

## INTRYGUJĄCY WPŁYW ALBENDAZOLU NA AKTYWNOŚĆ REDUKTAZY GLUTATIONU W MIĘŚNIACH MYSZY ZARAŻONYCH *TRICHINELLA SPIRALIS*

ANNA PRZYDANEK, KRYSZYNA BOCZOŃ, ELŻBIETA WANDURSKA-NOWAK,  
WALDEMAR WOJT I AGNIESZKA WOJTKOWIAK

Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego,  
ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

**ABSTRACT.** The intriguing influence of albendazole on glutathione reductase activity in the muscles from *Trichinella spiralis* infected mice. A clear stimulation of the activity of glutathione reductase (RG, EC 1.6.4.2), one of the major enzymes participating in glutathione metabolism, was observed in the skeletal muscles from *Trichinella spiralis* infected mice. The maximal, almost two-fold increase in RG activity was observed in week 5 post-infection. Administration of albendazole, an anthelmintic widely used in trichinellosis treatment, resulted in an additional, about 40% stimulation of RG activity (small, but statistically significant) on week 2 post-infection. In weeks 6 and 7 post-infection, when no stimulation of RG activity in infected mice caused by drug was observed, the drug modified the structure of that allosteric enzyme, affecting the kinetics of its substrate saturation in this way that the shape of the substrate saturation curve changed from „double sigmoidal”, typical of this enzyme kinetics in the muscles from infected mice, to hyperbolic, typical of this enzyme kinetics in the control, uninfected animals.

**Key words:** albendazole, glutathione reductase, trichinellosis.

### WSTĘP

Reduktaza glutationu (RG, EC 1.6.4.2) należy do enzymów metabolizmu glutationu, który jest bardzo ważnym przeciwutleniaczem, neutralizującym w żywych komórkach toksyczny wpływ wolnych rodników tlenowych i nadtlenków organicznych. RG jest białkiem homodimerycznym; w skład każdej z dwóch podjednostek tej flawoproteiny wchodzi trzy domeny strukturalne: wiążąca FAD, wiążąca NADPH oraz domena styku podjednostek. RG jest enzymem wszechobecnym, niezbędnym dla cyklu utleniająco-redukującego glutationu i odpowiedzialnym za utrzymanie odpowiedniego poziomu zredukowanego glutationu w komórkach. RG katalizuje reakcję redukcji przez NADPH dwusiarczkowej formy utlenionej glutationu (GSSG) do jego formy hydrosulfidowej (GSH). Miejscem wiązania GSSG jest domena wiążąca FAD jednej podjednostki oraz domena styku podjednostek drugiej podjednostki RG.

Ostatnio wiele uwagi poświęca się mechanizmom antyoksydacyjnym występującym u pasożytów (Bruschi i Lucchi 2001). Wiadomo, że mechanizmy antyoksydacyjne obejmują m.in. aktywność takich enzymów metabolizmu glutationu jak transferaza glutationowa, peroksydaza glutationowa oraz reduktaza glutationu. Stwierdzono, że większość pasożytów posiada glutation lub inne pochodne tiolowe, np. trypanotion występujący u trypanosom (Fairlamb i wsp. 1985). Nie mniej interesujące wydają się badania metabolizmu glutationu w tkankach żywiciela. Nasze dotychczasowe badania wykazały w mięśniach myszy zarażonych *Trichinella spiralis* zarówno stymulację indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) produkującej NO (Boczoń i Wargin 2000, Boczoń i wsp. 2002), jak i wzrost aktywności transferazy glutationowej oraz peroksydazy glutationowej (Derda i Hadaś 2000; Derda i wsp. 2001, 2003).

Celem prezentowanych badań było określenie w mięśniach myszy zarażonych *T. spiralis* aktywności RG oraz wpływu na ten enzym albendazolu, leku z wyboru w leczeniu włośnicy. Badania wpływu leku na RG prowadzono dwutorowo: analizowano wpływ leku zarówno na aktywność enzymu, jak i na charakterystykę kinetyki reakcji katalizowanej przez RG (na krzywe wysycenia substratem). Jak wiadomo, enzymy o budowie podjednostkowej dysocjują na podjednostki (np. po przemrożeniu) i wtedy krzywa wysycenia substratem zmienia kształt sigmoidalny na kształt hiperboliczny, typowy dla enzymów monomerycznych. Istnieją jednak enzymy wolno dysocjujące, których krzywa wysycenia substratem przybiera kształt tzw. „podwójnej sigmoidalności” (Kurganov 1975). Prostą metodą przekonania się o wpływie leku na trójwymiarową strukturę RG było wykreślenie odpowiednich krzywych wysycenia substratem tego enzymu, analizowanych w mięśniach zwierząt zarażonych oraz zarażonych i leczonych.

#### MATERIAŁ I METODY

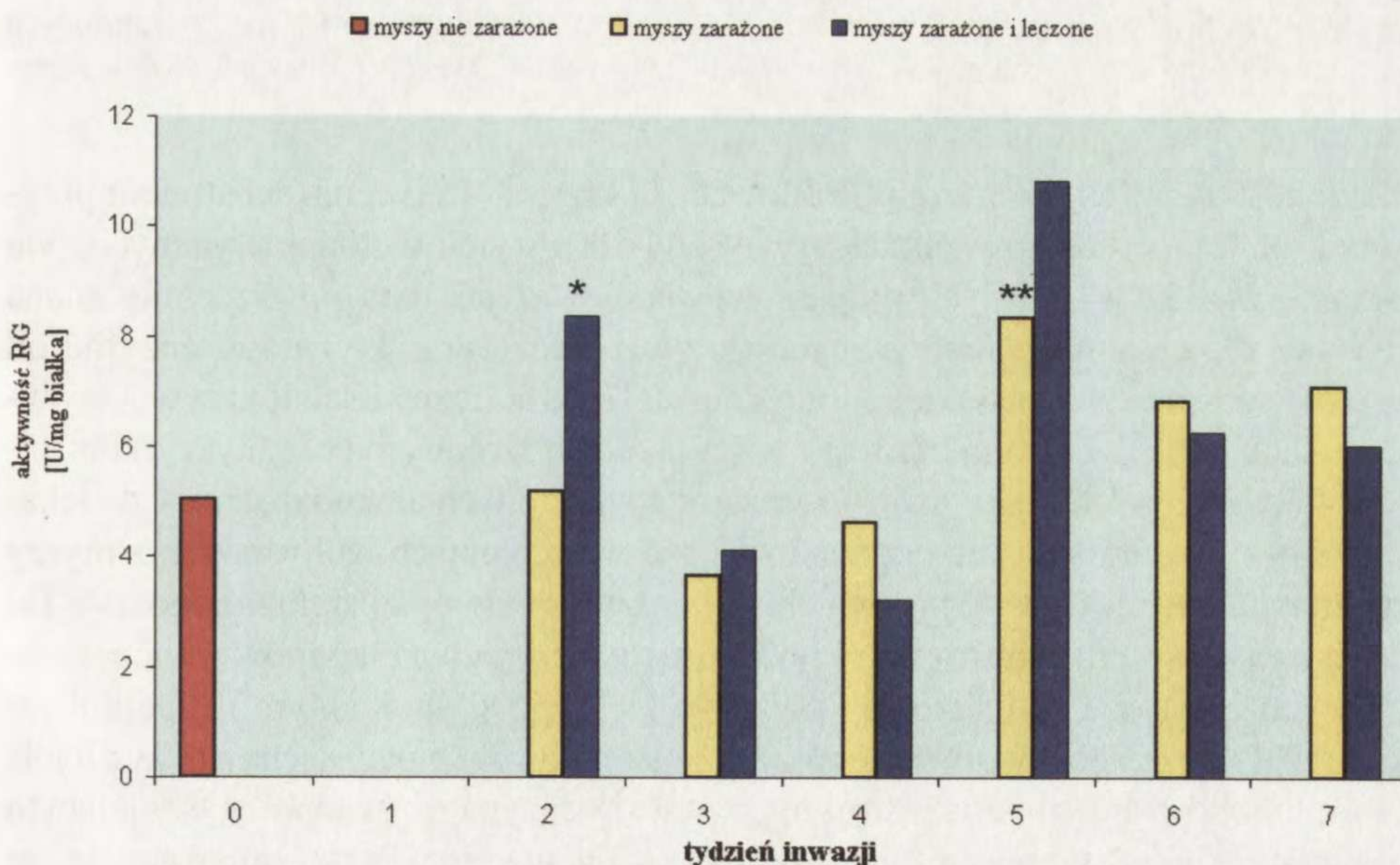
Materiał do badań stanowiły mięśnie szkieletowe (czworogłowe uda), izolowane z trzech grup myszy szczepu BALB/c: niezarażonych kontroli, zarażonych larwami *T. spiralis* (szczep MSUS/PO/60/ISS3) (dawka 400 larw/mysz) oraz zarażonych i leczonych albendazolem (Zentel firmy SmithKline Beecham). Lek podawano *per os* 6. i 27. dnia inwazji w całkowitej dawce 50 mg/kg masy ciała. Mięśnie myszy homogenizowano i wirowano przez 30 minut przy sile odśrodkowej 15000 x g. Uzyskane supernatanty stanowiły materiał, w którym oznaczano aktywność reduktazy glutationu (RG). Materiał do badań pobierano w odstępach tygodniowych, od 2. do 7. tygodnia inwazji.

Aktywność reduktazy glutationu określano metodą spektrofotometryczną, rejestrując spadek absorbancji wywołany utlenianiem NADPH przy długości fali światła 340 nm. Podstawę pomiaru stanowiła redukcja glutationu przez NADPH w obecności enzymu zawartego w preparacie. Aktywność RG wyrażono w jednostkach

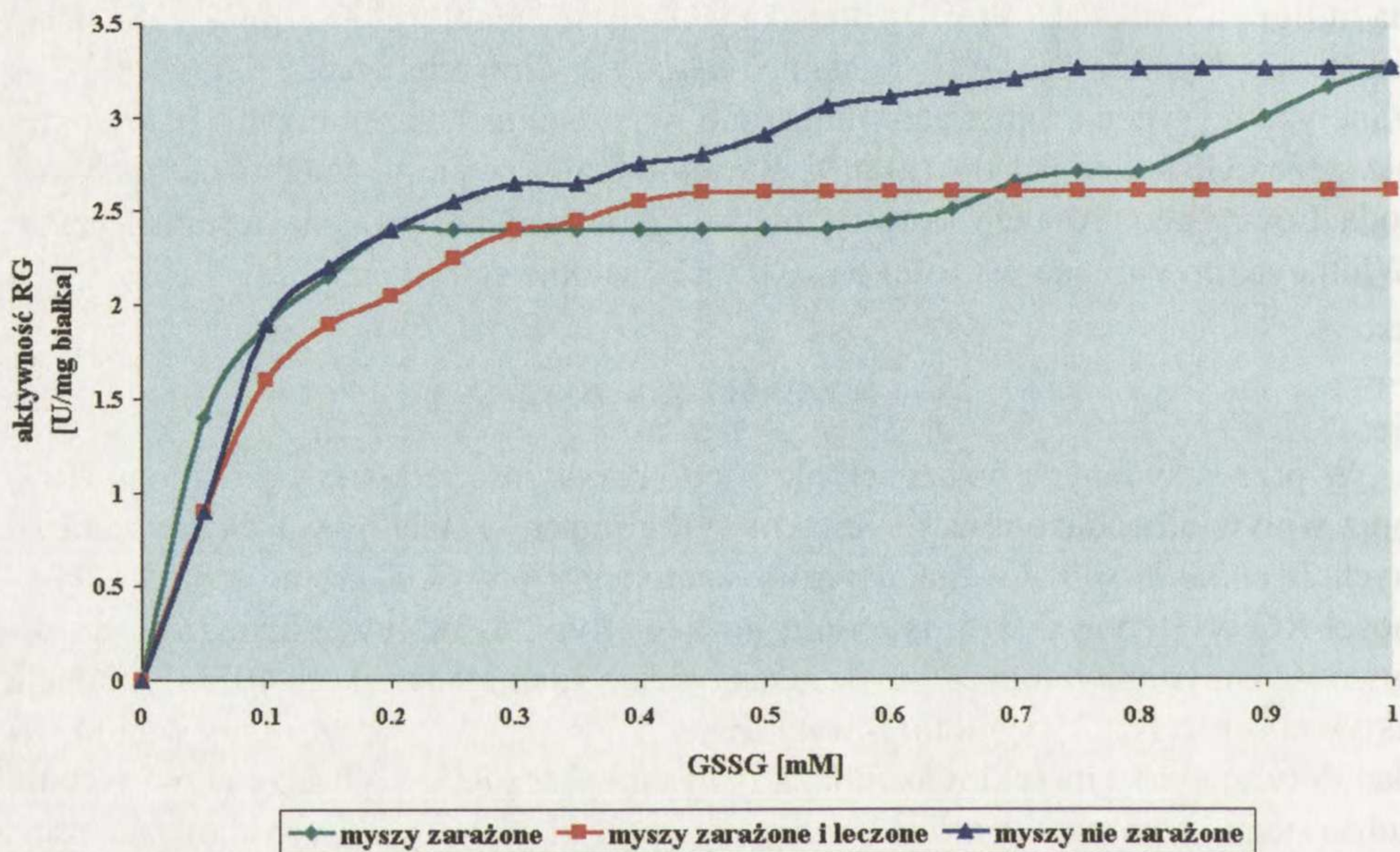
na miligram białka (U/mg); 1 jednostka RG odpowiada ilości enzymu katalizującej utlenienie 1  $\mu$ mola NADPH w ciągu 1 minuty w temperaturze 25°C przy pH 7,5. Kinetykę wysycenia substratem mierzono w preparatach przemrażanych, w zakresie stężeń GSSG od 0,1 do 1,0 mM. Stężenie białka w preparatach oznaczano metodą Lowry'ego. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono testem Manna-Whitneya, przyjmując wartości  $p < 0,05$  jako istotne statystycznie.

### WYNIKI I DYSKUSJA

W przedstawianych badaniach określono aktywność reduktazy glutationu (RG) oraz wpływ albendazolu na ten enzym w mięśniach szkieletowych myszy zarażonych *Trichinella spiralis*. Statystycznie znamienne, prawie 2-krotny wzrost aktywności RG występował w 5. tygodniu inwazji (Rys. 1). Wpływ albendazolu na aktywność enzymu był niewielki, ale statystycznie znamienne: około 40% stymulacja aktywności RG w 2. tygodniu inwazji (Rys. 1). Rysunek 2 przedstawia wyniki badań dotyczących kinetyki reakcji katalizowanej przez RG, czyli krzywe wysycenia substratem, w preparatach dwukrotnie przemrażanych, uzyskanych z mięśni zarażonych myszy w 6. i 7. tygodniu inwazji. Przemrażanie powinno rozbijać strukturę



Rys. 1. Poziom aktywności reduktazy glutationu (RG) w mięśniach szkieletowych myszy zarażonych *Trichinella spiralis* (dawka 400 larw/mysz) oraz myszy zarażonych i leczonych albendazolem (całkowita dawka 50 mg/kg masy ciała). Wyniki są wyrażone w U/mg białka. Dane przedstawiają średnie reprezentujące grupę od 5 do 10 zwierząt. \* – różnica statystycznie istotna w stosunku do grupy kontrolnej – myszy zarażonych i nieleczonych ( $P < 0,05$ ). \*\* – różnica statystycznie istotna w stosunku do grupy kontrolnej – myszy niezarażonych ( $P < 0,01$ ).



Rys. 2. Zależność aktywności reduktazy glutationu (RG) od stężenia substratu (GSSG) w mięśniach szkieletowych myszy zarażonych *Trichinella spiralis* (dawka 400 larw/mysz) oraz myszy zarażonych i leczonych albendazolem (całkowita dawka 50 mg/kg masy ciała). Dane przedstawiają średnie reprezentujące grupę od 3 do 5 zwierząt

podjednostkową RG, co może powodować, że krzywa wysycenia substratem przybiera kształt hiperboliczny, charakterystyczny dla enzymów monomerycznych. Nie badano kinetyki w świeżych preparatach, ponieważ jest ona powszechnie znana i typowa dla enzymów dimerycznych (krzywa zależności aktywności enzymu od stężenia substratu ma charakter sigmoidalny). Hiperboliczny kształt krzywej wysycenia substratem uzyskano zarówno w preparatach izolowanych z myszy kontrolnych (niezarażonych), jak i myszy zarażonych i leczonych albendazolem. Co ciekawe, inaczej kształtowała się krzywa uzyskana w preparatach izolowanych z myszy zarażonych i nieleczonych; ma ona charakter tzw. „podwójnej sigmoidalności”. Taką krzywą wysycenia substratem uzyskuje się w przypadku enzymów trudno dysocjujących i jest ona wypadkową krzywej o kształcie sigmoidalnym i hiperbolicznym. Być może, pod wpływem zarażenia larwami *T. spiralis*, enzym żywiciela zmienił swoją trójwymiarową strukturę i stał się enzymem „trudno” dysocjującym (przynajmniej pod wpływem przemrażania). Ciekawym spostrzeżeniem jest to, że pod wpływem leku enzym stawał się „łatwo” dysocjującym. Może to sugerować, że oddziaływanie leku na strukturę trójwymiarową enzymu zmienia zdolność dysocjacji tego enzymu. Lek, choć wywiera niewielki wpływ stymulujący na aktywność RG, może wywoływać zmiany w konformacji enzymu. Należałoby w przyszłości przebadać wpływ czynników innych aniżeli przemrażanie, na kinetykę reakcji wy-

sycenia substratem RG, zarówno u myszy nieleczonych, jak i leczonych. Wpływ al-bendazolu na enzym obrony biochemicznej żywiciela stawia w nowym świetle me-CHANIZM DZIAŁANIA LEKÓW Z GRUPY BENZYMIDAZOLI: dotychczas za główny punkt dzia-łania tych leków uważano tubulinę pasożyta. Uzyskane wyniki zdają się potwier-żać nowatorską tezę, że benzimidazole, poza bezpośrednim działaniem przeciw-pasożytniczym, mogą również wpływać na biochemiczne mechanizmy obronne ży-wiciela, co zwiększa całkowitą potencję działania tych leków.

#### LITERATURA

- Boczoń K., Wargin B. 2000. Inducible nitric oxide synthase in the muscles of *Trichinella spiralis* in-fected mice treated with Depomedrol. *Comparative Parasitology* 67: 230-235.
- Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Szulc M. 2002. The effect of albendazole on iNOS-derived NO production in experimental trichinellosis. *Helminthologia* 39: 17-21.
- Bruschi F., Lucchi N. 2001. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites: no doubt on their evasive role. *Acta Parasitologica* 46: 233-241.
- Derda M., Hadaś E. 2000. Antioxidant and proteolytic enzymes in experimental trichinellosis. *Acta Parasitologica* 45: 356-361.
- Derda M., Wandurska-Nowak E., Boczoń K. 2001. Glutathione-S-transferase activity in mouse musc-le during experimental trichinellosis. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 227-232.
- Derda M., Boczoń K., Wandurska-Nowak E., Wojt W. 2003. Changes in the activity of glutathione-S-transferase in muscles and sera from mice infected with *Trichinella spiralis* after treatment with albendazole and levamisole. *Parasitology Research* 89: 509-512.
- Fairlamb A., Blackburn P., Urich P., Chait B., Cerami A. 1985. Trypanothione: a novel bis(glu-tathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227: 1485-1487.
- Kurganov B. 1975. Regulatory properties of slowly equilibrating association-dissociation enzyme sys-tems. In: *Mechanism of action and regulation of enzymes* (Ed. T. Keleti). Akademiai Kiado, Budapest: 29-42.

Zaakceptowano do druku 4 maja 2004