher et al. 2007).

Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku. Benzimidazoly jsou obecně léčiva s antinematodní (včetně terapie trichuriózy), z části s antitrematodní i anticestodní (výjimečně antimykotickou) aktivitou. Nedávné studie potvrdily též možnost využití benzimidazolových léčiv při terapii giardiózy (protozoóza) (Ducháček & Lamka 2006).

3.1 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku je založen na inhibici energetického metabolismu parazitujících helmintů. Inhibují syntézu β -tubulinu (strukturálního proteinu mikrotubulů), narušují tak transport a metabolismus glukosy, důsledkem je energetické vyčerpání a ztráta pohyblivosti parazitů a jejich pozvolné odumření (Ducháček & Lamka 2006). Mikrotubuly jsou spojeny i s ději jako je tvorba mitotických vláken při buněčném dělení, udržení stálého tvaru a pohyblivosti buňky, buněčné vylučování, absorpce živin a intracelulární transport (Danaher et al. 2007).

Mechanismus inhibice vzniku mikrotubulů benzimidazoly je podobný působení kolchicinu. Inhibice se docílí přidáním tubulinu, který nese benzimidazol na jeho vazebném místě, na konec rostoucího mikrotubulu. Ten tak ztrácí schopnost navázat další monomery tubulinu pro jeho další růst (Danaher et al. 2007). Afinita benzimidazolů k parazitárnímu typu β -tubulinu je mnohonásobně vyšší než k β -tubulinu

buněk ošetřovaných zvířat. Většina léčiv skupiny působí proti dospělým i vývojovým stádiím helmintů, některá i ovocidně (Bodeček & Koudela 2010).

Některé benzimidazoly inhibují fumarát reduktasu, která je pro parazita specifická, a tak blokuje vytvoření sukcinátu. Tím narušují cyklus dikarboxylových kyselin, který u anaerobních parazitů nahrazuje Krebsův cyklus, vůči němu probíhá v obráceném směru (Danaher et al. 2007).

Cestoda nemají na rozdíl od *Nematod* (hlístice) a *Trematod* (motolice) gastrointestinální trakt, každý jejich článek funguje jako individuální jednotka. Proto je zajímavostí, že jediným způsobem, jak může podané léčivo dosáhnout své cílové struktury, je přechod přes tegument. A proto je pasivní difúze hlavním mechanismem, jak může benzimidazol vstoupit do strobily. Lipidová bariéra tegumentu je pravděpodobně podobná lipidové bariéře standardní buněčné membrány, tudíž míra penetrace léčiva závisí hlavně na jeho lipofilitě (Mottier et al. 2003).

Chemická povaha benzimidazolů umožňuje jejich použití v celé řadě lékových forem, např. suspenze, pasta, pelety a prášek. Tato léčiva lze bezpečně kombinovat s jinými anthelmintiky (např. piperazin) (Bodeček & Koudela 2010).

3.2 **Albendazol**

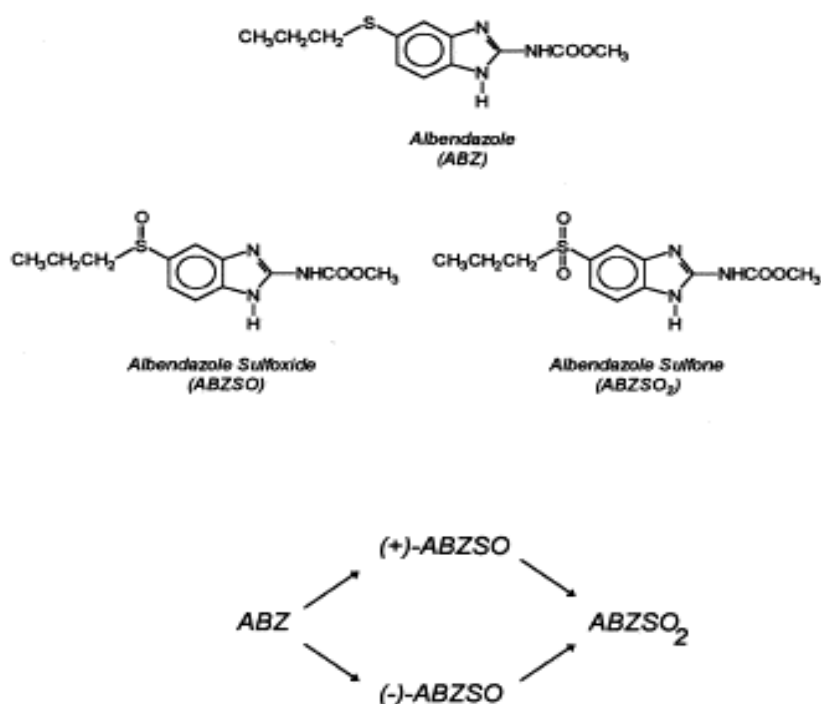
Albendazol (ABZ) je širokospektré anthelmintikum účinné proti většině běžně se vyskytujících parazitů a je často využíván jak v humánní, tak i veterinární medicíně (Solana et al. 2001).

Zdá se, že albendazol blokuje vznik cytoplasmatických mikrotubulů, což vede k poškození životně důležitých dějů v buňce a ke smrti parazita. Také existují důkazy o tom, že tato látka rovněž inhibuje fumarát reduktasu, a tím i vznik ATP (Craig et al. 2004).

Albendazol je podáván perorálně, ale protože je špatně rozpustný ve vodě, je vstřebáván málo a nekonstantně (<5%). Pokud je ale podán s potravou bohatou na tuky dostupnost léčiva se až pětkrát zvyšuje oproti podání na lačno. Také souběžná léčba s kortikoidy vede k větším plazmatickým koncentracím (Craig et al. 2004). Je částečně resorbován z gastrointestinálního traktu, kde je metabolizován na albendazol-sulfoxid a

další metabolity. Albendazol je vylučován prostřednictvím moči a feces (SPC; souhrn údajů o přípravku Aldifal).

Z parentního sulfidu je možná biotransformace na dva metabolity, a to na albendazol-sulfoxid (ABZ-SO) a albendazol-sulfon (ABZ-SO₂) (Danaher et al. 2007). ABZ-SO obsahuje asymetrické centrum, tudíž existují dva enantiomery, (+) ABZ-SO a (-) ABZ-SO. ABZ-SO je anthelminticky účinným metabolitem, zatímco ABZ-SO₂ je považován za neaktivní. Nicméně kvůli nižší aktivitě ABZ-SO oproti ABZ je nezbytné míru biotransformace u různých parazitů zjistit (Solana et al. 2001).



Obrázek 5 Albendazol a jeho metabolity (Lanchote et al. 1998)

Albendazol se oxiduje na albendazol-sulfoxid (ABZ-SO) ve dvou optických izomerech, další oxidací vzniká albendazol-sulfon (ABZ-SO₂).

Albendazol má široké spektrum účinku zahrnující *Nematoda*, *Cestoda* a stejně tak i *Trematoda*. Také byl úspěšně použit proti *Giardia lamblia*, stejně tak i na léčbu cystické hydatidózy (echinokokózy), zvláště ve spojení s prazikvantelem (Craig et al. 2004).

První fází biotransformace je oxidace albendazolu, ta byla detekována u řady helmintů, např. u *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa*, *Ascaris suum*, *Haemonchus*

contortus nebo *Dicrocoelium dendriticum*. Ačkoliv mají všichni tito helminti schopnost oxidovat albendazol, metabolická aktivita a lokalizace oxidace se u jednotlivých druhů helmintů značně liší (Cvilink et al. 2009a).

Druhý krok oxidace albendazolu, sulfonace, byl pozorován u mitochondriálních frakcí *D. dendriticum*. Byl to první důkaz o tom, že enzymy helmintů jsou schopné deaktivovat albendazol tvorbou biologicky neaktivního albendazol-sulfonu. Nicméně u *ex vivo* experimentů sulfonace albendazolu pozorována nebyla a míra sulfonace v *in vitro* experimentech byla tak nízká, že nelze předpokládat žádnou významnou protektivní roli této reakce. U *M. expansa* byla pozorována redukce ABZ-SO zpět na ABZ, na druhou stranu u *F. hepatica* ani u *D. dendriticum* nikoliv (Cvilink et al. 2009a).

3.3 Mebendazol

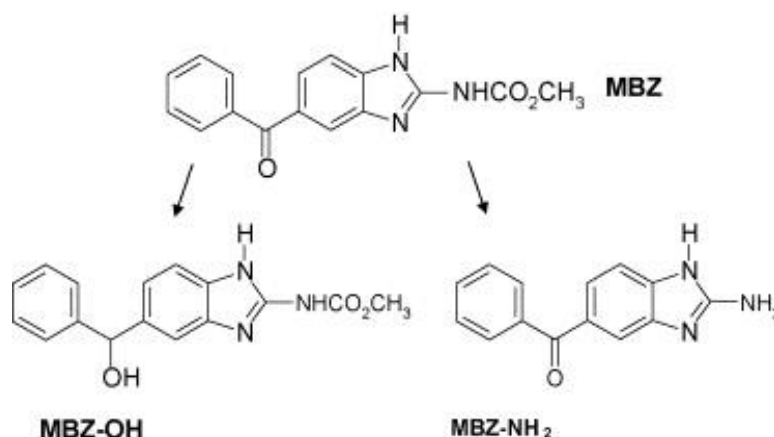
Mebendazol (MBZ) neinhibuje fumarát reduktasu. Váže se jak na tubulin savců, tak i parazitů, nicméně s mnohem vyšší aktivitou vůči parazitům. Vazba na tubulin pak snižuje absorpci glukosy, což vede ke spotřebě glykogenu a nedostatku ATP (Craig et al. 2004).

Mebendazol je podáván perorálně, je špatně rozpustný ve vodě, a tudíž málo vstřebáván z gastrointestinálního traktu (Craig et al. 2004). Více jak 90 % dávky zůstává v gastrointestinálním traktu a je eliminováno v nezměněné podobě v trusu. Absorbovaný mebendazol je metabolizován v játrech a ve většině vyloučen během 24 hodin močí (SPC; souhrn o přípravku Antiverm 100mg/g).

Mebendazol je primárně určený pro léčbu *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* a infekcí způsobených měchovci, kde je léčba velmi úspěšná. Jedná se o alternativní látku používanou u trichinózy a orgánové formy larvální toxokarózy. Vzhledem k jeho širokému spektru účinku na něj dobře odpovídají i smíšené infekce. Vysoké dávky mohou být využity i k léčbě cystické hydatidózy, u níž je ale preferován albendazol (Craig et al. 2004).

Biotransformací se karbonylová skupina, kterou mebendazol obsahuje, redukuje na hydroxylovou (MBZ-R), karbamátová skupina může být hydrolyzována na

aminoskupinu (MBZ-NH₂) (Danaher et al. 2007), což bylo pozorováno u *in vitro* experimentů s *A. suum* (Cvilink et al. 2009a).



Obrázek 6 Mebendazol a jeho metabolity (Danaher et al. 2007)

Mebendazol se biotransformuje redukcí karbonylové skupiny na hydroxylovou nebo hydrolýzou postranního řetězce.

3.4 Flubendazol

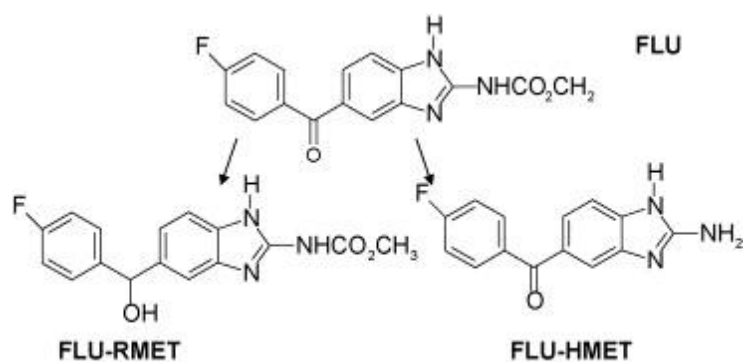
Flubendazol (FLU) je velmi těžko rozpustný ve vodných systémech, které jsou v gastrointestinálním traktu, což má za následek jeho nízkou rozpustnost, a tím i velmi nízkou absorpci. To se odráží ve vysoké koncentraci nezměněného původního léčiva, vylučovaného z organismu stolicí. Velmi malá část, která je absorbována, je v první fázi metabolismu v játrech extenzivně biotransformována (SPC; souhrn o přípravku Flubenol 5%). Hlavními biotransformačními reakcemi je redukce karbonylové skupiny a hydrolýza karbamátu (Bártíková et al. 2010a). Biotransformované produkty jsou konjugovány do glukosiduronátů nebo sulfátových konjugátů a vyloučeny žlučí a močí (SPC; souhrn o přípravku Flubenol 5%).

Exkrece močí je relativně nízká, vylučují se téměř výhradně metabolity pouze s malým množstvím parentní látky (SPC; souhrn o přípravku Flubenol 5%).

Metabolismus flubendazolu byl studován u *H. contortus*. Výsledky ukázaly, že cytosolické NADPH-dependentní enzymy *H. contortus* metabolizovaly flubendazol redukcí karbonylové skupiny. Redukovaný flubendazol byl jediným nalezeným metabolitem první fáze biotransformace. Redukce flubendazolu byla také zjištěna u *ex vivo* inkubace *Moniezia benedeni* (Cvilink et al. 2009a). Druhá fáze biotransformace

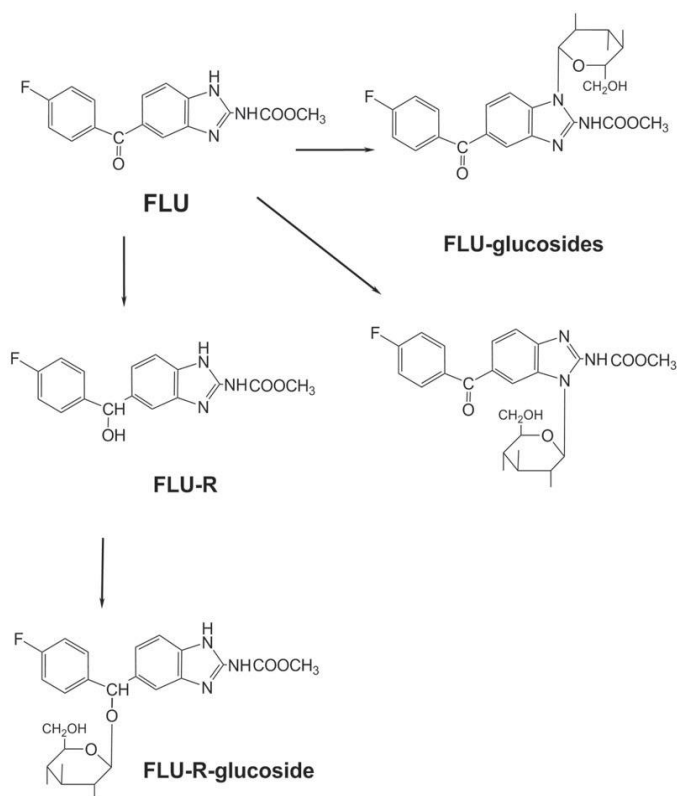
flubendazolu v *H. contortus* se skládá z konjugace s glukosou, která je katalyzována mikrosomální UDP-glukosyltransferasou (UGlT), přičemž se konjuguje jak parentní, tak i redukovaný flubendazol (Vokřál et al. 2012).

Po opakovaném podávání flubendazolu byla u jehňat zvýšena aktivita některých biotransformačních enzymů. Ale prakticky nejsou tyto změny tak velké, aby terapii negativně ovlivnily (Bártíková et al. 2010a).



Obrázek 7 Flubendazol a jeho metabolity (a) (Danaher et al. 2007)

Flubendazol se v 1. fázi biotransformuje redukcí karbonylové skupiny na hydroxylovou nebo hydrolýzou postranního řetězce.



Obrázek 8 Flubendazol a jeho metabolity (b) (Vokřál et al. 2012)

Druhou fází biotransformace je hlavně konjugace s glukosou. Konjuguje se jak parentní látka (N-glukosidace), tak i redukovaný metabolit (O-glukosidace).

3.5 Rezistence na anthelmintika

Anthelmintika jsou jediným možným způsobem boje proti parazitujícím helmintům, kteří stojí za významnou morbiditou i mortalitou lidí i zvířat (Cvilink et al. 2009a). Tasemnice i další helminti mohou mít ale vyvinuty mechanismy, které je chrání před negativním působením anthelmintik i jiných xenobiotik (Bártíková et al. 2012).

Tasemnice způsobují vážné infekce, které postihují lidi, stejně tak jako i množství živočišných druhů, a mohou způsobit zdravotní i ekonomické ztráty. Při terapii cestodóz se využívá řada anthelmintik, naneštěstí však jejich účinnost již není v terapii některých cestodóz dostačující (Bártíková et al. 2012).

Pochopení rozvoje rezistence u parazitujících helmintů je zásadní pro prodloužení účinnosti současných anthelmintik a rozvoj markerů pro monitorování rezistence. Také je užitečné při navrhování nových chemoterapeutik tak, aby se rezistenci předcházelo (James et al. 2009).

V případě anthelmintik aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika u helmintů i hostitele podstatně ovlivňuje účinnost farmakoterapie helmintóz (Cvilinear et al. 2009a).

3.5.1 Mechanismy vzniku rezistence

Rezistence na léčiva může vzniknout několika způsoby: (i) změnou cílové struktury léčiva, to znamená, že léčivo dále strukturu nerozpozná a je inaktivní, (ii) změnou v metabolismu, který inaktivuje nebo odstraňuje léčivo, případně brání jeho aktivaci, (iii) změnou v distribuci léčiva v cílovém organismu, která zamezuje přístupu léčiva na místo účinku, (iv) zmnožením cílové struktury, které vede k překonání účinku léčiva (Wolstenholme et al. 2004).

Všechny eukaryotické buňky mají několik detoxikačních cest, které přeměňují škodlivá xenobiotika na méně toxické sloučeniny (James et al. 2009). Biotransformační enzymy tímto způsobem zeslabují toxické působení anthelmintik a dalších xenobiotik, a tím snižují i účinnost léčby helmintóz (Bártíková et al. 2012).

Také další mechanismy přispívají ke vzniku rezistence. Jedním z nich je rezistence zprostředkovaná zvýšenou expresí membránového proteinu zvaného P-glykoprotein. U lidí export léčiva z buňky zprostředkovaný P-glykoproteinem snižuje intracelulární koncentraci dané látky, což vede v podstatě k poddávkování. Vzhledem k tomu, že helminti mají funkčně podobný transportní protein, eflux léčiva z buňky může hrát v rezistenci helmintů svou roli (James et al. 2009).

Mnohé pokusy detekovat rezistenci u helmintů jsou také zaměřeny na změnu cílové struktury pro léčiva, která je daná změnami v sekvenci genomu. Hned několik jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) je spojeno s rezistencí, SNPs se mohou objevit i po léčbě chemoterapeutiky, a to genovou mutací. SNPs mohou vést k záměně aminokyselin proteinů cílové struktury léčiva, a tak změnit afinitu léčiva k jeho cíli. Takovéto změny ovlivní odpověď na léčivo, což způsobí, že léčivo je méně účinné (James et al. 2009).

Experimenty ukázaly, že se rezistence vyvíjí zpočátku pomalu, pak se ale rychle stupňuje až na maximální úroveň. Je to dáno určitým počátečním výskytem rezistentních genů, který je následován jejich kumulací až na takovou úroveň, že se léčba stává neúspěšnou. Rezistentní geny jsou přítomny v mnoha populacích helmintů,

navíc vznikají pouze jednoduchými mutacemi. Protože jsou rezistentní geny snadno selektovány léčbou, s každou léčbou roste jejich frekvence v populaci. Přístup k managementu rezistence většinou zahrnuje i snížení selekce poskytnutím možnosti přežití citlivých genotypů, které mohou „zředit“ rezistentní geny (Sangster 1999).

4 Biotransformace xenobiotik

Biotransformační enzymy slouží ve všech organismech jako účinná obrana před potenciálně nebezpečnými účinky xenobiotik (Vokřál et al. 2012). I přesto byly ale enzymy metabolizující léčiva u helmintů poměrně málo zkoumány (Bártíková et al. 2010b).

Všechny živé organismy se neustále dostávají do kontaktu s xenobiotiky, tj. s cizorodými látkami, které neslouží organismu ani jako zdroj energie ani pro syntézu biomolekul. Typickými xenobiotiky jsou léčiva, potravinová barviva a aditiva, kosmetické přípravky a kontaminanty životního prostředí (Skálová et al. 2011).

Každé xenobiotikum, ať už je přijaté záměrně či nechtěně, představuje pro organismus potenciální zátěž a nebezpečí. Proto mají organismy vyvinuté systémy, kterými xenobiotika metabolizují. Obecným principem metabolismu xenobiotik je změna struktury xenobiotika s cílem omezit jeho vstup do dalších orgánů a tkání, snížit jeho potenciální toxicitu a usnadnit jeho eliminaci. Změnou struktury xenobiotika vznikají v organismu nové látky (metabolity), které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, jinou biologickou aktivitu a jiné chování v organismu (Skálová et al. 2011).

Ve vodě rozpustná xenobiotika v podstatě nepotřebují být metabolizována. Mohou se vyloučit v nezměněné formě například močí, potem apod. Lipofilní xenobiotika se mohou vyloučit žlučí, ale tato forma exkrece není z hlediska jejich možné reabsorpce ze střeva pro organismus efektivní. Proto podléhají metabolizaci, jejímž cílem je jejich polarizace a následné vyloučení z organismu ledvinami (Legáth 2004).

Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxikačních mechanismů. Tyto procesy probíhají ve všech živých systémech a jsou důležité pro zachování jedince, protože při velmi vysoké koncentraci nebo dlouhé době působení toxické látky dochází k ireverzibilnímu poškození organismu, a tím i k jeho zániku (Knejzlík et al. 2000).

Velký význam v obraně před takovými potenciálně nebezpečnými látkami mají enzymy metabolizující xenobiotika, tj. transportní proteiny a biotransformační enzymy. Transportní proteiny v plasmatických membránách významně regulují prostup xenobiotik do různých orgánů a tkání. Například transportní proteiny ve střevní stěně

aktivně „vyhazují“ xenobiotika, která pronikla difúzí do střevní buňky, zpět do lumen střeva, a tak omezují vstup lipofilních látek do organismu. Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika s cílem omezit jeho vstup do dalších tkání a orgánů, omezit jeho interakci s biomakromolekulami a urychlit jeho eliminaci. Vzniklý metabolit tak bývá většinou hydrofilnější než parentní látka. Bývá tak lépe rozeznatelný pro transportní a exkreceční systémy, čímž většinou dochází k urychlení eliminace (Skálová et al. 2011).

Metabolismus xenobiotik se rozděluje do tří fází. První fázi metabolizace léčiv představují oxidační, redukční a hydrolytické reakce. V této fázi jsou v molekule léčiv zaváděny nebo odkrývány reaktivní a hydrofilní skupiny. Ve druhé fázi biotransformace xenobiotika nebo jejich metabolity z první fáze podstupují konjugaci s endogenní sloučeninou. Za třetí fázi se potom považuje aktivní transport xenobiotik, jejich metabolitů nebo konjugátů přes membrány zprostředkovaný speciálními transportními proteiny (Cvilink et al. 2009a).

4.1 I. fáze biotransformace

V průběhu první fáze transformace dochází zpravidla k zavedení polární funkční skupiny do základní molekuly xenobiotika (Kotlářová & Skála 2011).

Tyto reakce tedy modifikují molekulu cizorodé látky tak, aby byla schopna konjugace s aminy, kyselinami a alkoholy (II. fáze detoxikace). Produkty těchto reakcí jsou látky mnohem lépe rozpustné ve vodě než původní xenobiotikum, takže nedochází k jejich akumulaci v tělních buňkách, ale jsou vyloučeny z těla ven (Knejzlík et al. 2000).

Mezi enzymatické biotransformující reakce patří alifatická a aromatická hydroxylace, epoxidace dvojných vazeb, N-dealkylace, N-oxidace, deaminace, probíhající v rámci nejznámějšího enzymatického systému cytochromu P450, ale i mimo něj (oxidace aminů, dehydrogenace a další). Nezbytnou součástí enzymatických oxidačně-redukčních procesů jsou kofaktory (Kotlářová & Skála 2011).

4.1.1 Enzymy biotransformující cizorodé látky oxidačními reakcemi

Nejpočetnější skupinou enzymů participujících na oxidaci xenobiotik jako jsou aromáty, fenoly, nitroaromáty, aromatické aminy a azobarviva jsou enzymy označované jako oxygenasy (nebo hydroxylasy), a to jak ze skupiny monooxygenas, tak i dioxygenas. Obě skupiny enzymů pro svoji aktivitu vyžadují molekulu kyslíku a přítomnost kofaktoru, který je schopný jej aktivovat. Jako kofaktory slouží např. přechodné kovy (nejčastěji nehemové i hemové Fe) nebo flaviny (Stiborová et al. 2004).

Oxidativní metabolismus zprostředkovávají také primárně antioxidační enzymy zahrnující peroxidasu, glutathionperoxidasu, katalasu, superoxididismutasu, thioredoxinreduktasu, cytochrome C peroxidasu nebo peroxiredoxiny. Přítomnost helmintů v těle hostitele vede k aktivaci imunitního systému hostitele a ke zvýšené produkci volných radikálů, proto mají helminti řadu enzymů, které je před oxidanty chrání. Tyto enzymy jsou pro parazita nezbytné pro to, aby byla udržena buněčná redoxní rovnováha a odstraněny ROS³ vznikající jako důsledek právě imunitní odpovědi hostitele nebo jeho vlastního metabolismu (Bártíková et al. 2010b). Systém, který parazity chrání před oxidativním stresem, je pochopen relativně dobře (Cvilink et al. 2009a).

4.1.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) hrají klíčovou úlohu v metabolismu xenobiotik a jsou rovněž významnými enzymy v metabolismu některých eobiotik. CYP jsou enzymy výjimečné nejen svým významem, ale i počtem substrátů, počtem katalytických aktivit a indukovatelností, vyskytují se v neobvykle vysokém počtu isoform (Skálová et al. 2011).

Oxidace značného množství xenobiotik v bakteriích, houbách, rostlinách, hmyzu a obratlovcích je zprostředkována CYP. I přes to, že je monooxidasová aktivita CYPu v přírodě široce rozšířena, pokusy detekovat je v helmintech byly po mnoho let neúspěšné a helminti byli považováni za výjimečné organismy, které CYP postrádají.

³ Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

Tento názor se ale změnil s vývojem genetické analýzy, která poskytla důkaz o tom, že v genomu *Caenorhabditis elegans* existují geny pro CYP. Genom *C. elegans* obsahuje 80 genů kódujících CYP, které patří do rodiny CYP 35, a gen pro CYP reduktasu (Cvilink et al. 2009a). Geny pro CYP byly také nalezeny v mitochondriálním genomu ektoparazitického komára *Romanomermis culicivorax* (Cvilink et al. 2009a, Azevedo & Hyman 1993).

Typická CYP-monooxygenasová aktivita, epoxidace aldrinu a deethylace ethoxykumarinu, byla objevena i v mikrosomech izolovaných z L1 a L3 larev *H. contortus* (Cvilink et al. 2009a, Kotze 1997). Vysoká aktivita CYP byla pozorována i v dospělých *Schistosoma mansoni* (Cvilink et al. 2009a).

Byla prokázána i nízká aktivita aminopyrin N-dealkylasy u L1 a L2 larev *Heligmosomoides polygyrus*. Aktivita tohoto enzymu byla inhibována benzimidazolem, inhibitorem CYPu, což ukazuje na účast CYPu v této reakci (Cvilink et al. 2009a, Kerboeuf et al. 1995).

V dalším experimentu byla prokázána zvýšená toxicita rotenonu v přítomnosti piperonylbutoxidu u dospělců a larev *H. contortus* a larev *Trichostrongylus colubriformis*. U savců a hmyzu je rotenon metabolizován CYPem, piperonylbutoxid (CYP inhibitor) sám žádnou toxicitu vůči helmintům nevykazuje. Synergismus rotenonu a piperonyl butoxidu tak odpovídá předpokladu, že CYP se v helmintech účastní detoxikace rotenonu (Cvilink et al. 2009a, Kotze et al. 2006).

Oxidativní cesty biotransformace zprostředkované cytochromem P450 se ale u parazitů díky snížené koncentraci kyslíku v prostředí střeva zdají být méně důležité v porovnání s volně žijícími larválními stádii (Cvilink et al. 2009a, Kotze et al. 2006).

4.1.1.2 Peroxidas

Peroxidas jsou rozsáhlou nadrodinou hemoproteinů, které patří k nejvýznamnějším intracelulárním enzymovým antioxidantům (Skálová et al. 2011). Jsou však také skupinou enzymů, které jsou schopny oxidovat xenobiotika (Cvilink et al. 2009a).

Peroxidas redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní látky nebo xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny

peroxidasy je schopnost detoxikovat H_2O_2 , zatímco spektrum oxidovaných sloučenin je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifitou se peroxidasy blíží monooxygenasovému systému obsahujícímu cytochrom P450 (Stiborová et al. 2004).

Peroxidasy helmintů byly studovány hlavně z hlediska jejich antioxidační aktivity (Cvilink et al. 2009a).

4.1.1.3 Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou rodinou proteinů skládající se z enzymů, které katalyzují chemické reakce prostřednictvím vázaného kofaktoru flavinu (Cashman 1995).

U obratlovců je FMO důležitým biotransformačním enzymem katalyzujícím oxidaci heteroatomu nukleofilních xenobiotik (Cvilink et al. 2009a). FMO připojují molekulu kyslíku na nerozpustné nukleofilní sloučeniny s cílem zvýšit jejich rozpustnost, a tím i jejich vylučování (Eswaramoorthy et al. 2006). Zdrojem redukčních ekvivalentů pro jimi katalyzované reakce je NADPH. Katalyzují oxidaci mnoha organických sloučenin s nukleofilním heteroatomem i některých anorganických iontů (HS⁻, I⁻, CNS⁻) (Skálová et al. 2011). Prostřednictvím FMO může docházet k oxidaci řady xenobiotik. Genom *C. elegans* obsahuje 5 genů kódujících domnělé homology FMO savců (Cvilink et al. 2009a).

4.1.1.4 Další enzymy s oxidační aktivitou

Alkoholdehydrogenasy katalyzují oxidaci nejen ethanolu, ale i dalších primárních a sekundárních alkoholů za vzniku příslušných aldehydů a ketonů. Jako donor redukčních ekvivalentů přednostně využívají koenzym NADH (Skálová et al. 2011).

Aldehydy a ketony vzniklé oxidací alkoholů bývají velmi reaktivní. Jejich následnou detoxikaci oxidací na karboxylové kyseliny nejčastěji katalyzují aldehyddehydrogenasy (ALDH). Tato široká nadrodina enzymů se vyskytuje jak v cytosolu, tak i v mitochondriích a mikrosomech (Skálová et al. 2011).

Kromě ALDH se na oxidaci aldehydů mohou podílet také aldehydoxidasy a xanthinoxidasy. Tyto cytosolické enzymy jsou souhrnně označovány jako molybdenové hydroxylasy, protože obsahují ve své molekule atom molybdenu. Katalyzují oxidaci řady eobiotických i xenobiotických aldehydů a N-heterocyklických sloučenin (Skálová et al. 2011).

4.1.2 Enzymy biotransformující cizorodé látky redukčními reakcemi

Redukční reakce participují na biotransformaci xenobiotik v menší míře než reakce oxidační. S tím souvisí i skutečnost, že rovněž enzymy katalyzující redukční reakce jsou charakterizovány daleko méně. Jejich identifikace a charakterizace však nabývají v poslední době na významu (Stiborová et al. 2004).

Alkoholy, aldehydy a ketony jsou často metabolizovány reduktasami (dehydrogenasami). Tyto enzymy jsou klasifikovány do tří skupin: dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldoketoreduktasy (AKR). Substráty reduktas nejsou pouze xenobiotika, ale také několik endogenních sloučenin. Redukce je méně častá biotransformační cesta než oxidace, ale u ketonů, aldehydů, chinonů, nitrosloučenin, N-oxidů a S-oxidů představuje redukce hlavní metabolickou cestu (Cvilink et al. 2009a).

Metabolismus redukčními reakcemi je hlavní metabolickou cestou sloučenin nesoucích karbonylové skupiny. Homogenát *Hymenolepis diminuta* účinně redukoval několik aldehydů, preferovaným kofaktorem této reakce při tom bylo NADPH. Na druhou stranu u této tasemnice nebyla detekována redukce xenobiotických ketonů (Cvilink et al. 2009a, Munir & Barrett 1985).

Tak jak redukce karbonylové skupiny představuje hlavní deaktivující cestu, která chrání organismus před toxickými účinky reaktivních aldehydů a ketonů, významná aktivita enzymů redukujících karbonyly může také pomoci *H. contortus* neutralizovat účinek anthelmintik nebo dalších xenobiotik nesoucích karbonylovou skupinu (Cvilink et al. 2008a).

Redukční biotransformace je důležitou cestou metabolizace azo- a nitrosloučenin. Tento typ metabolizace byl detekován u několika druhů helmintů.

A. lumbricoides a *M. expansa* jsou schopné redukovat aromatické nitrosloučeniny, azobenzen, azobarviva a sulfoxid (Cvilink et al. 2009a, Precious & Barrett 1989).

4.1.3 Enzymy biotransformující cizorodé látky hydrolytickými reakcemi

Enzymy ze třídy hydrolas katalyzují štěpení látky za účasti vody. Jsou to enzymy tvořené pouze polypeptidovým řetězcem, neobsahují žádnou prostetickou skupinu a nevyžívají žádné kofaktory. Nejčastěji se jedná o adici vody na estery, amidy a epoxidy. Také některé metabolity druhé fáze biotransformace (např. konjugáty s glutathionem, sulfátem, kyselinou glukuronovou) mohou být hydrolyzovány zpět na původní léčivo (Skálová et al. 2011).

Hydrolasy byly biochemicky detekovány i u parazitických helmintů (Bártíková et al. 2010b). Parazité se zdají být dobře vybaveni esterasy, zahrnujícími fosfatasy schopné hydrolyzovat nitrofenylfosfáty a organofosfáty. *A. lumbricoides* a *M. expansa* mají esterasy schopné hydrolyzy nitrofenyl-, p-aminobenzoyl-, naftyl-, metylumbelliferyl esteru a akrylamidů (Cvilink et al. 2009a). Homogenát *H. diminuta* hydrolyzoval řadu organických fosfátů, sulfátů a esterů (Cvilink et al. 2009a, Munir & Barrett 1985).

4.2 II. fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace se nazývá konjugační nebo též syntetická (Kotlářová & Skála 2011). Sloučenina, která vstupuje do konjugační reakce, musí mít ve své molekule skupinu vhodnou pro reakci s konjugačním činidlem za vzniku stabilního produktu. Tato skupina je buď v xenobiotiku obsažena, nebo se vytvoří v první fázi biotransformace (Knejzlík et al. 2000).

Dochází v ní k interakci vzniklého biotransformačního meziproductu z první fáze s tzv. konjugačním činidlem, výsledkem čehož je zpravidla látka velmi polární, disociovaná v prostředí buněčného pH. Výsledný produkt těchto dvou kroků již není schopen se reabsorbovat, a je proto vyloučen z organismu (Kotlářová & Skála 2011).

Konjugační činidlo je látka organismu vlastní (glycin, glutamin, glutathion, kyselina glukuronová, kyselina octová a kyselina sírová). Mezi enzymy podílející se na druhé fázi biotransformace řadíme UDP-glukuronyltransferasu, sulfottransferasu, glutathion-S-transferasu, N-acetyltransferasu. Zajímavostí je, že některé z těchto enzymů vykazují genetický polymorfismus, tzn. geneticky danou predispozici k funkčnosti těchto enzymů (Kotlářová & Skála 2011).

4.2.1 Konjugace s glutathionem

Glutathion hraje důležitou roli v buněčném metabolismu, tudíž i v metabolismu xenobiotik (Legáth 2004). S glutathionem jsou většinou konjugovány elektrofilní sloučeniny (Cvilink et al. 2009a).

Glutathion je v buňce katalyzovaný řadou isoenzymů známých pod názvem glutathion-S-transferasy (GST). GST katalyzují reakci mezi glutathionem a alifatickými a aromatickými epoxysloučeninami, stejně tak i s alifatickými a aromatickými halogeny (Legáth 2004).

Kofakterm je endogenní tripeptid glutathion, který je v organismu syntetizován z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu (Skálová et al. 2011). Vyskytuje se ve dvou formách, v redukované formě jako thiol (GSH) a oxidované formě jako disulfid (GSSG) (Knejzlík et al. 2000).

Thiolová skupina cysteinu propůjčuje GSH slabě nukleofilní vlastnosti, díky čemuž je GSH schopen vytvářet konjugáty s xenobiotiky či častěji s jejich metabolity, které mají elektrofilní vlastnosti. GSH konjugáty jsou buď z těla vyloučeny žlučí (Skálová et al. 2011), nebo se dále hydrolyzují za současného uvolnění glutamylových a glycinových zbytků. Následuje N-acetylace za pomoci enzymu acetyltransferasy. Konečným produktem jsou merkaptoderiváty kyseliny močové, které jsou dobře rozpustné ve vodě a lehko vylučitelné močí (Legáth 2004).

GST je přítomná ve všech tkání, ale zejména v játrech (Legáth 2004). Byla nalezena v cytosolu a mikrosomech jaterních buněk (Knejzlík et al. 2000).

Aktivita GST je rovněž zapojena do ochrany tkáně před poškozením způsobeným tvorbou reaktivních peroxidů, vzniklých buď činností endogenního metabolismu parazita, nebo imunitního systému hostitele (Cvilink et al. 2009a).

Aktivita GST byla detekována v řadě helmintů, zdá se být jejich hlavním detoxifikačním enzymem (Brophy et al. 1989). V relativně vysokém množství je obvykle v cytosolu (Brophy et al. 2012). Mezi tyto helminty patří škrkavky, motolice a tasemnice. Nejvyšší aktivita byla zjištěna u tasemnic, aktivita se zdá být vyšší u helmintů žijících ve střevě než u těch žijících v krvi nebo ve tkáních. Jedná se např. o *F. hepatica*, *S. mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *A. lumbricoides* a *A. suum*, *Onchocera volvulus*, *H. diminuta*, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* i *M. expansa* a další. Vždy se vyskytuje v několika různých isoformách (Cvilink et al. 2009a).

4.2.2 Konjugace s kyselinou glukuronovou

Nejvýznamnější konjugačním systémem je vazba biotransformovaného xenobiotika na deriváty kyseliny glukuronové (Legáth 2004).

Kofaktorem glukurodinace je UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA), která je v organismu tvořena oxidací UDP-glukosy za katalýzy enzymem UDP-glukosadehydrogenasou (Skálová et al. 2011).

Glukurodinaci podléhají sloučeniny obsahující nukleofilní heteroatom (O,N,S). Typickými substráty jsou alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny tvořící O-glukuronidy, aminy a amidy tvořící N-glukuronidy a thiooly pro tvorbu S-glukuronidů. Vzácně mohou některé sloučeniny vytvářet i C-glukuronidy (Skálová et al. 2011).

Reakci katalyzuje UDP-glukuronyltransferasa (UGT) (Knejzlík et al. 2000), membránový enzym hladkého endoplasmatického retikula (mikrosomů). UGT je členěna do rodin a podrodin podle aminokyselinové sekvence (Skálová et al. 2011). Podobně jako u CYP 450 jsou jednotlivé isoformy UGT indukovány jednotlivými skupinami látek (Knejzlík et al. 2000).

4.2.3 Sulfonace, acetylace, methylace

Při sulfátové konjugaci dochází k esterifikaci hydroxylované sloučeniny kyselinou sírovou. Do reakce vstupují hlavně fenoly, alkoholy, katecholy a hydroxylaminy. Vstupující sulfát je v aktivované formě (3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát). Z hepatocytů byly izolovány čtyři sulfotransferasy, které nejsou indukovány

xenobiotiky. Tato reakce je částečnou alternativou ke glukuronidaci (Knejzlík et al. 2000).

Sulfonovány bývají často metabolity vzniklé např. hydroxylací, redukcí karbonylu, N-dealkylací apod. v první fázi biotransformace. Produkty sulfonace, organické sulfáty, jsou látky polární, snadno eliminovatelné močí nebo žlučí. Některé sulfáty jsou nestabilní a podléhají hydrolýze za vzniku reaktivních elektrofilních sloučenin, které mohou vytvářet adukty s DNA a vyvolat karcinogenezi (Skálová et al. 2011).

Acetylace představuje důležitou metabolickou cestu pro látky obsahující aminoskupinu. Reakci katalyzuje N-acetyltransferasa, která se vyskytuje v cytoplazmě ve dvou různých formách, které podléhají odlišné regulaci (Knejzlík et al. 2000). Donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A, který je základní molekulou intermediárního metabolismu živin, a tudíž se v organismu vyskytuje v relativně hojném množství. Vzniklé aromatické acetamidy jsou většinou vylučovány močí (Skálová et al. 2011).

Byla dokázána schopnost *Brugia pahangi* katalyzovat biogenní aminy jako je serotonin, oktopamin a dopamin, a to N-acetylací. Tato enzymatická reakce vyžaduje adici acetyl-CoA. Detekována byla také aktivita N-acetyltransferasy u *Ascardia galli*, což naznačuje možnost acetylace xenobiotik u tohoto helminta. Z *A. suum* byl izolován cytosolický enzym, který v přítomnosti acetyl-CoA katalyzuje acetylaci diaminů. Acetylace běžně se vyskytujících biogenních aminů byla popsána také u *F. hepatica* a *C. elegans* (Cvilink et al. 2009a, Isaac et al. 1990).

Nejmenší význam pro biotransformaci xenobiotik má methylace (Knejzlík et al. 2000). Methylová skupina může být navázána přes kyslík, dusík nebo síru (Skálová et al. 2011). Methyltransferasy přenáší methyl z S-adenosylmethioninu na vhodný substrát. Všechny methylační reakce probíhají v cytosolu hepatocytů a buňkách nervového vlákna (Knejzlík et al. 2000). Methylace je v podstatě jedinou konjugační reakcí, při které dochází k zvýšení lipofility sloučenin (Skálová et al. 2011).

4.2.4 Konjugace se sacharidy

Nejčastější sacharid vystupující v konjugačních reakcích je glukosa. Do reakce vstupuje ve formě UDP-glukosy za vzniku β -glukosidu. Přesná tkáňová lokalizace reakce není doposud známa. Některé dusíkaté látky jsou konjugovány s hydroxylovou skupinou ribosy za vzniku N-ribosidů (Knejzlík et al. 2000).

Konjugace toxinů s glukosou se vyskytuje hlavně u rostlin, u živočichů méně, nicméně u některých parazitických nematod byla zjištěna, a to díky glukosidům albendazolu produkovanými *C. elegans* (Brophy et al. 2012). Dále byly zjištěny glukosové konjugáty FLU u *Haemonchus contortus* (Vokřál et al. 2012).

4.3 III. fáze biotransformace

Poslední, třetí fázi biotransformace xenobiotika je jeho aktivní transport prostřednictvím transmembránového přenašeče ven z buněčného prostředí do mezibuněčného prostoru (Kotlářová & Skála 2011), protože hydrofilní konjugát nebo metabolit není schopen samovolně přecházet přes lipidovou dvojvrstvu (Cvilink et al. 2009a). Přenašeče (transportéry) jsou proteiny lokalizované v membráně (nejčastěji cytoplasmatické) (Skálová et al. 2011).

Jsou rozlišovány hlavní dva druhy transportérů: transportéry importující xenobiotika do buňky a transportéry exportující xenobiotika nebo jejich metabolity ven z buňky. Přičemž druhý typ transportéru je studován mnohem víc, vzhledem k jeho významu pro rezistenci. Hlavní skupinou exportujících transportérů jsou ATP-binding cassette (ABC) transportéry (Cvilink et al. 2009a).

V metabolismu xenobiotik zprostředkovávají ABC přenašeče aktivní eflux jak lipofilních xenobiotik, které přechází přes cytoplasmatickou membránu, tak i hydrofilních metabolitů a konjugátů, které jsou vytvořeny v průběhu biotransformace prostřednictvím biotransformačních enzymů (Cvilink et al. 2009a).

V genomu *C. elegans* byla nalezena rozsáhlá skupina 60 genů kódujících proteiny obdobné ABC přenašečům. Výzkum lékových transportérů je zaměřený hlavně na P-glykoprotein, což je nejznámější transportér a hlavní efluxní pumpa zapojena do metabolismu xenobiotik (Cvilink et al. 2009a). Na základě shromážděných důkazů se zdá, že P-glykoprotein je nejdůležitějším efluxním transportérem podílejícím se na

farmakokinetice léčiv. Jedná se o primární jednosměrný transportér získávající energii z hydrolyzy ATP (Skálová et al. 2011).

První P-glykoprotein popsáný u helmintů byl identifikován u *C. elegans*, poté byly geny pro P-glykoprotein nalezeny i u řady motolic (např. *S. mansoni*, *F. hepatica*) a hlístic (*H. contortus* a *Onchocerca sp.*) (Cvilink et al. 2009a).

Mnoho transportních proteinů zprostředkovává hlavně transport eobiotických substrátů, avšak několik desítek membránových proteinů transportuje převážně xenobiotika. Řada transportérů endogenních substrátů však současně transportuje některá xenobiotika na základě strukturální podobnosti s endogenními substráty (Skálová et al. 2011).

P-glykoprotein (ABCB1) je považován za součást detoxikačního systému, jehož hlavní úlohou je eliminace lipofilních látek z těla. Tuto představu podporuje především skutečnost, že geneticky manipulované myší kmeny postrádající myší homology P-glykoproteinu jsou životaschopné bez projevů patologických změn, avšak jsou citlivější k toxickému poškození xenobiotiky (Kotlářová & Skála 2011).

Celkově se ve všech třech fázích biotransformace jedná o proces energeticky velmi náročný. Tyto energeticky dependentní procesy jsou zcela závislé na správné funkci mitochondrií, resp. dýchacím řetězci a Krebsově cyklu (Kotlářová & Skála 2011).

Experimentální část

5 Cíl práce

Cílem této práce bylo stanovit schopnost tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) biotransformovat anthelmintika albendazol (ABZ), flubendazol (FLU) a mebendazol (MBZ). Dalším cílem bylo stanovit aktivitu biotransformačních enzymů, které se biotransformace účastní.

Konkrétně lze cíle práce shrnout takto:

- Stanovit biotransformaci ABZ, FLU a MBZ v *in vitro* experimentech, tzn. po inkubaci subcelulárních frakcí s roztoky anthelmintik.
- Stanovit biotransformaci ABZ, FLU a MBZ v *ex vivo* experimentech, tzn. po inkubaci živých tasemnic v roztocích anthelmintik.
- Na základě daných metodik stanovit aktivitu biotransformačních enzymů (oxidačních, redukčních a konjugačních).

6 Biologický materiál, chemikálie, přístroje

6.1 Biologický materiál

Tasemnice byly získány proplachováním střev ovcí fyziologickým roztokem. Následně byly ještě několikrát opláchnuty fyziologickým roztokem a přemístěny na Petriho misku s PBS pufrem. Na přípravu subcelulárních frakcí z tasemnic byly použity první 2/3 strobily se scolexem, které byly uloženy v hlubokomrazícím boxu při -80 °C (Jouan VXE Series Thermo Scientific) až do zpracování frakcí (viz kap. 7.2). Tasemnice pro *ex vivo* inkubaci byly po opláchnutí fyziologickým roztokem ještě opláchnuty PBS pufrem s přídatkem antibiotik (penicilin 6 mg/ml, streptomycin 10 mg/ml), v tomto roztoku byly ponechány v inkubátoru cca 15 minut. Dalším krokem byla inkubace v médiu s anthelmintiky (viz kap.7.5).

6.2 Chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (Fluka)

4-pyridinkarboxaldehyd (Aldrich)

Albendazol (Sigma)

Acenaftenol (Aldrich)

BCA (Sigma)

Daunorubicin (přípravek Daunoblastina, držitel rozhodnutí o registraci Pfizer Europe MA EEIG)

EDTA (Sigma)

Flubendazol (Toronto Research Chemicals)

Glukosa-6-fosfát (Sigma)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (Sigma)

Glutathion oxidovaný (Koch-Light Laboratories)

Glutathion redukovaný (Fluka)

Mebendazol (Fluka)

Menadion (Sigma)
Metyrapon (Fluka)
n-oktylamin (Aldrich)
NADP⁺ (Merck)
NADPH (Merck)
OPD (Sigma)
p-nitrofenol (Fluka)
PBS (Sigma)
Resorufiny (Sigma-Aldrich)
SOD Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies)
Thiobenzamid (Fluka)
UDP-glukuronová kyselina (Sigma)

Další běžné chemikálie byly použity v té nejvyšší kvalitě (od firmy Fluka, Kulich, Penta, Sigma a dalších).

6.3 **Přístroje**

Analytické váhy Scaltec SBC 31
Beckman Coulter Avanti J-30I Centrifuge
Centrifuga Eppendorf 5415D
Concentrator Eppendorf 5301
Digitální pH-metr Thermo Orion model 410
Eppendorf Thermomixer comfort
Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge
HPLC chromatograf Shimadzu
IKA MS2 Mini Shaker

IKA Vortex Genius 3

Jouan VXE Series Thermo Scientific

Pístový homogenizátor Potter – Elvehjem

Spektrofluorimetr Perkin Elmer LS 50B

Tecan Infinite M 200

UV-VIS spektrofotometr HELIOS β

7 Pracovní postup

7.1 Příprava pufrů

0,1 M fosfátový pufr (pH 6,5, pH 7,4)

0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 358,14$) byl smísen s 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 156,01$) v takovém poměru, aby byla získána potřebná hodnota pH.

60 mM sodno-draselný fosfátový pufr (pH 7,4)

60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ byl smísen s 60 mM KH_2PO_4 v takovém poměru, aby byla získána potřebná hodnota pH.

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 6,0, pH 7,0, pH 7,4, pH 8,0)

0,1 M K_2HPO_4 byl smísen s 0,1 M KH_2PO_4 v takovém poměru, aby byla získána potřebná hodnota pH.

0,2 M TRIS-HCl pufr (pH 8,5)

0,2 M roztok tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS; $M_r = 121,1$) v redestilované vodě, pH bylo upraveno pomocí 0,2 M kyseliny chlorovodíkové (HCl).

0,1 M TRIS-HCl pufr (pH 8,9)

0,1 M roztok TRISu v redestilované vodě, pH bylo upraveno pomocí 0,1 M HCl.

0,275 M TRIS-HCl pufr (pH 7,4)

0,275 M roztok TRISu v redestilované vodě, pH bylo upraveno pomocí 1 M HCl.

50 mM TRIS-HCl pufr s 0,1% Tritonem X-100 (pH 8,0)

50 mM roztok TRISu v redestilované vodě, pH bylo upraveno pomocí 1 M HCl, tento roztok byl smísen s Tritonem X-100.

7.2 Příprava subcelulárních frakcí

Subcelulární frakce byly získány z tasemnic uchovaných v hlubokomrazícím boxu. Biologický materiál (rozcvičen po 5,5 g) byl vpraven do 30 ml homogenizátoru s 10 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru o pH 7,4 a zhomogenizován pohybem pístu

nahoru a dolu. Píst a homogenizátor byly vypláchnut dalšími 10 ml pufru. Zhomogenizovaný materiál byl přelit do centrifugačních kyvet.

Kyvety s homogenátem byly umístěny do centrifugy Heraeus s rotorem #3335 a stočeny na 5000 G po dobu 20 minut při 4 °C (1. točení). Peleta z tohoto točení obsahovala potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy, jádra.

Supernatant z 1. točení byl přelit do čistých kyvet a stočen ve stejném rotoru na 20 000 G po dobu 60 minut při 4 °C (2. točení). Peleta z tohoto točení již obsahovala mitochondrie (mit) a supernatant byl použit pro získání dalších frakcí.

Peleta s mitochondriemi byla resuspendována v 5 ml pufru a obsah doplněn do výšky asi 2 cm pod horní okraj a znovu po dobu 60 minut stočen na 20 000 G při 4 °C (3. točení). Supernatant z tohoto točení byl vylit a peleta resuspendována v tolika mililitrech pufru s 20% glycerolem, které odpovídaly jedné polovině gramů tasemnice zhomogenizované v příslušné kyvetě. Obsah kyvety byl slit do kádinky a zhomogenizován. Poté byl homogenát obsahující mitochondrie přelit do čisté kádinky s míchadlem a za stálého míchání rozpipetován po 300 µl do mikrozkušavek.

Supernatant z 2. točení byl slit do centrifugačních kyvet pro ultracentrifugu Beckman. Kyvety byly vloženy do rotoru a centrifuga spuštěna na 105 000 G na dobu 65 minut při 4 °C (4. točení). Supernatant z tohoto točení obsahoval cytosol (cyt). Za stálého míchání na míchače byl po 1 ml rozpipetován do mikrozkušavek.

Peleta ze 4. točení byla resuspendována v 5 ml pufru, obsah zhomogenizován a kyvety doplněny do výšky asi 2 cm pod okraj a obsah byl znovu stočen na v ultracentrifuze Beckman. Po stočení byl supernatant vylit a peleta obsahující mikrosomy (mik) byla zhomogenizována v pufru s 20% glycerolem (množství pufru v ml odpovídalo polovině gramů zhomogenizovaných tasemnic). Tento homogenát byl slit do čisté kádinky a za stálého míchání na míchače po 300 µl rozpipetován do mikrozkušavek.

Všechny takto připravené frakce byly ihned zamrazeny na -80 °C v hlubokomrazícím boxu.

7.3 BCA stanovení bílkoviny

Principem tohoto stanovení je reakce proteinů s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Cu^{2+} touto reakcí přecházejí na Cu^+ , které v prostředí kolem pH 10 vytvářejí stabilní modrofialový komplex s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Intenzita zabarvení je pak přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance tohoto komplexu se měří při 562 nm (Smith et al. 1985).

Použité roztoky:

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

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

Pracovní roztok C: roztok A se smísil s roztokem B v poměru 50 : 1

Pro stanovení proteinů ve frakci bylo nejdříve třeba vytvořit kalibrační křivku za využití 1% roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). Jednotlivé roztoky o daných koncentracích pro stanovení kalibrační křivky byly připraveny podle tabulky 1.

Tabulka 1 Příprava roztoků pro kalibrační křivku

roztok	koncentrace ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	roztok 1% BSA (μl)	redestilovaná voda (μl)
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Biologické frakce (cyt, mik, mit) byly před stanovením 20x naředěny redestilovanou vodou. Ředění bylo uděláno dvakrát, z každého ředění byly připraveny 4 paralelní vzorky (tzn. 2x4 paralelní vzorky).

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 μ l vzorku bílkoviny (biologické frakce (mik, mit, cyt) a roztoky BSA pro kalibrační křivku) a 200 μ l pracovního roztoku. Tato směs byla dobře promíchána a inkubována při 37 °C 30 minut. Po inkubaci byla změřena absorbance při 562 nm na čtečce Tecan Infinite M 200.

Od naměřených hodnot absorbance (A) byla odečtena průměrná hodnota absorbance vzorků roztoku č.1, tzn. slepých vzorků (A_{sl}), čímž byla získána výsledná hodnota absorbance (A_{vysl}).

$$A_{vysl} = A - A_{sl} \quad (1)$$

Výsledné hodnoty absorbance byly následně zprůměrovány a z nich byla vytvořena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance jednotlivých vzorků na jejich koncentraci (μ g/ml).

Podle získané rovnice přímky

$$y = a * x, \text{ kde} \quad (2)$$

y...hodnota absorbance

x...koncentrace roztoků kalibrační křivky

a...koeficient,

a hodnot absorbance biologických frakcí byla dopočítána jejich koncentrace bílkovin (x_{vz}).

$$x_{vz} = y / a \quad (\mu\text{g/ml}) \quad (3)$$

Nakonec bylo zohledněno zředění (D), čímž byla získána výsledná koncentrace proteinů ve frakci (c_{vz}).

$$c_{vz} = x_{vz} * D \quad (\mu\text{g/ml}) \quad (4)$$

7.4 Biotransformace anthelmintik *in vitro*

Biotransformace anthelmintik *in vitro* byla stanovena po inkubaci biologických frakcí (mik, mit, cyt) s roztoky anthelmintik, a to s albendazolem (ABZ), mebendazolem (MBZ) a flubendazolem (FLU). Koncentrace parentních látek i jejich metabolitů byla detekována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Použité roztoky:

1 mM roztok substrátu, tzn. ABZ ($M_r = 265,34$), MBZ ($M_r = 294,29$), FLU ($M_r = 313,29$), v DMSO

3 mM roztok NADPH ($M_r = 833,35$) v redestilované vodě

0,1 M sodno-fosfátový pufr (pH 7,4)

octan ethylnatý

koncentrovaný amoniak

Do označených mikrozkušavek byly napipetovány 3 μl roztoku substrátu, 97 μl pufru a 100 μl roztoku NADPH a takto připravené mikrozkušavky byly umístěny do ledu. Poté bylo přidáno 100 μl biologické frakce (mik, mit, cyt) a mikrozkušavky byly důkladně promíchány.

Poté byly umístěny do termostatu vyhřátého na 37 °C (Eppendorf Thermomixer comfort) a při třepání (500 RPM) inkubovány po dobu 30 minut. Po 30 minutách byla inkubace ukončena ochlazením směsi na 0 °C a přidáním 30 μl koncentrovaného amoniaku.

Po ukončení inkubace bylo přidáno 700 μl octanu ethylnatého a směs byla 5 minut intenzivně třepána na třepačce (IKA Vortex Genius 3), poté byly mikrozkušavky přemístěny do centrifugy (Centrifuga Eppendorf 5415D) a stočeny po dobu 3 minut při 5000 otáček/min. Po stočení byla horní vrstva (obsahující anthelmintika a jejich metabolity v octanu ethylnatém) přenesena do čisté mikrozkušavky a extrakt byl odpařen v koncentrátoru (45 °C, 20 minut). Suché vzorky byly uchovávány v temnu a chladu.

Tímto způsobem byly připraveny vždy 3 paralelní vzorky pro každou biologickou frakci, dále 3 paralelní slepé chemické vzorky (bez biologické frakce, nahrazena pufrem) a 3 paralelní slepé biologické vzorky pro každou frakci (bez substrátu, se samotným DMSO).

Před HPLC analýzou byly suché vzorky rekonstituovány ve 200 μl směsi acetonitrilu a pufru (ACN : 0,025 M KH_2PO_4 = 30 : 70). Tato směs byla 10 minut protřepávána, na 5 minut vložena do ultrazvuku a nakonec byl obsah přenesen do inzertů pro HPLC. Na základě shody retenčních časů a velikosti píků byly s pomocí kalibrační křivky metabolity identifikovány a byla stanovena jejich koncentrace (ABZ-SO, ABZ-SO₂, MBZ-R, FLU-R). Metodika pro HPLC stanovení parentních léčiv i jejich metabolitů je detailně popsána v již publikovaných článcích (Cvilink et al. 2009b, Bártíková et al. 2012).

Proměřením vzorků na HPLC byla získána hmotnostní koncentrace metabolitu v jednotlivých frakcích (c). Výsledná hmotnostní koncentrace (c_{vysl}) byla pak získána odečtením naměřených hodnot koncentrace slepých biologických (c_{slb}) i chemických vzorků (c_{slch}).

$$C_{\text{vysl}} = C - C_{\text{slb}} - C_{\text{slch}} \quad (\text{ng/ml}) \quad (5)$$

Molární koncentrace (c_{mol}) byla získána vydělením výsledné hmotnostní koncentrace hodnotou molární hmotnosti metabolitů (M_r).

$$C_{\text{mol}} = \frac{C_{\text{vysl}}}{M_r} \quad (\text{nmol/ml}) \quad (6)$$

Poté byla molární koncentrace vynásobena celkovým objemem inkubační směsi (V, ml), čímž byla získána hodnota látkového množství metabolitu (n) na pipetované množství biologické frakce (V_E, ml). Dále bylo nutné zohlednit, že byl suchý vzorek rekonstituován pouze ve 200 µl směsi ACN/pufr (původní objem mikrozkušavek byl 300 µl).

$$n = \frac{c_{mol} * V}{1,5} \quad (\text{nmol}/0,1 \text{ ml E}) \quad (7)$$

Tato hodnota byla poté převedena na látkové množství metabolitu (n₁), které by vzniklo při použití 1 ml biologické frakce (E).

$$n_1 = n * \frac{1}{V_E} \quad (\text{nmol}/\text{ml E}) \quad (8)$$

Poté bylo vyjádřeno látkové množství metabolitu vzniklého za 1 minutu (n₂), a to vydělením dobou inkubace (t).

$$n_2 = \frac{n_1}{t} \quad (\text{nmol}/\text{min}/\text{ml E}) \quad (9)$$

Nakonec bylo zohledněno množství bílkovin (m_p) v biologické frakci, a tím získána výsledná hodnota specifické aktivity (a), což je množství metabolitu vzniklého za 1 minutu a vztaženého na množství proteinů v biologické frakci.

$$a = \frac{n_2}{m_p} \quad (\text{nmol}/\text{min}/\text{mg proteinu}) \quad (10)$$

7.5 Biotransformace anthelmintik *ex vivo*

Tasemnice byly po získání ze střev ovcí opláchnuty fyziologickým roztokem. Přední části tasemnic o délce cca 1 m byly po jednom rozděleny do kádinek a opláchnuty PBS pufrem s antibiotiky (penicilin 6 mg/ml, streptomycin 10 mg/ml), v němž byly ponechány 15 min v inkubátoru (38 °C, 5% CO₂).

Inkubace tasemnic probíhala v kultivačních lahvích v 20 ml média RPMI 1640 s roztoky anthelmintik (ABZ, FLU či MBZ) o koncentraci 10 μM. Výsledná koncentrace rozpouštědel nepřesahovala 0,1 % (ABZ byl rozpuštěn v methanolu, FLU a MBZ v DMSO). Byly připraveny i dva typy slepých vzorků: slepé chemické vzorky neobsahovaly biologický materiál; ve slepých biologických vzorcích byla místo roztoků anthelmintik přítomna pouze rozpouštědla. Tasemnice byly inkubovány v inkubátoru po dobu 24 h. V časovém intervalu po 2 h, 4 h a 8 h byl z jednotlivých kultivačních lahví odebrán 1 ml média. Po 24 h bylo odebráno veškeré médium a tasemnice byly 3x opláchnuty PBS pufrem. Média i tasemnice byly uchovány při -20 °C do zpracování na analýzu.

7.5.1 Stanovení anthelmintik v homogenátu

7.5.1.1 Homogenizace tasemnic po inkubaci

K tasemnici inkubované 24 hodin v roztocích jednotlivých anthelmintik bylo přidáno poměrné množství pufru a směs byla zhomogenizována. Po homogenizaci byl změřen celkový objem homogenátu (viz tabulka 2).

Tabulka 2 Příprava homogenátu

	hmotnost tasemnice (g)	objem pufru (ml)	celkový objem (ml)
ABZ 1.tasemnice	11,08	15	25,5
ABZ 2.tasemnice	6,25	12	18,5
FLU 1.tasemnice	7,66	13	20
FLU 2.tasemnice	10,18	15	25,5
MBZ	9,36	17	27,5
SLB (MeOH)	10,72	15	25,5
SLB (DMSO) 1.tasemnice	6,63	12	18,5
SLB (DMSO) 2.tasemnice	8,94	17	27,5

Homogenát byl následně použit pro stanovení anthelmintik a jejich metabolitů v tasemnici.

7.5.1.2 Stanovení anthelmintik v homogenátu

U každého homogenátu byly stanoveny koncentrace anthelmintik a jejich metabolitů ve 4 paralelních vzorcích. Rovněž byly analyzovány i 4 paralelní vzorky homogenátu slepých biologických vzorků (tasemnice inkubované v médiu s čistým DMSO nebo MeOH).

Do mikrozkuvek bylo ke 300 μ l homogenátu přidáno 30 μ l koncentrovaného amoniaku a 700 μ l octanu ethylatého. Tato směs byla 5 minut intenzivně protřepávána, následně byly mikrozkuvky přemístěny do centrifugy (Centrifuga Eppendorf 5415D) a stočeny při 5000 ot./min po dobu 3 minut. Horní vrstva byla odebrána do čistých označených mikrozkuvek a odpařena na koncentrátoru (cca 20 min při 45 °C). Suché vzorky byly uschovány v temnu a chladu.

Koncentrace anthelmintik a jejich metabolitů byly stanoveny na HPLC (viz kap. 7.4), a to v ng/ml.

Poté bylo nutné zohlednit objem nástřiku u kalibrace a vzorků a také fakt, že byl suchý vzorek rekonstituován pouze v 200 μ l směsi ACN/pufr namísto původně pipetovaného objemu 300 μ l. Následně byla tato hmotnostní koncentrace (c_{hm}) vydělena molární hmotností (M_r), čímž byla získána hodnota molární koncentrace (c_{mol}).

$$c_{mol} = \frac{c_{hm}}{M_r} / 1,5 \quad (\text{nmol/ml}) \quad (11)$$

Látkového množství (n) bylo získáno vynásobením hodnotou objemu pipetovaného homogenátu (V_{hom} ; tzn. 0,3 ml).

$$n = c_{mol} * V_{hom} \quad (\text{nmol}) \quad (12)$$

Nakonec bylo látkové množství (n) vztaženo na hmotnost tasemnice v 0,3 ml homogenátu ($m_{0,3}$), a tím získána výsledná hodnota látkového množství na 1 g tasemnice (n_{vysl}).

$$n_{vysl} = \frac{n}{m_{0,3}} \quad (\text{nmol/g tasemnice}) \quad (13)$$

7.5.2 Stanovení anthelmintik v médiu

Pro stanovení anthelmintik a jejich metabolitů v médiu bylo médium odebíráno v průběhu inkubace tasemnice v roztoku anthelmintik (ABZ v MeOH, MBZ v DMSO, FLU v DMSO) v předem stanovených intervalech, a to ve 2., 4., 8. a 24. hodině. Zároveň byly připraveny i slepé biologické vzorky (inkubace tasemnice v samotných rozpouštědlech (MeOH, DMSO), tzn. bez anthelmintika) a slepé chemické vzorky

(inkubace s anthelmintikem, ale bez tasemnice), odkud odběr média probíhal ve stejných intervalech.

Stanovení probíhalo stejným způsobem jako při stanovení anthelmintik v homogenátu, použito bylo 300 μl média (místo 300 μl homogenátu). Byly připraveny 3-4 paralelní vzorky média a 3 paralelní slepé biologické vzorky z každého intervalu odebírání, dále 4 paralelní slepé chemické vzorky.

Koncentrace anthelmintik v homogenátu byla stanovena v ng/ml . Bylo nutné zohlednit objem nástřiku u kalibrace a vzorků a také fakt, že suchý vzorek byl rekonstituován pouze v 200 μl směsi ACN/puftr namísto původně pipetovaného objemu média, tzn. 300 μl . Následně byla podle rovnice (11) tato hmotnostní koncentrace (c_{hm}) převedena na koncentraci molární (c_{mol} ; nmol/ml). Výsledná hodnota je udávána v $\mu\text{mol/l}$ média.

7.6 Stanovení aktivity oxidačních enzymů

7.6.1 Stanovení aktivity katalasy

Principem tohoto stanovení je tvorba žlutého komplexu, který vzniká po reakci molybdenanu amonného s peroxidem vodíku za katalytického působení katalasy (CAT). Jeho absorbance se poté měří na čtečce Tecan Infinite M 200 při 405 nm (Góth 2003).

Použité roztoky:

65 mM roztok peroxidu vodíku (152,4 μl bylo doplněno na 20 ml 60 mM sodno-draselným fosfátovým pufrem (pH 7,4)

32,4 mM roztok molybdenanu amonného (0,8 g molybdenanu amonného $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 20 ml redestilované vody)

60 mM sodno-draselný fosfátový pufri (pH 7,4)

Toto stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce, přičemž byla stanovena absorbance vzorku, blanku 1, blanku 2 a blanku 3 připravených podle tabulky 3.

Tabulka 3 Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení CAT

vzorek	blank 1	blank 2	blank 3
100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl pufru
20 µl frakce	100 µl molybdenanu amonného	20 µl pufru	20 µl pufru
Inkubace 1 minutu při 37°C při třepání.			
100 µl molybdenanu amonného	----	100 µl molybdenanu amonného	100 µl molybdenanu amonného
1 minutu nechat stát.			
----	20 µl frakce	----	---

Do blanku 1 bylo 20 µl frakce napipetováno co nejrychleji a ihned potom změřena absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite M 200 při 405 nm.

Aktivita katalasy byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$U = \frac{(A_{b11} - A_{vz})}{(A_{b12} - A_{b13})} * 390 \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml frakce}) \quad (14)$$

U...aktivita enzymu

A_{vz}...absorbance vzorku

A_{b11}...absorbance blanku 1

A_{b12}...absorbance blanku 2

A_{b13}...absorbance blanku 3

Vztažením na množství proteinu (m_p) v biologické frakci byla pak vyjádřena specifická aktivita enzymu (U_{sp}).

$$U_{sp} = \frac{U}{m_p} \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg proteinu}) \quad (15)$$

7.6.2 Stanovení glutathionreduktasové aktivity

Glutathionreduktasa (GR) je spolu s thioredoxinreduktasou (TrxR) důležitým enzymem, který hraje roli v obraně organismů před oxidačním stresem. Zatímco u savců existuje jak TrxR i GR, u ploštěnců (*Platyhelminthes*) sdružuje oba enzymy jeden enzym – thioredoxinglutathionreduktasa (TGR) (Bonilla et al. 2008). Tato metoda slouží právě ke stanovení glutathionreduktasové aktivity enzymu TGR.

Metoda je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za současné oxidace NADPH (Bonilla et al. 2008, Carlberg & Mannervik 1985).

Spotřeba NADPH byla zaznamenávána jako pokles absorbance, který byl měřen při 340 nm po dobu 6 minut na přístroji Tecan Infinite M 200. Stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce.

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 7,0)

5 mM roztok EDTA (1,86 mg/ml redestilované vody, Mr = 372,24)

2,5 mM roztok NADPH (2,08 mg/ml redestilované vody, Mr = 833,35)

4 mM roztok GSSG (2,45 mg/ml redestilované vody, Mr = 612,63)

Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 µl pufru, 40 µl EDTA, 50 µl GSSG, 10 µl NADPH a 50 µl biologické frakce (mik, mit, cyt). Ve slepých vzorcích byla biologická frakce nahrazena puftrem, cytosolická frakce byla před stanovením 5x naředěna. Absorbance byla měřena ihned po napipetování při 340 nm po dobu 6 minut. Stanoveny byly 4 paralelní vzorky každé biologické frakce a 4 paralelní slepé vzorky.

Z naměřených hodnot byla odečtena absorbance jednotlivých vzorků za 1 minutu (A/min).

$$A/\text{min} = \frac{A(1.\text{min}) - A(4.\text{min})}{3} \quad (16)$$

Po odečtení průměrné hodnoty absorbance za 1 minutu slepých vzorků (A/min_{sl}) byla pak získána výsledná hodnota absorbance za 1 minutu (A/min_{vysl}).

$$A/\text{min}_{vysl} = A/\text{min} - A/\text{min}_{sl} \quad (17)$$

U cytosolické frakce bylo zohledněno zředění.

Pomocí molárního extinkčního koeficientu ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$) byla vypočítána hodnota spotřebovaného NADPH za 1 minutu (c/min).

$$c/\text{min} = \frac{A/\text{min}_{vysl}}{\epsilon * d} \quad (\text{mmol/l/min}) \quad (18)$$

d...optická dráha

Vynásobením koncentrace celkovým objemem v jamce ($V; l$) pak byla vyjádřena aktivita enzymu (U_1) v pipetovaném objemu biologické frakce (V_E, ml).

$$U_1 = c/\text{min} * V \quad (\text{mmol/min}) \quad (19)$$

Z této hodnoty byla vyjádřena hodnota enzymové aktivity (U) v 1 ml biologické frakce (E).

$$U = U_1 * \frac{1}{V_E} \quad (\text{mmol/min/ml E}) \quad (20)$$

Specifická aktivita enzymu (U_{sp}) byla vypočítána podle rovnice (15).

7.6.3 Stanovení peroxidasy

Principem stanovení aktivity peroxidasy je oxidace o-fenylendiaminu (OPD), tato reakce probíhá pouze v přítomnosti peroxidu vodíku. Výsledný produkt (2,2'-diaminoazobenzen) byl stanoven spektrofotometricky, jeho množství odpovídá aktivitě peroxidasy.

Stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce, absorbance byla změřena na čtečce Tecan Infinite M 200 při 490 nm. Pro výpočet je třeba extinkční koeficient ($\varepsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Použité roztoky:

50 mM TRIS/HCl pufr s 0,1% Tritonem X-100 (pH 8,0)

Substrát: Nejprve byl připraven 1 mM roztok peroxidu vodíku (H_2O_2), a to doplněním 5,86 μl 30% H_2O_2 TRIS/HCl pufr s 0,1% Tritonem X-100 na 50 ml. V 1 ml tohoto roztoku byla poté rozpuštěna navážka 1,8107 mg OPD ($M_r = 181,07$) za vzniku 10 mM roztoku o-fenylendiamin dichloridu.

4 M roztok H_2SO_4 (55,06 ml 97% H_2SO_4 ($M_r = 98,08$, $\rho = 1,8364 \text{ g/cm}^3$) bylo doplněno redestilovanou vodou na 250 ml)

0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4)

Pro stanovení aktivity peroxidasy byly jednotlivé subcelulární frakce (mik, mit, cyt) 5x naředěny fosfátovým pufr s.

Do každé jamky na destičce bylo napipetováno 50 μl naředěné subcelulární frakce a 50 μl substrátu. Po promíchání byla směs inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Poté byla reakce zastavena přidáním 25 μl 4 M H_2SO_4 multikanálovou pipetou a nakonec změřena absorbance na čtečce Tecan Infinite M 200 při 490 nm.

Výsledná absorbance (A_{vysl}) byla vypočítána podle rovnice (1) a látkové množství (n) oxidovaného OPD v 10 μl frakce (tzn. 50 μl frakce 5x naředěných; E) vyjádřeno pomocí extinkčního koeficientu ($\varepsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a celkového objemu v jamce (V).

$$n = \frac{A_{\text{vysl}}}{d * \varepsilon} * V \quad (\text{mmol}) \quad (21)$$

d...optická dráha

Aktivita enzymu (U_1) v pipetovaném objemu biologické frakce (V_E , ml) byla získána vydělením dobou inkubace (t).

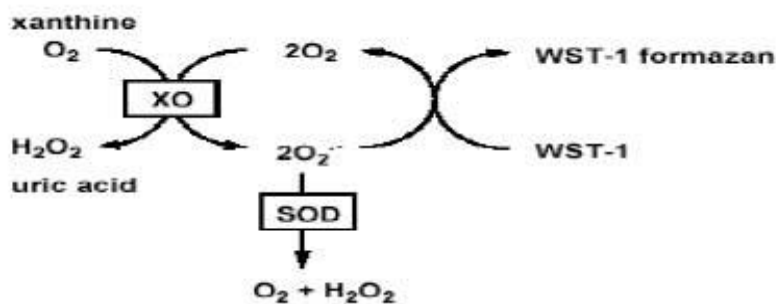
$$U_1 = \frac{n}{t} \quad (\text{mmol/min}/0,01 \text{ ml E}) \quad (22)$$

Nakonec byla podle rovnice (20) dopočítána aktivita enzymu v 1 ml biologické frakce (U) a podle rovnice (15) specifická aktivita enzymu (U_{sp}).

7.6.4 Stanovení aktivity superoxidodismutasy (SOD)

SOD, která katalyzuje dismutaci superoxidového anionu (O_2^-) na peroxid vodíku a molekulární kyslík, je jedním z nejdůležitějších antioxidačních enzymů.

Aktivita enzymu byla stanovena pomocí kitu *SOD Assay Kit-WST*. Jedná se o nepřímé stanovení využívající WST (sodná sůl (2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolia). Po redukci WST superoxidovým aniontem vzniká barvivo formazan, přičemž míra jeho redukce souvisí s aktivitou xanthinoxidasy (XO), na druhou stranu je ale tato redukce inhibována právě superoxidodismutasou (viz obrázek 9).



Obrázek 9 Vliv enzymů na vznik formazanu (SOD determination kit 2012)

Absorpční spektrum formazanu má maximum při 440 nm a míra absorbance odpovídá množství superoxidu. Aktivitu SOD lze poté kvantifikovat jako pokles absorbance.

Stanovení probíhalo na mikrotitrační destičce.

Obsah kitu: WST Solution, Enzym Solution, Buffer Solution, Dilution Buffer

Použité roztoky:

Pracovní roztok WST (p-WST): 1 ml WST Solution byl zředěn 19 ml Buffer Solution.

Pracovní roztok enzymu (p-enz): 15 μl Enzym Solution byl smísen s 2,5 ml Dilution Buffer

Do mikrotitrační destičky byly roztoky napipetovány podle tabulky 4.

Tabulka 4 Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení SOD

	vzorek	blank 1	blank 2	blank 3
frakce	20 μ l		20 μ l	
dd H ₂ O ^a		20 μ l		20 μ l
p-WST	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
ředicí pufr			20 μ l	20 μ l
p-enz	20 μ l	20 μ l		

^a redestilovaná voda

blank...slepý vzorek

Takto připravená mikrotitrační destička byla 20 minut inkubována při 37 °C a nakonec změřena absorbance při 450 nm.

Výsledná absorbance (A_{vysl}) byla spočítána podle vzorce:

$$A_{vysl} = (A1 - A3) - (AS - A2) \quad (23)$$

AS...absorbance vzorku

A1...absorbance blanku 1

A2...absorbance blanku 2

A3...absorbance blanku 3

Dále byla spočítána absorbance formazanu vzniklého za minutu (A/min).

$$A / \text{min} = A_{vysl} / t \quad (24)$$

t...doba inkubace

Nakonec byla podle rovnic (18) až (20) za využití extinkčního koeficientu ($\epsilon = 37\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) spočítána aktivita enzymu (U) a podle rovnice (15) specifická aktivita enzymu (U_{sp}).

7.6.5 Stanovení aktivity flavinové monooxygenasy (FMO)

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení S-oxidu thiobenzamidu (TBSO), který vzniká oxidací thiobenzamidu (TB) za katalýzy FMO. Aktivita FMO odpovídá vzrůstu jeho absorbance. Přepočítáním na koncentraci za využití molárního absorpčního koeficientu TBSO ($\epsilon = 8,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a následným vztažením na obsah bílkoviny se vyjádří specifická aktivita enzymu (U_{sp}).

Stanovení probíhalo v kyvetách na spektrofotometru Helios β . Změřeny byly 3 paralelní vzorky všech biologických frakcí a slepý vzorek každé frakce.

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 8,0)

Substrát: 89 mM roztok TB, navážka 12,5 μl TB ($M_r = 137,20$) se rozpustila v 1 ml acetonitrilu

NADPH – regenerační systém (RS): 24 mg glukosy, 8 mg NADP^+ , 400 μl pufru, 400 μl 0,1 M MgCl_2 , 20 μl glukosa-6-fosfát dehydrogenasy), byl uchováván v ledu

Acetonitril

0,42 M roztok n-oktylaminu v acetonitrilu ($M_r = 129,25$, $\rho = 1,429$), inhibitor CYP

Do kyvety byla napipetována frakce v takovém objemu, aby obsah bílkoviny byl 0,75 mg/ml (tzn. 83,9 μl mik, 87,4 μl mit, 250,8 μl cyt). Dále bylo napipetováno 25 μl RS a 12,5 μl pufru nebo inhibitoru CYP a směs byla vytemperována na 35 °C. Pak bylo přidáno 12,5 μl substrátu (TB), ve slepých vzorcích byl nahrazen 12,5 μl acetonitrilu. Kyvety byly protřepány a ihned změřena absorbance při 370 nm po dobu 7 minut.

Z naměřených hodnot absorbance byla poté podle rovnic (16) až (20) dopočítána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity (U_{sp}).

7.6.6 Stanovení aktivity jednotlivých isoform cytochromu P450

Metoda je založena na přidání substrátu, relativně specifického jen pro určitou isoformu P450 (viz tabulka 5), k biologické frakci. Každá isoforma metabolizuje svůj specifický substrát na fluoreskující produkt – resorufin, a tak je měřen přírůstek fluorescence na spektrofluorimetru (Perkin Elmer LS 50 B), který vyjadřuje aktivitu isoformem CYP.

Tabulka 5 Substráty isoformem CYP

Substrát	Mr	Isoforma cytochromu P450
Ethoxyresorufin	241.2	CYP 1A1, částečně 1A2 (ethoxyresorufin-O-deethylasa)
Methoxyresorufin	227.2	CYP 1A2, částečně 1A1 (methoxyresorufin-O-demethylasa)
Pentoxyresorufin	283.3	CYP 2B (pentoxyresorufin-O-depentylasa)
Benzyloxyresorufin	303.3	CYP 3A (benzyloxyresorufin-O-dearylasa)

Použité roztoky:

Pufr: 0,1 M TRIS-HCl pufr (pH 7,4), udržován v termostatu při 37 °C

Kofaktor: 0,1 M roztok MgCl₂ (Mr = 95,21)

Substrát (viz tabulka 4): 0,5 mM roztok v DMSO

50 mM roztok NADPH v pufru (Mr = 833,35)

Standardní přídavek: 0,5 μM roztoku resorufinu (Mr = 213,19)

Nastavení parametrů spektrofluorimetru:

Vlnové délky měření: $\lambda_{\text{excitační}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 585 \text{ nm}$

Excitační štěrbina: 10 nm

Emisní štěrba: 20 nm

Míchání: low

Celkový čas měření: 120 s

Teplota: 37 °C

Excitační filtr: cut off on

Emisní filtr: open

Do kyvety ve spektrofluorimetru bylo napipetováno 910 µl pufru, 50 µl kofaktoru, 25 µl biologické frakce a 5 µl substrátu. Po 20 s temperování bylo přidáno 10 µl NADPH, čímž byla odstartována reakce a fluorescence začala lineárně stoupat. Po 100 s bylo přidáno 10 µl standardního přídatku resorufinu. Slepé vzorky neobsahovaly frakci.

Z křivky ze spektrofluorimetru pak byly odečteny následující hodnoty: směrnice (k), intenzita před přidáním standardního přídatku (A), intenzita po jeho přidání (B).

Od hodnoty směrnice byla odečtena průměrná hodnota směrnice slepých vzorků a vypočítána průměrná hodnota A i B pro všechny vzorky.

Následně byla podle vzorce (25), za využití hodnot $D = 40$, $n = 5$ pmol, spočítána aktivita enzymu (U).

$$U = \frac{k}{B - A} * n * D * 60 \quad (\text{nmol/min/ml E}) \quad (25)$$

n...látkové množství standardního přídatku v 1 ml (5 pmol)

D...zředění frakce v reakční směsi (např. při použití 50 µl frakce je zředění 20)

60...přepočet na minuty

Podle rovnice (15) byla dopočítána hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.7 Stanovení aktivity redukčních enzymů

Stanovení aktivity redukčních enzymů je založeno na proměření poklesu absorbance NADPH. Ten je způsobený oxidací NADPH na NADP^+ ve vzorku za současné redukce specifických substrátů při 340 nm za laboratorní teploty (25 °C). Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH/ NADP^+ ($\epsilon = 6270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) lze kvantitativně vyjádřit aktivitu reductas. Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako oxidace 1 μmol NADPH/min při 25 °C.

Pro stanovení byl používán 10 mM roztok NADPH připravený rozpuštěním NADPH ($M_r = 833,35$) v redestilované vodě.

Výjimku představuje acenaftenol, u něhož za přítomnosti NADP^+ dochází k dehydrogenaci a vznikající NADPH byl zaznamenáván vzrůstem absorbance.

7.7.1 Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí 4-pyridinkarboxaldehydu

4-pyridinkarboxaldehyd (4-PC) je preferenčně redukován aldoketoreduktasami (AKR 1C a AKR 1A1) a 3α -hydroxysteroiddehydrogenasou (3α -HSD).

Toto stanovení probíhalo v kyvetách na spektrofotometru Helios β .

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 6,0)

0,1 M roztok 4-PC (připraven zředěním 4-PC ($M_r = 151$, $\rho = 1,122$) redestilovanou vodou)

10 mM roztok NADPH ($M_r = 833,35$)

Do kyvety bylo postupně napipetováno 970 μl pufru, 10 μl roztoku 4-pyridinkarboxaldehydu a 10 μl roztoku NADPH a kyvety uzavřené parafilmem byly důkladně promíchány. Poté bylo přidáno 10 μl biologické frakce (mik, mit, cyt) a ihned proměřena absorbance na spektrofotometru Helios β při 340 nm v 0. – 4. minutě.

Každá frakce byla stanovena ve třech paralelních vzorcích, spektrofotometr byl vždy vynulován na slepý vzorek, který obsahoval reakční směs bez biologické frakce.

Takto byly získány hodnoty absorbance, ze kterých byla podle rovnic (16) až (20) vypočítána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) specifická aktivita enzymu (U_{sp}).

7.7.2 Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí daunorubicinu

Daunorubicin je redukován aldoketoreduktasou AKR 1A a 3α -hydroxysteroiddehydrogenasou (3α -HSD).

Absorbance NADPH vzorků byla proměřena v kyvetách na spektrofotometru Helios β .

Použité roztoky:

0,2 M TRIS-HCl pufr (pH 8,5)

10 mM roztok daunorubicinu ($M_r = 527.52$)

10 mM roztok NADPH

Do kyvety bylo postupně napipetováno 930 μ l pufru, 10 μ l roztoku daunorubicinu, 10 μ l roztoku NADPH a kyveta uzavřená parafilmem byla promíchána. Reakce byla odstartována přidáním 50 μ l biologické frakce (mik, mit, cyt). Po promíchání byla ihned změřena absorbance na spektrofotometru Helios β při 340 nm po dobu 4 minut.

Stanoveny byly 3 paralelní vzorky každé biologické frakce. Jako slepý vzorek byla použita reakční směs bez enzymu, tzn. biologické frakce, ten byl použit na vynulování spektrofotometru.

Z naměřených hodnot absorbance byla následně podle rovnic (16) až (20) získána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.7.3 Stanovení aktivity karbonylreduktasy (CBR) pomocí menadionu

Metoda je založena na inkubaci subcelulární frakce se substrátem menadionem (Maté et al. 2008). Biotransformace menadionu karbonylreduktasou je doprovázena oxidací NADPH, což je zaznamenáváno jako pokles jeho fluorescence na spektrofluorimetru.

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 7,4), udržován v termostatu při 37 °C

50 mM roztok menadionu ($M_r = 172,18$) v ethanolu

25 mM roztok NADPH ($M_r = 833,35$) v redestilované vodě

Nastavení parametrů spektrofluorimetru:

Vlnové délky měření: $\lambda_{\text{excitační}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisní}} = 460 \text{ nm}$

Excitační štěrbina: 5 nm

Emisní štěrbina: 5 nm

Míchání: low

Celkový čas měření: 180 s

Teplota: 37 °C

Do kyvety bylo napipetováno 930 μl pufru, 10 μl roztoku menadionu a 50 μl biologické frakce, poté zapnut záznam spektrofluorimetru, po 50 s bylo přidáno 10 μl roztoku NADPH, čímž byla odstartována reakce. NADPH je zároveň standardní přídavek. Do slepých vzorků nebyla biologická frakce přidána.

Z křivky ze spektrofluorimetru pak byly odečteny následující hodnoty: směrnice (k), intenzita před přidáním NADPH (A), intenzita po přidání NADPH (B).

Od hodnoty k byla odečtena průměrná hodnota k slepých vzorků a vypočítána průměrná hodnota A i B pro všechny vzorky. Následně byla podle rovnice (25), za

využití hodnot $D = 20$ a $n = 250$ nmol, spočítána aktivita enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.7.4 Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí acenaftenolu

Acenaftenol je dehydrogenován především následujícími enzymy, AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C3, AKR 1C4.

Dehydrogenace acenaftenolu probíhá za současné redukce $NADP^+$, což je principem tohoto stanovení. Přírůstek NADPH byl zaznamenáván na spektrofluorimetru Perkin Elmer LS 50B.

Použité roztoky:

Pufr: 0,1 M TRIS-HCl pufr (pH 8,9), udržován v termostatu při 37 °C

Substrát: 150 mM roztok acenaftenolu ($M_r = 170,2$) v DMSO

Koenzym: 100 mM roztok $NADP^+$ ($M_r = 787,4$) v redestilované vodě

Standardní přídavek: 1 mM roztok NADPH ($M_r = 833$) v redestilované vodě

Nastavení parametrů spektrofluorimetru:

Vlnové délky měření: $\lambda_{excitační} = 340$ nm, $\lambda_{emisní} = 480$ nm

Excitační štěrbina: 5 nm

Emisní štěrbina: 5 nm

Míchání: low

Celkový čas měření: 180 s

Teplota: 37 °C

Do kyvety ve spektrofluorimetru bylo napipetováno 970 μ l pufru, 10 μ l roztoku acenaftenolu a 10 μ l biologické frakce (slepé vzorky byly bez obsahu frakce). Takto

připravená reakční směs byla po 50 s ustálena, po té bylo přidáno 10 μl koenzymu NADP^+ a ve 150. s 10 μl standardního přídávku NADPH.

Z křivky ze spektrofluorimetru byly pak odečteny následující hodnoty, směrnice (k), intenzita před přidáním NADPH (A), intenzita po přidání NADPH (B).

Od hodnoty směrnice byla odečtena průměrná hodnota směrnice slepých vzorků a vypočítána průměrná hodnota A i B pro všechny vzorky. Následně byla podle rovnice (23), za využití hodnot $D = 100$, $n = 10 \text{ nmol}$, spočítána aktivita enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.7.5 Stanovení aktivity redukčních enzymů pomocí metyraponu

Metyrapon je redukován karbonylreduktasou (CBR), aldoketoreduktasou z rodiny 1C (AKR 1C) a 11β -hydroxysteroiddehydrogenasou (11β -HSD).

Stanovení probíhalo v kyvetách na přístroji Helios β .

Použité roztoky:

0,1 M draselno-fosfátový pufr (pH 6,0)

0,1 M roztok metyraponu ($M_r = 226$) v redestilované vodě

10 mM roztok NADPH.

Do kyvety bylo postupně napipetováno 930 μl pufru, 10 μl roztoku metyraponu, 10 μl roztoku NADPH, po přidání každé složky byla kyveta uzavřena parafilmem řádně promíchána. Přidáním 50 μl biologické frakce a promícháním byla reakce odstartována a ihned změřena absorbance na spektrofotometru Helios β při 340 nm po dobu 4 minut. Všechny biologické frakce byly stanoveny ve 3 paralelních vzorcích.

Ve slepých vzorcích byla použita reakční směs bez biologické frakce, na slepý vzorek byl spektrofotometr vždy vynulován.

Podle rovnic (16) až (20) byla pak z absorbance získána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.8 Stanovení aktivity konjugačních enzymů

7.8.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Principem stanovení aktivity GST je spektrofotometrické stanovení tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu za minutu při použití 0,1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) a 0,1 M redukovaného glutathionu (GSH).

Použité roztoky:

0,1 M roztok 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (navážka 30,4 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml 95% ethanolu)

0,1 M roztok redukovaného glutathionu (navážka 46,1 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody)

0,1 M fosfátový pufr pH 6,5

Nejdříve byla v kádince připravena reakční směs, přičemž 1 ml této směsi obsahoval 970 μ l fosfátového pufru, 10 μ l GSH, 10 μ l CDNB.

Měření probíhalo v UV-VIS transparentních kyvetách, přičemž bylo do každé kyvety napipetováno 990 μ l reakční směsi, do 2 kyvet bylo přidáno 10 μ l pufru (2 slepé vzorky), do zbylých 5 kyvet 10 μ l subcelulární frakce (5 paralelních vzorků), tzn. cytosolu (cyt), mitochondrií (mit) nebo mikrosomů (mik). Kyvety uzavřené parafilmem byly protřepány.

Ihned po promíchání byly kyvety umístěny do UV-VIS spektrofotometru Helios β a při 340 nm byl sledován nárůst absorbance ve 4 po sobě jdoucích minutách.

Podle rovnic (16) až (20) byla pak z absorbance získána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

7.8.2 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glukosyltransferasy (UGlcT)

Principem stanovení UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) je spektrofotometrické stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenylglukuronid za enzymové katalýzy UGT.

Stanovení probíhalo v mikrotitrační destičce.

Použité roztoky:

Substrát: 0,556 mM roztok p-nitrofenolu (p-NF) ($M_r = 139,11$; navážka 1,16 mg byla pomocí ultrazvuku rozpuštěna v 15 ml redestilované vody)

Konjugační činidlo: UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA) ($M_r = 631,38$; navážka 1,05 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml redestilované vody)

Detergent: SLOVASOL (neionogenní detergent pro aktivaci UGT) (50 mg detergentu bylo rozpuštěno v 1 ml redestilované vody)

TRIS-HCl pufr pH 7,4

Stop roztok: 3% kyselina trichloroctová (TCA)

Neutralizační roztok: 1 M roztok hydroxidu sodného (NaOH)

Nejdříve bylo 100 μ l biologické frakce (mik, mit, cyt) inkubováno s roztokem detergentu po dobu 20 minut při 4 °C v poměru 2 : 1 (protein : detergent).

Poté byla připravena reakční směs. Do mikrozkušavek v ledové lázni bylo napipetováno 30 μ l pufru, 30 μ l p-NF a 30 μ l UDP-GA a reakce byla zahájena přidáním 10 μ l biologické frakce s detergentem. Mikrozkušavky byly uzavřeny, promíchány a vloženy do lázně 37 °C na 20 min.

Pro každou frakci (mik, mit, cyt) bylo připraveno 5 paralelních vzorků a 3 paralelní slepé vzorky. Ve slepém vzorku byla UDP-GA nahrazena redestilovanou vodou.

Reakce byla ukončena po 20 minutách přemístěním mikrozkušavek z lázně zpět do ledu a přidáním 50 µl stop roztoku – TCA. Poté byl deproteinizovaný roztok 3 minuty centrifugován při 5000 ot./min (Centrifuga Eppendorf 5415D).

Současně byl připraven 100% p-NF, a to smísením 30 µl p-NF, 30 µl pufru, 40 µl redestilované vody a 50 µl TCA.

50 µ supernatantu z centrifugace bylo přidáno k 50 µl 1 M roztoku NaOH, který byl předem připraven do jamek mikrotitrační destičky. Stejně tak bylo i do dalších 8 jamek s 50 µl roztoku NaOH přidáno 50 µl 100% p-NF. Po zabarvení byla změřena absorbance nezreagovaného p-NF.

Od průměrné hodnoty absorbance slepých vzorků byla odečtena naměřená hodnota absorbance jednotlivých vzorků.

$$A_{vysl} = A_{sl} - A_{vz} \quad (26)$$

Za pomoci známých hodnot absorbance a látkového množství 100% p-NF v reakční směsi bylo podle rovnic (27) a (28) vyjádřeno i látkové množství p-NF v reakční směsi vzorků.

$$x = \frac{A_{vysl} * 100}{A_{100\% p - NF}} \quad (\%) \quad (27)$$

x...% vyjádření absorbance zreagovaného p-NF (%) ve vzorku

A_{vysl} ...absorbance vzorku

$A_{100\% p-NF}$...absorbance vzorku se 100% p-NF

$$n = \frac{x * n_{100\% p - NF}}{100} \quad (\mu\text{mol}) \quad (28)$$

n...látkové množství p-NF ve vzorku

$n_{100\% p-NF}$...látkové množství vzorku se 100% p-NF (0.0167 µmol)

Vydělením inkubační dobou (t) bylo poté podle rovnice (22) získáno látkové množství p-NF zreagovaného za 1 minutu ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Dále byla za využití rovnic (20) získána hodnota aktivity enzymu (U) a podle rovnice (15) hodnota specifické aktivity enzymu (U_{sp}).

Stejným způsobem byla stanovena i aktivita UGlcT.

UGlcT katalyzuje konjugaci p-NF s UDP-glukosou za vzniku p-nitrofenylglukosidu.

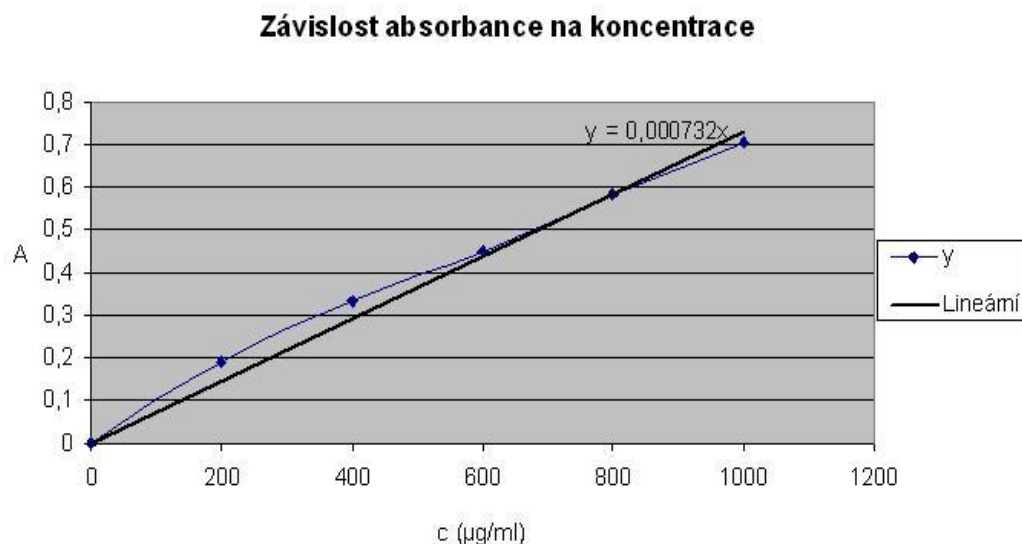
Jako konjugační činidlo bylo použito 30 μl roztoku UDP-glukosy, který byl připraven rozpuštěním 1,01 mg UDP-glukosy ($M_r = 610,3$) v 1,5 ml redestilované vody.

8 Výsledky

8.1 Stanovení bílkoviny

Obsah bílkoviny v tasemnici byl stanoven pomocí kalibrační křivky za použití hovězího sérového albuminu (1% roztok BSA) jako standardu.

Nejdříve byla vytvořena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance jednotlivých roztoků BSA na jejich koncentraci (viz obrázek 10), následně z ní byly odečteny hodnoty koncentrace bílkovin v tasemnici.



Obrázek 10 Závislost absorbance roztoků BSA na jejich koncentraci

y...průměrná hodnota absorbance (A) jednotlivých roztoků BSA stanovená z 8 měření

x...hodnota koncentrace (c) jednotlivých roztoků BSA v µg/ml

Výsledné hodnoty koncentrace bílkovin v biologických frakcích jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6 Hodnoty koncentrace bílkovin v biologických frakcích

	koncentrace (mg/ml) ^a
mik	9,39 ± 0,304
mit	9,01 ± 0,326
cyt	3,14 ± 0,169

^a aritmetický průměr z osmi měření ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

8.2 Biotransformace anthelmintik *in vitro*

Biotransformace anthelmintik *in vitro* byla stanovena po inkubaci jednotlivých biologických frakcí s roztoky anthelmintik (ABZ, FLU, MBZ). Na HPLC byla poté stanovena koncentrace (ng/ml) anthelmintik i jejich metabolitů, ta byla následně vyjádřena jako množství metabolitu vzniklé za 1 minutu na 1 mg proteinu.

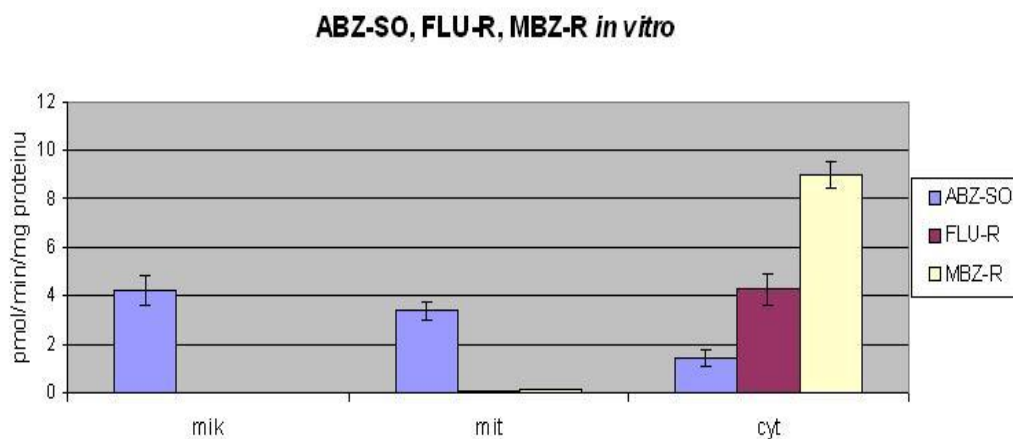
Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 7 a na obrázku 11.

Tabulka 7 Výsledná koncentrace metabolitů anthelmintik (*in vitro*)

metabolit	biologická frakce	koncentrace (pmol/min/mg proteinu) ^a
ABZ-SO	mik	4,22 ± 0,623
	mit	3,38 ± 0,403
	cyt	1,43 ± 0,339
FLU-R	mik	---
	mit	0,0667 ± 0,00255
	cyt	4,27 ± 0,618
MBZ-R	mik	0,0136 ± 0,0185
	mit	0,138 ± 0,00601
	cyt	9,00 ± 0,563

^a aritmetický průměr ze tří stanovení ± směrodatná odchylka

ABZ-SO albendazol-sulfoxid, FLU-R redukovaný flubendazol, MBZ-R redukovaný mebendazol



Obrázek 11 Výsledná koncentrace ABZ-SO, FLU-R, MBZ-R (*in vitro*)

Hodnoty koncentrace albendazol-sulfonu (ABZ-SO₂) byly zanedbatelné.

8.3 Stanovení anthelmintik v homogenátu

Po inkubaci (24 hodin) tasemnice v roztoku anthelmintika byly stanoveny koncentrace anthelmintik a jejich metabolitů v homogenátu tasemnice. Na HPLC byla stanovena hmotnostní koncentrace (ng/ml), která byla následně převedena na hodnotu v nmol/g tasemnice.

8.3.1 Biotransformace albendazolu

Albendazol (ABZ) byl metabolizován na albendazol-sulfoxid (ABZ-SO) a albendazol-sulfon (ABZ-SO₂). Inkubovány byly dvě tasemnice. Konkrétní hodnoty koncentrací jsou shrnuty v tabulce 8.

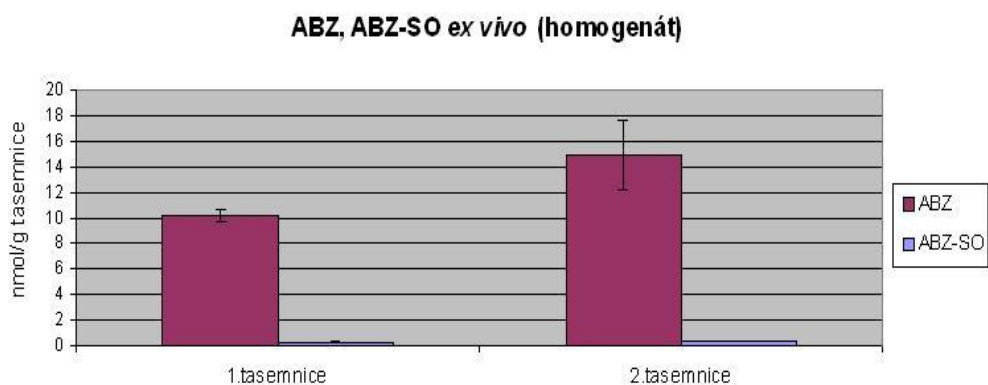
Tabulka 8 Koncentrace ABZ, ABZ-SO a ABZ-SO₂ v homogenátu

	koncentrace (nmol/g tasemnice) ^a 1. tasemnice	koncentrace (nmol/g tasemnice) ^a 2. tasemnice
ABZ	10,2 ± 0,459	14,9 ± 2,65
ABZ-SO	0,320 ± 0,0172	0,448 ± 0,0180
ABZ-SO ₂	0,0052 ± 0,00013	0,00198 ± 0,00017

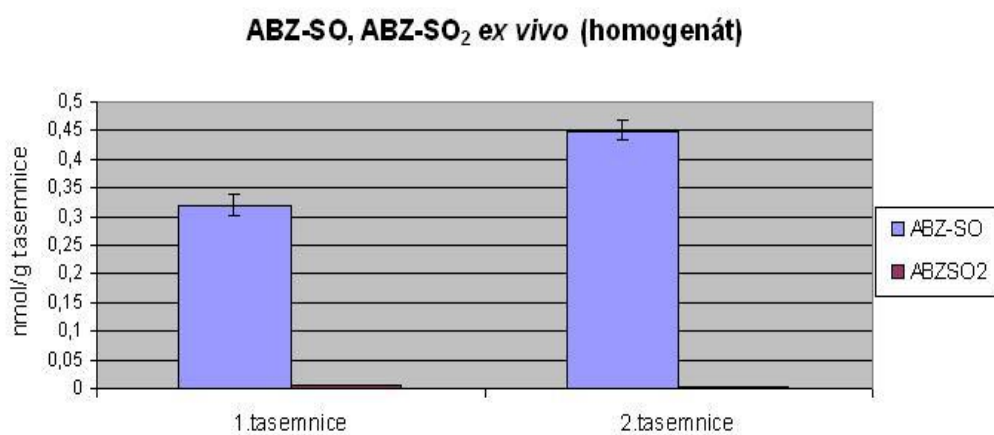
^a aritmetický průměr ze čtyř stanovení ± směrodatná odchylka

ABZ albendazol, ABZ-SO albendazol-sulfoxid, ABZ-SO₂ albendazol-sulfon

Tyto hodnoty jsou pak zobrazeny graficky na obrázcích 12 a 13.



Obrázek 12 Porovnání koncentrací ABZ a ABZ-SO v homogenátu



Obrázek 13 Porovnání koncentrací ABZ-SO a ABZ-SO₂ v homogenátu

8.3.2 Biotransformace mebendazolu

Mebendazol (MBZ) byl biotransformován redukcí karbonylové skupiny na hydroxylovou (MBZ-R). Inkubována byla jen jedna tasemnice. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 9.

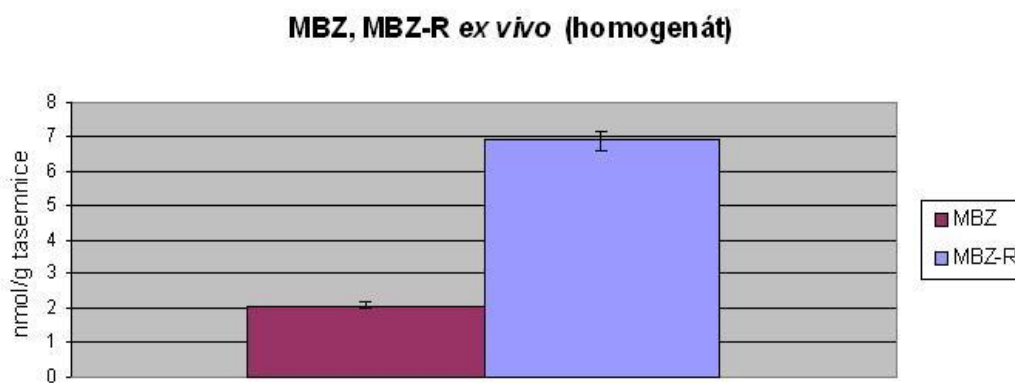
Tabulka 9 Výsledné hodnoty koncentrace MBZ a MBZ-R v homogenátu

	koncentrace (nmol/g tasemnice) ^a
MBZ	2,07 ± 0,0790
MBZ-R	6,88 ± 0,282

^a aritmetický průměr ze čtyř měření ± směrodatná odchylka

MBZ mebendazol, MBZ-R redukovaný mebendazol

Výsledné hodnoty jsou graficky znázorněny na obrázku 14.



Obrázek 14 Porovnání koncentrací MBZ a MBZ-R v homogenátu

8.3.3 Biotransformace flubendazolu

Flubendazol (FLU) byl biotransformován redukcí karbonylové skupiny na hydroxylovou (FLU-R). Inkubovány byly dvě tasemnice. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 10.

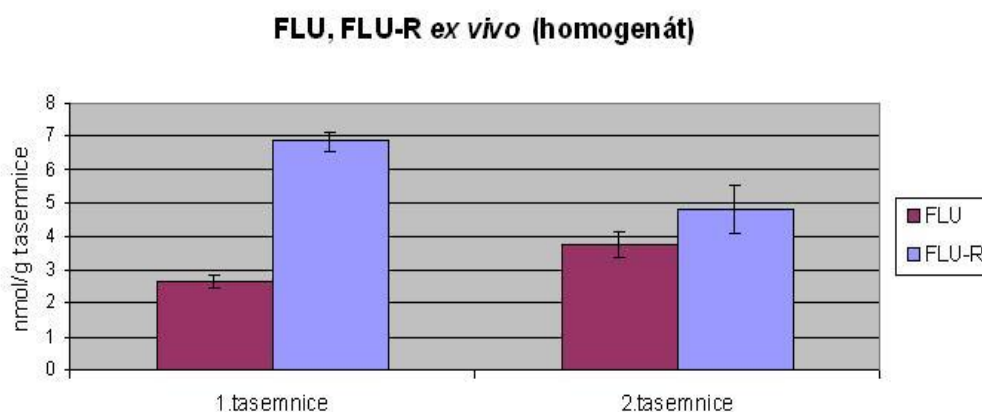
Tabulka 10 Výsledné hodnoty koncentrace FLU a FLU-R v homogenátu

	koncentrace (nmol/g tasemnice) ^a 1.tasemnice	koncentrace (nmol/g tasemnice) ^a 2.tasemnice
FLU	2,65 ± 0,206	3,76 ± 0,362
FLU-R	6,83 ± 0,277	4,80 ± 0,726

^a aritmetický průměr ze čtyř stanovení ± směrodatná odchylka

FLU flubendazol, FLU-R redukovaný flubendazol

Výsledné hodnoty jsou graficky znázorněny na obrázku 15.



Obrázek 15 Porovnání koncentrací FLU a FLU-R v homogenátu

8.4 Stanovení anthelmintik v médiu

Byly stanoveny koncentrace anthelmintik a jejich metabolitů v médiu. Jednotlivé vzorky médií, ve kterých byly tasemnice inkubovány, byly odebírány v průběhu inkubace, a to ve 2., 4., 8., a 24. h. Na HPLC pak byla stanovena hmotnostní koncentrace (ng/ml), která byla následně převedena na koncentraci molární.

Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 11.

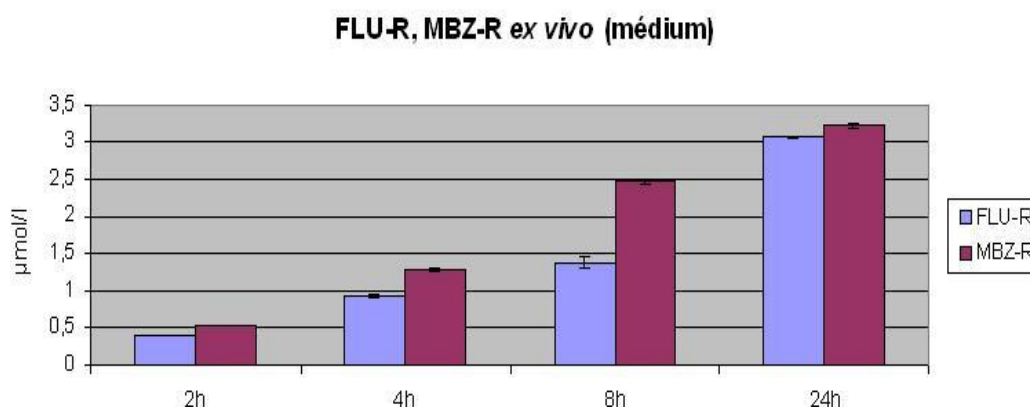
Tabulka 11 Výsledné hodnoty koncentrace metabolitů anthelmintik v médiu

	koncentrace ($\mu\text{mol/l}$) ^a	
	FLU-R	MBZ-R
2 h	0,402 \pm 0,00992	0,520 \pm 0,00368
4 h	0,928 \pm 0,0161	1,29 \pm 0,0235
8 h	1,37 \pm 0,0694	2,46 \pm 0,0320
24 h	3,07 \pm 0,0154	3,22 \pm 0,0383

^a aritmetický průměr ze tří stanovení \pm směrodatná odchylka

FLU-R redukovaný flubendazol, MBZ-R redukovaný mebendazol

Hodnoty z tabulky 11 jsou graficky znázorněny na obrázku 16.



Obrázek 16 Koncentrace metabolitů anthelmintik (FLU-R, MBZ-R) v médiu

Metabolity albendazolu (ABZ-SO a ABZ-SO₂) byly ve vzorcích detekovány také, ale po zohlednění hodnot slepých chemických a slepých biologických vzorků byly získány nulové hodnoty. Při inkubaci tasemnice v roztoku flubendazolu a mebendazolu metabolity ve slepých vzorcích detekovány nebyly.

8.5 Stanovení oxidačních enzymů

8.5.1 Stanovení katalasy

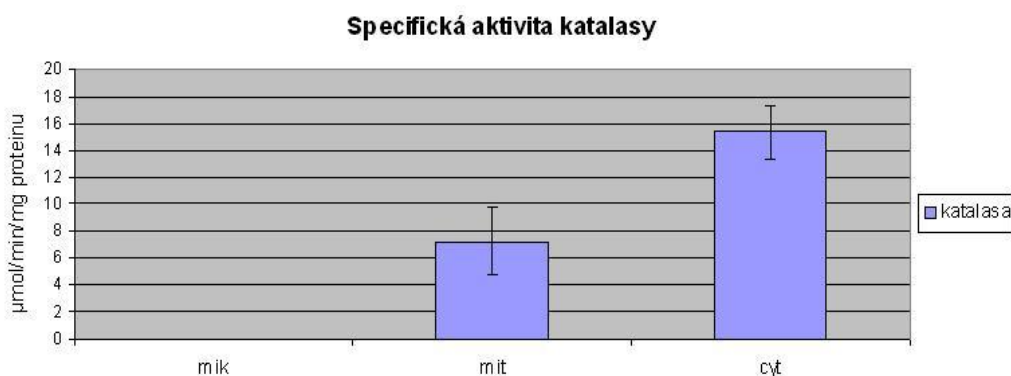
Specifická aktivita katalasy (U_{sp}) byla stanovena na základě reakce molybdenanu amonného a peroxidu vodíku za tvorby žlutého komplexu, tato reakce je katalyzována právě katalasou. Koncentrace komplexu byla stanovena spektrofotometricky, z absorbance byla nakonec vyjádřena specifická aktivita enzymu. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12 Specifická aktivita CAT v biologických frakcích

	U_{sp} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteinu) ^a
mik	---
mit	$7,27 \pm 2,50$
cyt	$15,3 \pm 1,94$

^a aritmetický průměr z pěti stanovení \pm směrodatná odchylka
mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Výsledné hodnoty specifické aktivity jsou graficky znázorněny na obrázku 17.



Obrázek 17 Specifická aktivita katalasy v biologických frakcích

8.5.2 Stanovení glutathionreduktasové aktivity

Specifická glutathionreduktasová aktivita (U_{sp}) enzymu thioredoxin-glutathionreduktasy (TGR) byla stanovena na základě spotřeby NADPH, a to při přeměně oxidovaného glutathionu na redukovaný glutathion. Spotřeba NADPH byla zaznamenávána sledováním úbytku absorbance. Hodnota absorbance byla následně převedena na specifickou aktivitu enzymu.

Výsledné hodnoty specifické glutathionreduktasové aktivity TGR jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13 Specifická glutathionreduktasová aktivita TGR v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	0,174 ± 0,0111
mit	0,304 ± 0,107
cyt	4,89 ± 0,210

^a aritmetický průměr ze čtyř měření ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Na obrázku 18 jsou hodnoty specifické glutathionreduktasové aktivity TGR znázorněny graficky.



Obrázek 18 Hodnoty specifické glutathionreduktasové aktivity TGR v biologických frakcích

8.5.3 Stanovení peroxidasy

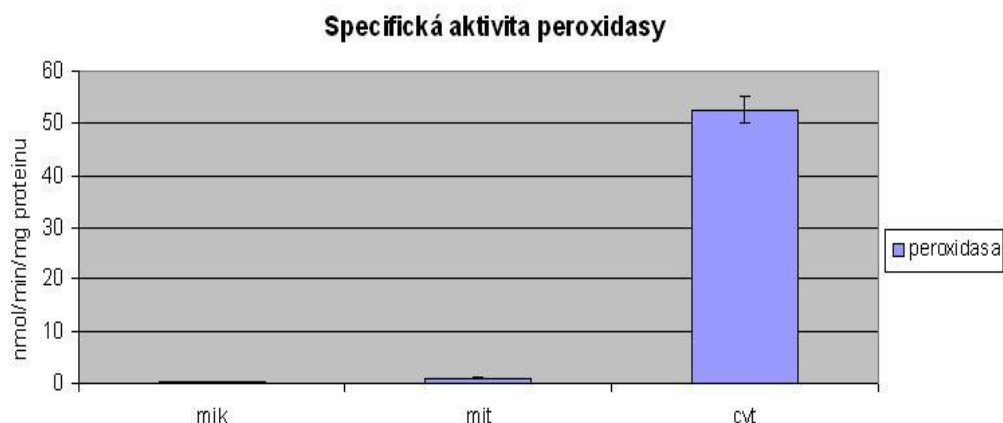
Stanovení specifické aktivity peroxidasy (U_{sp}) probíhalo změřením absorbance o-fenylendiaminu (OPD), který vzniká za katalytického působení peroxidasy. Naměřená absorbance byla následně přepočítána na specifickou aktivitu enzymu. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 14.

Tabulka 14 Specifická aktivita peroxidasy v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	0,232 ± 0,0647
mit	1,08 ± 0,155
cyt	52,7 ± 2,70

^a aritmetický průměr z osmi stanovení ± směrodatná odchylka
mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Výsledné hodnoty specifické aktivity peroxidasy jsou graficky znázorněny na obrázku 19.



Obrázek 19 Hodnoty specifické aktivity peroxidasy v biologických frakcích

8.5.4 Stanovení aktivity superoxidodismutasy (SOD)

Specifická aktivita SOD (U_{sp}) byla stanovena pomocí kitu *SOD Assay Kit-WST*. Jedná se o nepřímé stanovení využívající WST, které se redukuje na barvivo formazan za současné oxidace superoxidového aniontu. Ten je odbouráván právě SOD, a tak lze vyjádřit její aktivitu pomocí snížení tvorby formazanu doprovázeného poklesem absorbance.

Naměřená hodnota absorbance byla následně pomocí extinkčního koeficientu přepočítána přes koncentraci formazanu až na specifickou aktivitu SOD. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 15.

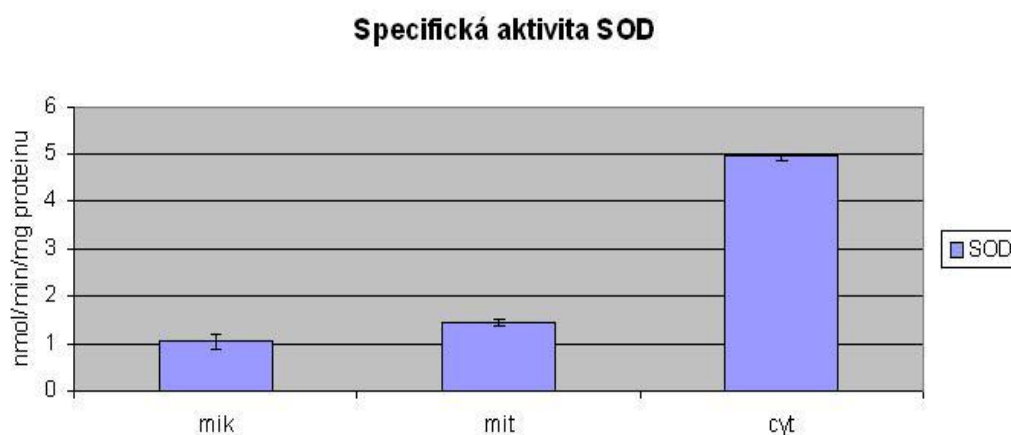
Tabulka 15 Specifická aktivita SOD v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	1,04 ± 0,177
mit	1,43 ± 0,0793
cyt	4,94 ± 0,0523

^a aritmetický průměr ze čtyř stanovení ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Hodnoty z tabulky 15 jsou graficky znázorněny na obrázku 20.



Obrázek 20 Specifická aktivita SOD v biologických frakcích

8.5.5 FMO, CYP

Specifická aktivita FMO byla stanovena měřením absorbance oxidovaného thiobenzamidu, který vzniká právě za katalytického působení FMO.

Isoformy CYP byly stanoveny spektrofluorimetry za použití specifických substrátů.

Žádná enzymová aktivita však nalezena nebyla.

8.6 Stanovení aktivity redukčních enzymů

Specifická aktivita redukčních enzymů (U_{sp}) byla stanovena na základě redukce specifických substrátů a současné oxidace NADPH na $NADP^+$ ve vzorku, což se projevilo poklesem absorbance NADPH. Výjimku představuje acenaftenol, u něhož za přítomnosti $NADP^+$ docházelo k dehydrogenaci a vznikající NADPH byl zaznamenáván vzrůstem absorbance. Specifickou aktivitu reductas (U_{sp}) lze kvantitativně vyjádřit pomocí poklesu/vzrůstu absorbance. Hodnoty U_{sp} jsou shrnuty v tabulce 16.

Tabulka 16 Stanovení specifické aktivity redukčních enzymů

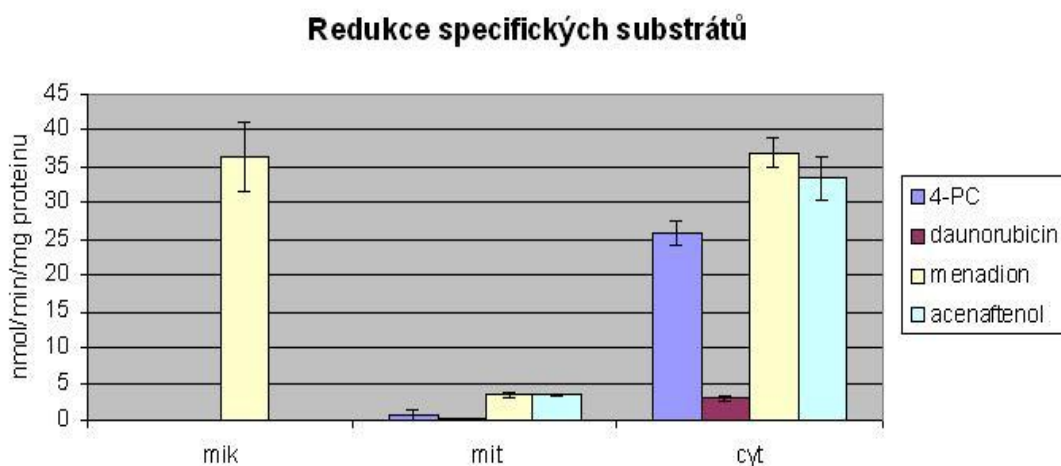
substrát (redukční enzymy)	biologická frakce	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
4-pyridinkaboxaldehyd (AKR 1C, AKR 1A1, 3 α -HSD)	mik	---
	mit	0,738 \pm 0,753
	cyt	25,8 \pm 1,58
daunorubicin (AKR 1A, 3 α -HSD)	mik	---
	mit	0,148 \pm 0,0417
	cyt	3,05 \pm 0,207
menadion (CBR)	mik	36,3 \pm 4,93
	mit	3,41 \pm 0,330
	cyt	36,9 \pm 2,04
acenaftenol (AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C3, AKR 1C4)	mik	---
	mit	3,43 \pm 0,144
	cyt	33,3 \pm 3,03
metyrapon (CBR, AKR 1C, 11 β -HSD)		---

a aritmetický průměr ze tří stanovení \pm směrodatná odchylka

AKR (aldoketoredukasa), CBR (karbonylredukasa), 3 α -HSD
(3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa), 11 β -HSD (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa)

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Graficky jsou hodnoty uvedené výše znázorněny na obrázku 21.



Obrázek 21 Redukce specifických substrátů v biologických frakcích

8.7 Stanovení konjugačních enzymů

8.7.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Specifická aktivita GST byla stanovena na základě spektrofotometrického měření tvorby S-2,4-dinitrofenylglutathionu, který vzniká za katalytického působení GST v přítomnosti glutathionu. Nárůst jeho absorbance pak odpovídá specifické aktivitě (U_{sp}) GST. Výsledné hodnoty U_{sp} jsou shrnuty v tabulce 17.

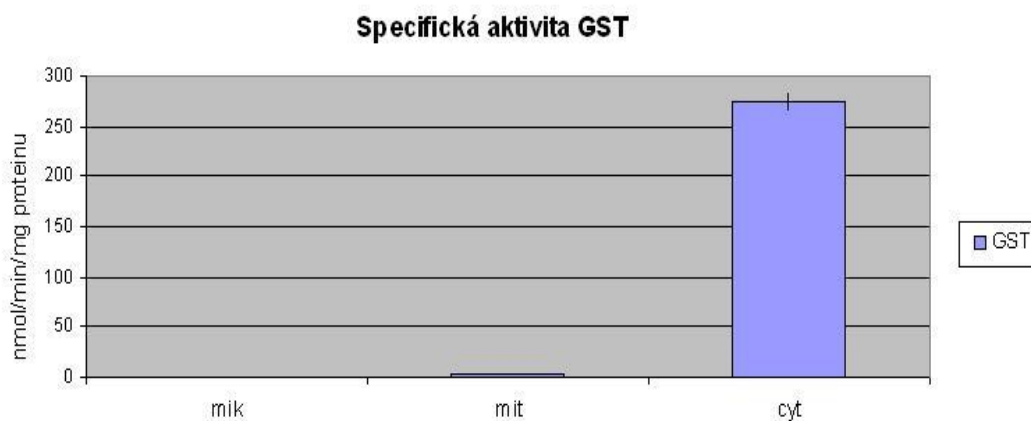
Tabulka 17 Specifická aktivita GST v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	---
mit	3,88 ± 0,393
cyt	274 ± 8,58

^a aritmetický průměr z pěti stanovení ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Výsledné hodnoty U_{sp} jsou graficky znázorněny na obrázku 22.



Obrázek 22 Specifická aktivita GST v biologických frakcích

8.7.2 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glukosyltransferasy (UGlcT)

Principem stanovení UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) je spektrofotometrické stanovení přeměny p-nitrofenolu na p-nitrofenylglukuronid za enzymové katalýzy UGT.

Stejným způsobem byla stanovena i aktivita UGlcT (UGlcT katalyzuje konjugaci p-NF s UDP-glukosou za vzniku p-nitrofenylglukosidu).

Nárůst absorpance konjugátů pak odpovídá specifické aktivitě enzymů U_{sp} . Výsledné hodnoty U_{sp} jsou shrnuty v tabulkách 18 a 19.

Tabulka 18 Specifická aktivita UGT v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	0,516 ± 0,0495
mit	1,26 ± 0,393
cyt	---

^a aritmetický průměr z pěti stanovení ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

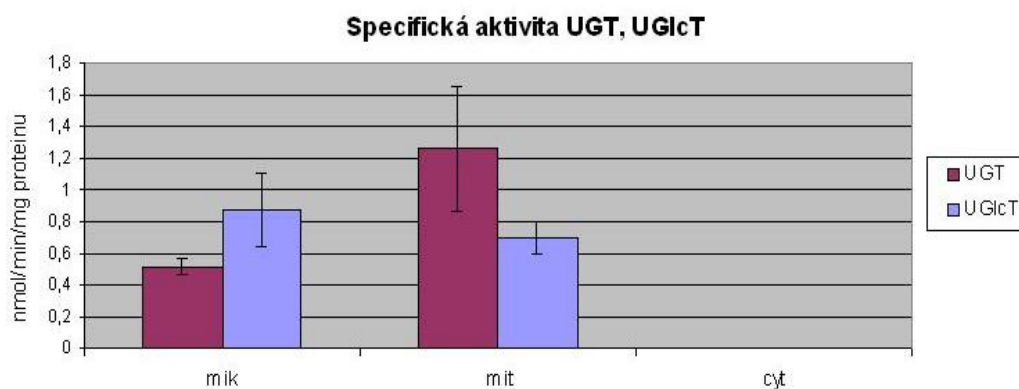
Tabulka 19 Specifická aktivita UGlcT v biologických frakcích

	U_{sp} (nmol/min/mg proteinu) ^a
mik	0,873 ± 0,228
mit	0,697 ± 0,0979
cyt	---

^a aritmetický průměr z pěti stanovení ± směrodatná odchylka

mik (mikrosomy), mit (mitochondrie), cyt (cytosol)

Výsledné hodnoty U_{sp} jsou graficky znázorněny na obrázku 23.

**Obrázek 23 Specifická aktivita UGT a UGlcT v biologických frakcích**

9 Diskuse

9.1 Biotransformace anthelmintik

Cílem celého experimentu bylo zjistit schopnost tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) biotransformovat anthelmintika (benzimidazoly), a tím snižovat jejich koncentraci v tasemnici. Biotransformace benzimidazolů je pro tasemnici obranným mechanismem, kterým se pro ni těchto toxických látek zbavuje. Právě tento děj ale pak může vést k poddávkování daného anthelmintika, a tím k selhávání terapie monieziózy a zároveň k rozvoji rezistenci vůči těmto anthelmintikům. To má za následek snížení produktivity hospodářských zvířat a zvyšování morbidity a mortality nejen zvířat, ale i lidí. Z tohoto důvodu je na místě se této problematice věnovat.

Celý experiment byl zaměřen na následující anthelmintika: albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ) a flubendazol (FLU). Provedena byla řada experimentů, díky kterým bylo možné zjistit koncentraci metabolitů jednotlivých anthelmintik, a tím i míru jejich biotransformace. ABZ se biotransformací oxiduje na biologicky aktivní ABZ-SO a neaktivní ABZ-SO₂, u FLU a MBZ dochází k redukci karbonylové skupiny na hydroxylovou za vzniku FLU-R a MBZ-R.

Koncentrace metabolitů i parentních látek byly stanoveny v *in vitro* experimentech (viz kap. 7.4) a v *ex vivo* experimentech (viz kap. 7.5).

Po inkubaci *M. expansa* v roztoku MBZ a FLU (viz kap.7.5) v *ex vivo* experimentu převažovaly v homogenátu u obou anthelmintik koncentrace metabolitů (MBZ-R a FLU-R) nad parentní látkou. V médiu se FLU a MBZ také biotransformoval. Na obrázku 16 je patrné, jak koncentrace metabolitů v čase stoupá s tím, jak se anthelmintika postupně biotransformují.

U *H. diminuta* byly právě MBZ-R a FLU-R stanoveny jako jediné metabolity 1. fáze biotransformace, přičemž koncentrace MBZ-R byla vyšší než FLU-R (Bártíková et al. 2012). U *H. contortus* byl také FLU-R detekován v médiu i homogenátu jako jediný metabolit, hydrolyzovaný FLU detekován nebyl (Cvilink et al. 2008b).

ABZ se v homogenátu *M. expansa* také biotransformoval, ale hodnoty koncentrace parentní látky byly podstatně vyšší než koncentrace metabolitu (ABZ-SO), koncentrace ABZ-SO₂ byla zanedbatelná. V médiu koncentrace ABZ-SO v čase rovněž

stoupala, vysoké množství ABZ-SO bylo ale nalezeno také v SLCH vzorku. Po odečtení množství ABZ-SO nalezeného v SLCH od hodnot ve vzorcích média byly proto nakonec výsledné hodnoty ABZ-SO nulové. Množství detekovaného ABZ-SO₂ bylo zanedbatelné. Při stanovení FLU ani MBZ metabolity v SLCH detekovány nebyly.

ABZ-SO byl díky neenzymatické konverzi detekován také ve slepých vzorcích u *D. dendriticum*, hodnoty byly ale 5x nižší než v médiu (Cvilink et al. 2009b). Je tudíž možné, že i u *M. expansa* jde u ABZ částečně o neenzymatickou konverzi, částečně je možné, že byl výsledek zatížen chybou.

U *D. dendriticum* byla oxidace ABZ také pozorována, ale enzymy katalyzující ABZ metabolit identifikovány nebyly. Oxidace ABZ byla dále detekována i u *F. hepatica*, *M. expansa*, *A. suum* a *H. contortus* (Bártíková et al. 2010b). U *H. diminuta* k biotransformaci ABZ v živých tasemnicích nedocházelo (Bártíková et al. 2012). Další oxidace ABZ-SO na ABZ-SO₂ ani sulforedukce u *D. dendriticum* nebyly v *ex vivo* experimentech detekovány (Cvilink et al. 2009b).

Ve všech druzích helmintů dochází sulfoxidací ABZ na ABZ-SO k tvorbě racemátu. Na druhou stranu u savců je reakce enantioselektivní, u krys je dominantní (-) ABZ-SO, u ovcí a skotu dominuje (+) ABZ-SO (Solana et al. 2001).

V *in vitro* experimentech byly FLU-R a MBZ-R v subcelulárních frakcích *M. expansa* detekovány pouze v cytosolu, v mitochondriích a mikrosomech bylo pouze zanedbatelné množství.

Schopnost *H. contortus* vytvářet FLU-R byla také testována právě v cytosolické frakci, protože FLU je redukován hlavně prostřednictvím cytosolických reduktas (Vokřál et al. 2012). U *H. diminuta* byly FLU-R a MBZ-R nalezeny také v cytosolické frakci, zatímco v mikrosomech a mitochondriích žádné metabolity FLU a MBZ detekovány nebyly (Bártíková et al. 2012).

ABZ-SO byl u *M. expansa* zjištěn ve všech třech frakcích, nejvyšší koncentrace byla v mikrosomech, pak v mitochondriích, nejnižší byla v cytosolu. Hodnoty ABZ-SO₂ byly zanedbatelné.

U *D. dendriticum* byl ABZ oxidován na farmakologicky aktivní ABZ-SO v mitochondriích a mikrosomech. V cytosolu biotransformace pozorována nebyla. Kvůli neenzymatické přeměně ABZ bylo u tohoto parazita také detekováno stopové množství ABZ-SO ve slepých vzorcích (Bártíková et al. 2010b).

U *D. dendriticum* byl v mitochondriích pozorován i druhý krok ABZ oxidace (sulfonace). Toto je důkaz, že enzymy helmintů jsou schopné deaktivovat ABZ skrze tvorbu biologicky neaktivního ABZ-SO₂. Nicméně jeho množství je tak nízké, že nelze předpokládat významnou protektivní roli této reakce. U *ex vivo* experimentů sulfonace zjištěna nebyla (Cvilink et al. 2009b). Oxidace ABZ-SO na ABZ-SO₂ byla také pozorována u *H. contortus* a *F. hepatica* (Bártíková et al. 2012).

Vznik ABZ-SO₂ byl prokázán i v experimentu s *M. expansa*, ale oproti hodnotám ABZ a ABZ-SO lze tyto hodnoty zanedbat.

Na druhou stranu je nutné počítat s tím, že účinnost ABZ-SO je oproti ABZ vůči některým helmintům nižší (Solana et al. 2001). Proto i tuto reakci můžeme považovat za protektivní.

U *H. diminuta* žádné metabolity ABZ vytvořeny nebyly. Aby se zjistilo, zda u tohoto parazita probíhá druhý krok oxidace na ABZ-SO₂ nebo redukce ABZ-SO zpátky na ABZ, byly jeho frakce inkubovány i s ABZ-SO jako substrátem. Žádná z těchto reakcí však prokázána nebyla (Bártíková et al. 2012).

Mikrosomální a cytosolické frakce helmintů *M. expansa*, *A. suum*, *F. hepatica* byly schopné sulfoxidace ABZ na ABZ-SO, přičemž aktivita u všech tří helmintů byla vyšší v mikrosomech. Aktivita u *F. hepatica* byla výrazně vyšší než u helmintů ze tříd *Cestoda* a *Nematoda*. Tvorba sulfonu byla detekována pouze v mikrosomech a cytosolu *F. hepatica*. U *M. expansa* byla prokázána nejvyšší schopnost redukovat ABZ-SO zpět na ABZ (Solana et al. 2001).

Výsledky *ex vivo* a *in vitro* experimentů se u parazitů částečně liší. Je to pravděpodobně dáno odlišnými podmínkami těchto stanovení.

Ex vivo experimenty lépe simulují přirozené podmínky než stanovení *in vitro*. Tasemnice je inkubována celá, tudíž látky musí přecházet přes membrány tegumentu obdobně jako v reálné situaci, tak aby se dostaly na místo působení. Důležitá je i přítomnost transportérů a dalších enzymů. Proto jsou *ex vivo* stanovení považována za věrohodnější.

In vitro experimenty neodpovídají tolik reálným podmínkám jako experimenty *ex vivo*, poněvadž se jedná o inkubaci subcelulárních frakcí izolovaných z tasemnice (cytosolu, mikrosomů a mitochondrií) s roztoky anthelmintik. Na druhou stranu ale můžeme prokázat, v jaké frakci konkrétně k biotransformaci dochází, a tak porovnat

míru biotransformace v dané frakci s aktivitou biotransformačních enzymů. V *in vitro* stanovení jsou také používány vysoké koncentrace substrátu i NADPH.

9.2 Aktivita biotransformačních enzymů

Biotransformační enzymy jsou enzymy podílející se na metabolizaci xenobiotik, tzn. i anthelmintik. Svoji aktivitou tak přispívají ke snižování terapeutických hladin léčiva v organismu, a tím i k rozvoji rezistence. Jsou součástí obranného mechanismu proti cizorodým látkám, hlavně toxickým, kterými anthelmintika pro tasemnici jsou. Proto je důležité stanovit jejich aktivitu.

Z oxidačních enzymů byla u *M. expansa* stanovena katalasa (CAT), thioredoxin-glutathionreduktasa (TGR), peroxidasa (Px), superoxiddismutasa (SOD), flavinové monooxygenasy (FMO) a některé isoformy cytochromu P450 (CYP). V případě CAT, TGR, Px a SOD se nejedná primárně o biotransformační enzymy, důležitá je jejich antioxidační aktivita. Na biotransformaci se však mohou také podílet.

U *M. expansa* byla aktivita CAT nejvyšší v cytosolu, v mikrosomech byla aktivita nižší, v mitochondriích nebyla prokázána vůbec. Stejně tak i u TGR a Px byla aktivita detekována hlavně v cytosolu, v mikrosomech a mitochondriích byla zanedbatelná.

U *D. dendriticum* byla TxrR a GR aktivita TGR detekována pouze v mikrosomech a cytosolu. TGR byla objevena také u *S. mansoni* a *Echinococcus granulosus* a *Taenia crassiceps* (Bártíková et al. 2010b).

Aktivita SOD byla u *M. expansa* také nejvyšší v cytosolu, v mikrosomech a mitochondriích byla nižší.

Primárně antioxidační enzymy CAT, SOD a GSH peroxidasa (GPx) mají u *M. expansa* nízkou aktivitu. Nízká aktivita těchto enzymů se může odrážet ve snížené potřebě antioxidační ochrany v prostředí střeva, ve kterém je minimum kyslíku (Brophy et al. 1989).

V biologických frakcích *H. diminuta* byly aktivity oxidačních enzymů (Px, SOD, CAT) detekovány ve všech frakcích (Bártíková et al. 2012). Při porovnání všech frakcí *D. dendriticum*, byla nejvyšší aktivita Px, GPx, SOD, TxrR, a GR nalezena v cytosolu. Na druhou stranu v mikrosomech byla vyšší aktivita CAT. V cytosolu a

mikrosomech byly detekovány všechny měřené enzymy, ale v mitochondriích nebyla detekována TxrR a GR aktivita TGR (Bártíková et al. 2010b).

Dalšími enzymy, které byly stanoveny, byly FMO a CYP 450, jejich aktivita ale detekována u *M. expansa* nebyla.

Ani u *D. dendriticum* nebyla aktivita FMO a CYP 450 pozorována v žádné frakci. Ale vzhledem k tomu, že genom *C. elegans* obsahuje geny kódující homology FMO savců, se předpokládá, že FMO může u helmintů zprostředkovat oxidaci xenobiotik. *C. elegans* je ale volně žijící helmint ze třídy *Nematoda* a jeho geny kódující biotransformační enzymy mohou být odlišné od parazitických helmintů (Bártíková et al. 2010b).

U savců jako hostitelů jsou metabolické reakce připisovány jak CYP, tak i FMO, zatímco u *A. lumbricoides* a *M. expansa* byla zaznamenána spojitost pouze s FMO. Helminti do určité míry překonávají absenci CYP 450 detoxifikačního systému používáním množství dalších metabolických reakcí (Solana et al. 2001). Aktivita CYP 450 byla nalezena u *S. mansoni*, v larválních stádiích *H. contortus* a u *Heligmosomoides polygyrus* (Bártíková et al. 2012).

Redukční metabolismus je u helmintů považován za hlavní metabolickou cestu detoxikace, proto byl testován dříve než oxidační. To je pochopitelné už z toho hlediska, že intestinální lumen si udržuje nízké redoxní prostředí. Redukce je hlavní detoxikační cestou sloučenin nesoucích karbonylovou skupinu (Bártíková et al. 2012).

Redukční enzymy byly u *M. expansa* stanoveny na základě redukce relativně specifických substrátů, k jejich redukcí dochází působením několika enzymů ze třídy AKR, CBR a HSD. V cytosolu byl redukován 4-PC, který je redukován prostřednictvím AKR 1C, AKR 1A1 a 3 α -HSD, dále daunorubicin, jehož redukce je zprostředkována AKR 1A, 3 α -HSD, a acenaftenol redukován v přítomnosti enzymů AKR 1C1, AKR 1C2, AKR 1C3, AKR 1C4. Menadion byl díky CBR redukován v cytosolu a mikrosomech, v mitochondriích byla jeho redukce nižší. Redukce metyraponu zaznamenána nebyla.

U *H. diminuta* redukovala cytosolická frakce acenaftenol, menadion, daunorubicin (pH 8,5), oracin a 4-PC, poslední zmiňovaný substrát byl metabolizován také v mikrosomech. Redukce metyraponu a daunorubicinu (pH 6,0) nebyla prokázána v žádné frakci (Bártíková et al. 2012). U *H. contortus* byly detekovány vysoké aktivity

reduktas 4-PC, aktivita reduktas naloxonu a metyraponu byla nízká, menadion nebyl redukován vůbec (Vokřál et al. 2012).

Z konjugačních enzymů byly u *M. expansa* stanoveny GST, UGT a UGlcT. Výsledky experimentů ukázaly, že GST je aktivní pouze v cytosolu, aktivita UGT a UGlcT byla na druhou stranu zaznamenána v mikrosomech a mitochondriích.

GST je považována za hlavní detoxikační enzym u helmintů a např. u *H. contortus* je rezistence vůči anthelmintikům spojována právě se zvýšenou aktivitou GST v cytosolu. U *M. expansa* byly v cytosolu nalezeny 4 různé formy GST (Brophy et al. 1989). U *H. diminuta* byla výrazná aktivita GST nalezena také v cytosolu, další konjugační enzymy, UGlcT ukázala slabou aktivitu v mitochondriích, UGT nebyla pozorována v žádné frakci (Bártíková et al. 2012).

Po shrnutí výsledků experimentů provedených u *M. expansa* lze z *in vitro* experimentů snadno vyčíst, že FLU a MBZ jsou redukovány pouze v cytosolu. A také v cytosolu byla nejvyšší aktivita redukčních enzymů, což naznačuje, že jsou redukovány právě cytosolickými reduktasami.

ABZ byl metabolizován sulfoxidací na ABZ-SO. Tato biotransformace probíhala podle *in vitro* stanovení ve všech třech frakcích. Nejvíce v mikrosomech, méně v mitochondriích a nejméně pak v cytosolu. Ale aktivita oxidačních enzymů byla nejvyšší právě v cytosolu. Což je s výsledky biotransformace ABZ v rozporu.

V experimentu s *H. diminuta* byla stanovena významná aktivita Px, SOD a CAT, ale žádné metabolity ABZ detekovány nebyly ani u *in vitro*, ani u *ex vivo* stanovení (Bártíková et al. 2012). Z toho vyplývá, že u žádného z těchto parazitů se antioxidační enzymy pravděpodobně na metabolizaci ABZ nepodílejí.

Částečně je možné, že jde u ABZ o neenzymatickou konverzi, jak již bylo naznačeno výše (Bártíková et al. 2010b, Cvilink et al. 2009b). Další možností je otázka FMO.

Proto byly u *D. dendriticum* provedeny inkubace subcelulárních frakcí s relativně specifickými inhibitory několika oxidačních enzymů s cílem detekovat oxidaci ABZ. Výsledky ukázaly, že pouze inhibitory FMO, α -naftylthiourea a methimazol (MTZ), způsobily výrazný pokles ABZ sulfoxidace. Inhibitory dalších potenciálních enzymů konverzi ABZ neovlivnily, tudíž lze předpokládat, že tyto enzymy se oxidace ABZ u *D. dendriticum* neúčastní (Bártíková et al. 2010b).

Získané výsledky naznačují, že 1. fáze ABZ oxidace u *D. dendriticum* je katalyzovaná pomocí FMO, ale v experimentech za použití thiobenzamidu jako substrátu aktivita FMO detekovaná nebyla. Tento rozpor může být způsobený neschopností parazitické FMO oxidovat thiobenzamid nebo nižší senzitivitou spektrofotometrické detekce thiobenzamid-S-oxidu než je HPLC detekce ABZ-SO (Bártíková et al. 2010b).

Prostřednictvím inhibitorů bylo prokázáno, že také hlavní cestou biotransformace triklabendazolu (TBCZ) je oxidace na triklabendol-sulfoxid (TBCZ-SO), a to za účasti FMO (Devine et al. 2009), což bylo prokázáno i u *F. hepatica*. Po inkubaci *F. hepatica* s TBCZ a MTZ se na parazitovi vyskytly větší změny než po inkubaci pouze s TBCZ (Devine et al. 2010), stejně tak i po inkubaci parazita s piperonyl butoxidem a ketokonazolem, inhibitory CYP 450, spolu s TBCZ (Devine et al. 2011).

V našem experimentu byla aktivita FMO u *M. expansa* stanovena také pomocí thiobenzamidu, tudíž je pravděpodobné, že i u *M. expansa* může být ABZ oxidován právě prostřednictvím FMO, ale způsob, kterým se FMO detekuje, není dostatečně citlivý, aby bylo možné tuto aktivitu prokázat.

10 Závěr

Tímto experimentem bylo prokázáno, že *M. expansa* je schopná biotransformovat vybraná anthelmintika. FLU a MBZ byly biotransformací redukovány na FLU-R a MBZ-R ve velké míře. Naproti tomu se ABZ biotransformuje oxidací na ABZ-SO a ABZ-SO₂. K oxidaci však docházelo pouze omezeně, nepatrná aktivita ale byla v *in vitro* i *ex vivo* experimentech prokázána.

Po stanovení aktivity biotransformačních enzymů, lze shrnout, že z oxidačních enzymů jsou u *M. expansa* aktivní pouze primárně antioxidantní enzymy, tzn. CAT, Px, TGR a SOD. Aktivita FMO a CYP 450 nebyla detekována vůbec. Redukční enzymy byly stanoveny na základě redukce specifických substrátů (4-PC, menadion, daunorubicin, metyrapon, acenaftenol). Nejvyšší aktivita redukčních enzymů byla zaznamenána v cytosolu, menadion byl redukován také v mikrosomech. Redukce metyraponu nebyla prokázána vůbec. Z konjugačních enzymů byly stanoveny GST, UGlcT a UGT. Aktivitu GST se podařilo prokázat v cytosolu, aktivitu UGlcT a UGT potom v mikrosomech a mitochondriích, jejich aktivita je však mnohem nižší než aktivita GST.

11 Použité zkratky

ABC	ATP binding cassette
ABZ	albendazol
ABZ-SO	albendazol-sulfoxid
ABZ-SO ₂	albendazol-sulfon
ACN	acetonitril
AKR	aldoketoreduktasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CBR	karbonylreduktasa
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CYP	cytochrom P 450
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FLU	flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
FMO	flavinové monooxygenasy
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
H ₂ O ₂	peroxid vodíku

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrofotometrií
MBZ	mebendazol
MBZ-NH ₂	hydrolyzovaný mebendazol
MBZ-R	redukovaný mebendazol
MDR	dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem
MeOH	methanol
MTZ	methimazol
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OPD	o-fenylendiamin
p-NF	p-nitrofenol
PBS	0.01 M sodno-fosfátový pufr s přídavkem NaCl
Px	peroxidasa
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SDR	dehydrogenasy s krátkým řetězcem
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
SOD	superoxiddismutasa
TB	thiobenzamid
TBCZ	triklabendazol
TBSO	S-oxid thiobenzamidu
TBCZ-SO	triklabendazol-sulfoxid
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TCA	trichloroctová kyselina
TrxR	thioredoxinreduktasa
TGR	thioredoxin-glutathionreduktasa

UDP	uridindifosfát	
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina	
UGlcT	UDP-glukosyltransferasa	
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa	
UV-VIS	ultrafialovo-viditeľná (spektrofotometrie)	
WST	sodná (2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolia	sůl
XO	xanthinoxidasa	
3 α -HSD	3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa	
4-PC	4-pyridinkarboxaldehyd	
11 β -HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa	

12 Seznam obrázků

Obrázek 1 Hlavička a zralý článek tasemnice	13
Obrázek 2 <i>Moniezia expansa</i>	14
Obrázek 3 Detailní zobrazení článků (<i>Moniezia expansa</i>)	15
Obrázek 4 Životní cyklus tasemnice ovčí	16
Obrázek 5 Albendazol a jeho metabolity	20
Obrázek 6 Mebendazol a jeho metabolity.....	22
Obrázek 7 Flubendazol a jeho metabolity (a)	23
Obrázek 8 Flubendazol a jeho metabolity (b).....	24
Obrázek 9 Vliv enzymů na vznik formazanu.....	59
Obrázek 10 Závislost absorbance roztoků BSA na jejich koncentraci	73
Obrázek 11 Výsledná koncentrace ABZ-SO, FLU-R, MBZ-R (<i>in vitro</i>).....	75
Obrázek 12 Porovnání koncentrací ABZ a ABZ-SO v homogenátu	77
Obrázek 13 Porovnání koncentrací ABZ-SO a ABZ-SO ₂ v homogenátu	77
Obrázek 14 Porovnání koncentrací MBZ a MBZ-R v homogenátu	78
Obrázek 15 Porovnání koncentrací FLU a FLU-R v homogenátu	79
Obrázek 16 Koncentrace metabolitů anthelmintik (FLU-R, MBZ-R) v médiu..	80
Obrázek 17 Specifická aktivita katalasy v biologických frakcích	81
Obrázek 18 Hodnoty specifické glutathionreduktasové aktivity TGR v biologických frakcích.....	83
Obrázek 19 Hodnoty specifické aktivity peroxidasy v biologických frakcích ...	84
Obrázek 20 Specifická aktivita SOD v biologických frakcích	85
Obrázek 21 Redukce specifických substrátů v biologických frakcích	87
Obrázek 22 Specifická aktivita GST v biologických frakcích.....	88
Obrázek 23 Specifická aktivita UGT a UGlcT v biologických frakcích	89

13 Seznam tabulek

Tabulka 1 Příprava roztoků pro kalibrační křivku	45
Tabulka 2 Příprava homogenátu	51
Tabulka 3 Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení CAT	54
Tabulka 4 Příprava mikrotitrační destičky pro stanovení SOD	60
Tabulka 5 Substráty isoformem CYP 450	62
Tabulka 6 Hodnoty koncentrace bílkovin v biologických frakcích.....	74
Tabulka 7 Výsledná koncentrace metabolitů anthelmintik (<i>in vitro</i>)	75
Tabulka 8 Koncentrace ABZ, ABZ-SO a ABZ-SO ₂ v homogenátu.....	76
Tabulka 9 Výsledné hodnoty koncentrace MBZ a MBZ-R v homogenátu	78
Tabulka 10 Výsledné hodnoty koncentrace FLU a FLU-R v homogenátu	79
Tabulka 11 Výsledné hodnoty koncentrace metabolitů anthelmintik v médiu... 80	
Tabulka 12 Specifická aktivita CAT v biologických frakcích.....	81
Tabulka 13 Specifická glutathionreduktasová aktivita TGR v biologických frakcích.....	82
Tabulka 14 Specifická aktivita peroxidasy v biologických frakcích	83
Tabulka 15 Specifická aktivita SOD v biologických frakcích.....	84
Tabulka 16 Stanovení specifické aktivity redukčních enzymů.....	86
Tabulka 17 Specifická aktivita GST v biologických frakcích	87
Tabulka 18 Specifická aktivita UGT v biologických frakcích	89
Tabulka 19 Specifická aktivita UGlcT v biologických frakcích.....	89

14 Použitá literatura

Azevedo J.L., Hyman B.C. (1993) Molecular characterization of lengthy mitochondrial DNA duplications from the parasitic nematode *Romanomermis culicivorax*. *Genetics* 133, 933–942.

Bártíková H., Křížová V., Štěpničková M., Lamka J., Kubiček J., Skálová L., Skotáková B. (2010a) Activities of biotransformation enzymes and flubendazole metabolism in lambs (*Ovis aries*): Effect of gender and flubendazole therapy. *Pharmacological Reports*; 62, 362-373.

Bártíková H., Vokřál I., Skálová L., Lamka J., Skotáková B. (2010b) *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*. *Xenobiotika*; 40(9), 593-601.

Bártíková H., Vokřál I., Skálová L., Kubiček V., Fírbasová J., Briestenský D., Lamka J., Szotáková B. (2012) The activity of drug metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 139(6), 809-818.

BIODIDAC: A bank of digital resources for teaching [online]. Poslední revize 10.2012. [cit. 2012-10-13]. Dostupné z <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>.

BioLib - Moniezia expansa (tasemnice ovčí) [online]. Poslední revize 11.2012. [cit. 2012-11-20]. Dostupné z <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id43811/>.

Bodeček Š., Koudela B. *Veterinární a chovatelská opatření proti vnitřním parazitům u koní* [online]. Poslední revize 11.2010. [cit. 2012-09-03]. Dostupné z http://cehis.cz/publik_syst/files11/Veterinarni%20a%20chovatelska%20opatreni%20pro%20vnitrim%20parazitum%20u%20koni.pdf.

Bogitsh B.J., Carter C.E., Oeltman T.N. (2005) *Human Parasitology*. 3rd edition. Elsevier Academic Press, p. 459. ISBN 0978-0-12-088468-1.

Bonilla M., Denicola A., Novoselov S.V., Turnov A.A., Protasio A., Izemendi D., Gladyshev V.N., Salina G. (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J. Biol. Chem.* 26, Vol. 283, 17898-17907.

Brophy P.M., Southan C., Barrett J. (1989) Glutathion transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem. J.*; 262, 939-946.

Brophy P.M., MacKintosh N., Morpew R.M. (2012) Anthelmintic metabolism in parasit helminths: proteomic insights. *Parasitology*; 139 (9), 1205-17.

Carlberg I., Mannervik B. (1985) Glutathion reductase. *Meth. Enzymology*; 113, 484-490.

Cashman J.R. (1995) Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem Res Toxicol*; 8 (2), 166–81.

Cestodes [online]. Poslední revize 09.2008. [cit. 2012-12-30]. Dostupné z <http://www.iranhelminthparasites.com/species/cestodes.htm#2>.

Craig C.R., Stitzel R.E. (2004) *Modern Pharmacology with Clinical Applications*. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, p. 824. ISBN 9780781737623.

Cvilink V., Kubiček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběnková M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L. (2008a) Biotransformation of flubendazol and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*; 151, 242-248.

Cvilink V., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Kostiatinen R., Ketola R.A. (2008b) LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolits formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*. *Anal Bioanal Chem*; 391, 337-343.

Cvilink V., Lamka J., Skálová L. (2009a) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*, 41:1,8 — 26.

Cvilink V., Szotáková B., Křížová V., Lamka J., Skálová L. (2009b): Phase I biotransformation of albendazole in lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Research in Veterinary Science*; 86, 49-55.

Danaher M., Ruyck d. H., Crooks S.R.H., Dowling G., O'Keefe M. (2007) Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrice. *Journal of Chromatography B*, 845, 1-37.

Denegri G., Bernardina W., Perez-Serrano J., Rodriguez-Caabeiro F. (1998) Anoplocephalid cestodes of veterinary and medical significance: a review. *Folia parasitologica*; 45, 1-8.

Devine C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Hoey E., Fairweather I. (2009) Effect of metabolic inhibitor, methamizole on the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*; 136, 183-192.

Devine C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgerr A., Hoey E., Fairweather I. (2010) Potentiation of triclabendazole sulphoxide-induced tegumental disruption by methamizole in a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*; 106, 1351-1363.

Devine C., Brennan G.P., Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgerr A., Hoey E., Fairweather I. (2011) Enhancement of triclabendazole action *in vivo* against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* by co-treatment with ketoconazole. *Veterinary Parasitology*; 177, 305-315.

Dostálek M. *Enzymatický systém cytochromu P450* [online]. Poslední revize 09/2012. [cit. 2012-09-08]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/enzymaticky-system-cytochromu-p450-170727>.

Ducháček L., Lamka J. (2006) *Veterinární vademecum pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 128 s. ISBN 80-246-1263-1.

Eswaramoorthy S., Bonanno J.B., Burley S.K., Swaminathan S. (2006) Mechanism of action of a lavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103(26), 9832-7.

Góth L. (2003) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*; 196, 143-152.

Internal Parasites of Sheep and Goats [online]. Poslední revize 12.2012. [cit. 2012-12-30]. Dostupné z <http://www.vetnext.com/search.php?s=onderwerp&id=73084680819%20170>.

Isaac R.E., Muimo R., Macgregor A.N. (1990). N-Acetylation of serotonin, octopamine, and dopamine by adult *Brugia-Pahangi*. *Mol Biochem Parasitol*; 43, 193–198.

James C.E., Hudson A.L., Davey M.W. (2009) Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. *Trends in parasitology*; 25, 7, 328-335.

Jurášek V. (1987) *Parazitológia a invázní choroby*. Bratislava: Príroda, 350 s.

Jurášek V., Dublinský P. et al. (1993) *Veterinární parazitológia*. Bratislava: Príroda a.s. 382 s. ISBN 80-07-00603-6.

Kerboeuf, D., Soubieux, D., Guilluy, R., Brazier, J.L., Riviere, J.L. (1995). In vivo metabolism of aminopyrine by the larva of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasitol Res*; 81, 302–304.

Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*; 94, 913-918.

Kotlářová L., Skála B. (2011) Cílená detoxikace jako podpora účinné farmakoterapie. *Practicus*; 3, 28-30.

Kotze A.C. (1997) Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int J Parasitol*; 27, 33–40.

Kotze A.C., Dobson R.J., Chandler D. (2006) Synergism of rotenone by piperonyl butoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*: potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxication pathways. *Vet Parasitol*; 136, 275–282.

Lamka J., Ducháček L. (2008) *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum. 151 s. ISBN 978-80-246-1243-0.

Lanchote V.L., Marques M.P.C., Takayanagui O.M., Carvalho d. R., Paian F.O., Bonato P.S. (1998) Simultaneous determination of albendazole sulphoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 709, 2, 273–279.

Legáth J. *Xenbiotiká a ich toxikologický účinok* [online]. Poslední revize 08.2012. [cit. 2012-09-02]. Dostupné z <http://nrl.uvm.sk/tox/>.

Maté L., Virkel G., Lifschitz A., Ballent M., Lanusse C. (2008) Hepatic and extra-hepatic metabolit pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep, *Biochemical Pharmacology*; 76, 773-83.

Mehlhorn H. (2008) Encyclopedia of Parasitology. 3rd edition. Berlin: Springer. p. 1592. ISBN 978-3-540-48994-8.

Mottier M.L., Alvarez L.I., Pis M.A., Lanusse C.E. (2003) Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol–water partition coefficients. *Experimental Parasitology*; 103, 1–7.

Munir, W. A., Barrett, J. (1985). The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology* 91(Pt 1):145–156.

Parasite Control and Prevention [online]. Poslední revize 07.2008. [cit.2012-09-11] Dostupné z <http://www.infovets.com/books/smrm/B/B620.htm>.

Precious W.Y., Barrett J. (1989) Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitol Today*; 5, 156–160.

Roberts L.S., Janovy J. jr. (2009) Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 8th edition. New York: McGraw-Hill. p. 750. ISBN 978–0–07–302827–9.

Sangster N.C. (1999) Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*; 29, 115-124.

Sedlák E. (2005) Zoologie bezobratlých. 2. přepracované vydání. Masarykova univerzita Brno. 338 s. ISBN 80-210-2892-0.

Skálová L., Boušová I. et al. (2011) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Praha: Karolinum. 162 s. ISBN 978-80-246-1917-0.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Pallia A.K., Gantner F.H., Provanzano M.D., Fujimoto E.K., Gorké N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*; 150, 76-85.

SOD determination kit [online]. Poslední revize 4.2012. [cit. 2012-11-02], dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.Par.0001.File.tmp/19160dat.pdf>.

Solana H.D., Rodriguez J.A., Lanusse C.E. (2001) Comparative metabolism of albendazol and albendazol sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitol Res* 87: 275-280.

Souhrn údajů o přípravku Aldifal [online]. [cit. 2012-10-21]. Dostupné z <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c7801705ce.doc>.

Souhrn údajů o přípravku Antiverm 100mg/g [online]. [cit. 2012-10-21]. Dostupné z <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c78008e339.doc>.

Souhrn údajů o přípravku Flubenol 5% [online]. [cit. 2012-10-21]. Dostupné z <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780191dd4.doc>.

Stiborová M., Hudeček J., Páca J.jr., Martínek V., Páca J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*; 98, 876 – 890.

Tluchoř V. a kol. *Moniezióza u lamy alpaky* [online]. Poslední revize 07.2012. [cit. 2012-08-16]. Dostupné z <http://vetklinika-laborator.blog.cz/0609>.

Vokřál I., Bártíková H., Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubíček V. (2012) The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*; 139, 1309-1316.

Volf P., Horák P. a kol. (2007) *Paraziti a jejich biologie*. 1. vydání. Praha: Triton. p. 318. ISBN 978-80-7387-008-9.

Vrzgula L., Jagoš P. a kol. (1986) *Vnútorné choroby prežúvavcov a ošípovaných*. Bratislava: Príroda. 281 s.

Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna v. G., Gangster N.C. (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*; 20, 10, 469-476.