

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

CHARAKTERIZACE ENZYMŮ REDUKUJÍCÍCH KARBONYLOVÉ  
SLOUČENINY U VLASOVKY SLEZOVÉ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Nikola Rychlá

Hradec Králové 2023

Lucie Kunzová

„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.“

V Hradci Králové dne

Lucie Kunzová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, rady a připomínky v průběhu řešení a zpracování diplomové práce. Dále děkuji pracovníkům katedry biochemických věd za vytvoření příjemného prostředí pro provedení experimentální části práce a v neposlední řadě za pomoc při experimentální práci děkuji Mgr. Nikole Rychlé.

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucie Kunzová

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

Konzultant: Mgr. Nikola Rychlá

Název diplomové práce: Charakterizace enzymů redukcujících karbonylové sloučeniny u vlasovky slezové

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), jeden z nejpatogennějších parazitů malých přežvýkavců jako jsou kozy a ovce, si vyvinul rezistenci vůči všem používaným anthelmintikům. Předpokládá se, že k rozvoji lékové rezistence přispívají i detoxikační enzymy, které představují hlavní obranný systém proti škodlivým xenobiotikům a u tohoto druhu nejsou plně prozkoumány. Tato práce je proto zaměřená na studium enzymů vlasovky slezové, konkrétně na reduktasy karbonylových sloučenin pomocí specifických substrátů a inhibitorů. Byly připraveny subcelulární frakce (cytosol a mikrosomy) z dospělců vlasovky slezové pro následné *in vitro* experimenty. V jednotlivých frakcích byla stanovena koncentrace proteinů a aktivita reduktas vůči různým substrátům. Substráty byly zvoleny na základě znalosti o lidských biotransformačních enzymech. Nejvyšší aktivita v cytosolu byla zjištěna pro substráty glyceraldehyd ( $8,22 \pm 0,82$  [nmol/min/mg]) a menadion ( $4,63 \pm 0,46$  [nmol/min/mg]), v mikrosomální frakci pro menadion ( $4,38 \pm 0,36$  [nmol/min/mg]) a metyrapon ( $1,92 \pm 0,14$  [nmol/min/mg]). Specifické inhibitory (glycyrrhetinová kyselina, luteolin, naringenin, kvercitrin a silibinin) způsobily signifikantní pokles aktivity redukčních enzymů v cytosolické i mikrosomální frakci vlasovky. Výsledky poukazují na přítomnost některých enzymů z nadrodin aldo-ketoreduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), konkrétně cytosolických enzymů AKR1B10 a AKR1C z nadrodiny AKR a cytosolické CBR1 a mikrosomální 11 $\beta$ -HSD1 z nadrodiny SDR.

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lucie Kunzová

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

Consultant: Mgr. Nikola Rychlá

Title of Thesis: Characterization of carbonyl-reducing enzymes in barber's pole worm

Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*), one of the most pathogenic parasites of small ruminants as sheep and goats, has developed resistance against all used anthelmintic drugs. Detoxifying enzymes, which represent the main defense system against harmful xenobiotics, can also contribute to the development of drug resistance, and they are not fully explored in this organism. This research is focused on the study of carbonyl-reducing enzymes in barber's pole worm using specific substrates and inhibitors. Subcellular fractions (cytosol and microsomes) were prepared from adult worms for following *in vitro* experiments. Protein concentration and reductase activity towards different substrates were determined in each fraction. Substrates were chosen based on knowledge of human biotransformation enzymes. The highest activity in cytosol has been detected for glyceraldehyde ( $8,22 \pm 0,82$  [nmol/min/mg]) and menadione ( $4,63 \pm 0,46$  [nmol/min/mg]), in microsomal fraction for menadione ( $4,38 \pm 0,36$  [nmol/min/mg]) and metyrapone ( $1,92 \pm 0,14$  [nmol/min/mg]). Specific inhibitors (glycyrrhetic acid, luteolin, naringenin, quercitrin and silibinin) have significantly decreased the activity of reducing enzymes in cytosolic and microsomal fractions of *H. contortus*. According to results the presence of cytosolic enzymes AKR1B10 and AKR1C from aldo-ketoreductase superfamily (AKR) and cytosolic CBR1 and microsomal 11 $\beta$ -HSD1 from short-chain dehydrogenase/reductase superfamily (SDR) can be presumed.

# Obsah

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. <i>Haemonchus contortus</i>	9
2.1.1. Morfologie	10
2.1.2. Kmen ISE	10
2.1.3. Hemonchózy	10
2.2. Rezistence	12
2.3. Biotransformační enzymy	14
2.3.1. Reduktasy	14
2.4. Substráty karbonylreduktas	17
2.5. Inhibice enzymů	21
3. Cíl práce	26
4. Biologický materiál, chemikálie a přístrojové vybavení	27
4.1. Biologický materiál	27
4.2. Chemikálie	27
4.3. Přístroje	28
4.4. Pracovní pomůcky	28
5. Metodika	29
5.1. Příprava pufrů	29
5.2. Příprava subcelulárních frakcí	29
5.3. Stanovení koncentrace bílkovin	31
5.4. Stanovení aktivity reduktas karbonylové skupiny	33
– spektrofotometrické stanovení v destičce	
5.4.1. Stanovení aktivity reduktas pomocí acenaftenolu	33
5.4.2. Stanovení aktivity reduktas pomocí různých substrátů	35
5.5. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas	37

6. Výsledky	39
6.1. Stanovení koncentrace bílkoviny v subcelulárních frakcích	39
6.2. Stanovení aktivity reduktas v cytosolu	40
6.3. Stanovení aktivity reduktas v mikrosomální frakci	41
6.4. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas v cytosolu	43
6.4.1. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči glyceraldehydu	43
6.4.2. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči menadionu	49
6.5. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas v mikrosomální frakci	55
6.5.1. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči menadionu	55
6.5.2. Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči metyraponu	61
7. Diskuse	67
8. Závěr	71
9. Literatura	72

# 1. Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je gastrointestinální parazitická hlístice hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Způsobuje nemoc zvanou hemonchóza. Dospělí jedinci se nacházejí v *abomasu* zvířat a způsobují závažné zdravotní potíže až smrt a tím i ekonomické ztráty zemědělců, hlavně nákazou ovcí.

Řešením tohoto problému je farmakologická i nefarmakologická prevence (např. rotace spásaných polí, kvalitní strava, vytvoření refugií parazitů pro snížení vývinu obranných mechanismů proti léčbě, tím že se bezpříznaková část stáda vůbec neléčí) a farmakologická léčba. Komplikuje to ale stále rostoucí rezistence, a dokonce i multirezistence na anthelmintika, která se dále rychle rozvíjí díky vysoké adaptabilitě těchto organismů. Hojné používání léků navíc vznik rezistence podporuje. Častým kontaktem parazitů s molekulou léčiva ve snížené (subletální) koncentraci si vlasovka vyvíjí různé obranné mechanismy a léčivo se stává neúčinné. Efektivní užívání anthelmintik, tzn. neaplikovat léčbu plošně, ale jen nakaženým zvířatům, umožňuje snížit jejich spotřebu a zároveň snížit kontaminaci životního prostředí a nežádoucí účinky na necílové organismy. Nefarmakologická prevence může také snížit potřebu léčiv, nicméně léčbu farmaky nenahradí. V budoucnu se mohou objevit účinné vakcíny, ale do té doby je potřeba udržet co největší efektivnost léčby.

Paraziti jsou schopni si vyvinout rezistenci i za poměrně krátkou dobu, takže i nová nebo upravená molekula se může rychle ukázat jako nefunkční, proto je důležitý neustálý výzkum těchto organismů, který může vést k vývoji nových léků, vylepšení stávajících, vytvoření lékových synergistů nebo i nových sloučenin narušujících rezistenci. Je možné, že za nedlouho již nebude léčba stávajícími anthelmintiky možná.

Pro zvládnutí nákazy pomocí stávajících a potažmo i budoucích anthelmintik vlasovkou je nutné mít rezistenci pod kontrolou. Důležitou roli ve vzniku rezistence, kromě jiných, hraje metabolismus léků pomocí biotransformačních enzymů, a proto se tato práce zaměřuje právě na studium některých biotransformačních enzymů a na jejich možné inhibitory, jelikož poznání těchto látek může vést ke zlepšení terapie helmintóz (Ghisi et al. 2007, Cvilink et al. 2009, Gilleard 2013, Wolstenholme et al. 2004).



## 2. Teoretická část

### 2.1 *Haemonchus contortus*

Tyto hlístice (*Nematoda*) z řádu Strongylida, čeledi Trichostrongylidae patří k žaludečním parazitům ovcí a koz. Nacházejí se ve sliznici *abomasa* zvířat. Přenáší se orální cestou z kontaminované pastviny. Vajíčka produkované samičkami přísátými ve slezu jsou vylučována hostitelem spolu se stolicí. Vývoj je přímý, bez mezihostitele a jedná se tedy o geohelminnty. Larvy se vylíhnou z vajíček na pastvinách, kde se při vhodných teplotních a vlhkostních podmínkách dále vyvíjí a prochází larválními stádii (L1 – L3), následuje pozření hostitelem, kde pokračuje invazivní larva ve vývoji v dospělého jedince. Po pozření migruje larva přes 3 žaludky, než se dostane do *abomasa*.

Larvy po vylíhnutí z vajíček žijí volně ve vegetaci, živí se bakteriemi přítomnými ve výkalech a dalšími mikroorganismy, svlékají se a dorůstají do infekční L3 larvy, která k pokračování vývoje potřebuje, aby jí spásal nový hostitel. Patogenní larva (stádium L4) a dospělci se ve slezu hostitele živí jeho krví. Nejčastějším příznakem nakažení je anémie, která může vést až ke smrti. Původně se jednalo o parazita hlavně v tropických a subtropických oblastech, ale díky vysoké adaptabilitě je dnes rozšířený prakticky po celém světě. Při nepříznivých podmínkách jsou larvy schopny přetrvat v latentním stádiu a ve vývoji v dospělého jedince pokračovat až to okolní podmínky dovolí.

Druhů vlasovek je více, *Haemonchus contortus* patří mezi nejrozšířenější geograficky i s ohledem na počet hostitelů. Není vyloučena infekce více druhů vlasovek naráz.

Nejčastěji napadá ovce a kozy, není ale vyloučená nákaza jiných zvířat jako jsou jeleni, antilopy, bizoni, skot a žirafy. U těchto druhů to není ale tak časté nebo závažné (Gilleard 2013, Laing et al. 2013).

Vlasovka slezová představuje vhodný modelový organismus parazitických hlístic díky schopnosti rychlého rozvoje rezistence na všechny hlavní skupiny anthelmintik, dobré manipulace genetickým materiálem v laboratorních podmínkách a ovladatelnost životního cyklu, znalost genomu a určité podobnosti s ostatními hlísticemi. (Besier et al. 2016, Sallé et al. 2019) Infekční životaschopné larvy (L3) mohou být dlouhou dobu zakryokonzerované a připravené k použití. Dospělí jedinci jsou dostatečně velcí a samice

navíc produkují velké množství vajíček, takže z jednoho hostitele je možné získat velké množství potřebného genetického materiálu (Gilleard 2013).

### **2.1.1 Morfologie**

Vlasovka má oblý nitkovitý, válcovitý tvar a načervenalé zbarvení. V ústní dutině mají zub (lancetu), kterým jsou schopné perforovat žaludeční stěnu hostitele a sát jejich krev. Je možné pozorovat významný pohlavní dimorfismus. Samci jsou menší, mají obvykle 1–2 cm. Samice jsou větší, dorůstají do velikosti 1,8–3 cm. Samice lze od samců odlišit pomocí bílých vaječníků obtočených kolem střev naplněných červenou krví, díky kterým vzniká bílo-červená spirála viditelná i pouhým okem. Odtud název v angličtině „Barber's pole worm“.

Tělo je pokryté kutikulou, která umožňuje existenci v podmínkách hostitele tím, že chrání parazita před žaludečními šťávami hostitele, a navíc působí proti tlaku tělních tekutin a udržuje vnější tvar těla (Bartásková 2013).

### **2.1.2 Kmen ISE**

Pro tuto práci byl zvolený kmen ISE (Inbred-Susceptible-Edinburgh, MHco3). Jedná se o kmen citlivý vůči všem anthelmintikům. Byl izolován, než byla benzimidazolová anthelmintika uvedena na trh a nebyl tak vlivu anthelmintik vystaven (Zajíčková et al. 2021, Cvilink et al. 2008).

### **2.1.3 Hemonchózy**

Tento druh helmintózy je významný faktor, který ovlivňuje zdraví a produktivitu napadených zvířat (Angulo-Cubillán et al. 2010).

Inkubační doba od napadení po rozvinutí nákazy je u ovcí 2-3 týdny. V průměru dokáže dospělec vlasovky za den vysát až 0,05 ml krve, což má za následek pokles hodnoty hematokritu hostitele. Během nákazy se množství parazitů v hostiteli může pohybovat v rámci až desetitisíců (Bartásková 2013).

Intenzita infekce je závislá na více faktorech: množství červů v trávicím traktu hostitele, stav imunitního systému, podmínky v okolním prostředí (klíma) a strava. Kromě anémie vlivem nedostatečné kompenzace krevních ztrát a úmrtí dochází i k úbytku hmotnosti, zpomalení růstu, hypoalbuminémii, snížení produkce vlny a mléka, zhoršení příjmu

potravy, otokům tělních dutin zvířat a hypertrofii lymfatických uzlin, problémům s dýcháním, objevuje se tmavá stolice s příměsí natrávené krve a bledost sliznic (především spojivek a dásní). Chronická hemonchóza se projevuje především slabostí a sníženým příjmem potravy. Při napadení samic v laktaci se může onemocnění projevit zpomaleným růstem jehňat. Na rozdíl od mnohých dalších gastrointestinálních parazitů nezpůsobuje průjem.

Prevenici nákazy může zlepšit chov v menších stádech na velkých pastvách, střídání půdy, dobrá výživa, karanténa nového zvířete a vliv má i odolnost zvířat (náchylnější jsou mladá zvířata s nedostatečně vyvinutým imunitním systémem). Při splnění těchto podmínek je možné snížit spotřebu profylakticky i kauzálně podávaných anthelmintik a tím i riziko vzniku rezistence. Spotřebu anthelmintik lze snížit také tím, že se budou léčit zvířata jen s klinickými známkami nákazy, a ne plošně celé stádo. Ne vždy je ale toto možné, a navíc je to často velmi nákladné ekonomicky i časově. Pastvinu, kde se zrovna nepasou ovce je možné využít jako pole, nebo případně jako pastvinu pro jiné přežvýkavce (u krav není onemocnění tak závažné a u starších jedinců se nákaza ani nemusí klinicky vyvinout).

Z pohledu prevence je důležité, aby byl pro každý chov na základě vyšetření stanoven odčervovací program, který je přizpůsobený výskytu konkrétních druhů parazitů, aby se zabránilo rozvoji rezistence parazitů vůči odčervovacím preparátům.

Při již probíhající nákaze jsou anthelmintika jediné možné řešení. Cílem léčby není celkové vyhubení parazitů, ale spíše udržení stavu, kdy nedochází k ohrožení zvířat. Používání antiparazitických léčiv v chovech je běžná záležitost, bohužel se stále rostoucí rezistencí, často i multirezistencí, bývá léčba stále obtížnější. Pro co největší efektivnost je důležitá kombinace farmakologických i nefarmakologických opatření (Burke et al. 2009, Jelenková 2017).

## 2.2 Rezistence

Rezistence neboli necitlivost obecně znamená, že organismus, který byl dříve citlivý k léčivu v dané koncentraci, není nadále tímto léčivem ovlivněn.

V dnešní době se jedná o velký problém. Z důvodu časté rezistence bývá léčba nejen helmintóz velmi obtížná až nemožná. Díky genetické diverzitě a velkému rozšíření vlasovek je možný rychlý rozvoj genetických mutací a tím vytvoření imunity proti danému léku, navíc vysoká plodnost a rychlý vývoj parazita tento jev podporuje. Rezistence může být do současného chovu zavlečená i přes zvířata z jiných chovů a přenáší se i do dalších generací. Rozvoj rezistence podporuje selekční tlak, díky kterému se dále rozmnožují jen ti helminti, kteří přežili léčbu, jsou rezistentní a svou rezistenci šíří dál. Zvyšuje se počet helmintů schopných přežít působení dávky léčiva, která je pro ostatní jedince smrtelná (Gilleard 2013, Jelenková 2017).

Pro úspěšný boj s rezistencí je nutné znát mechanismus účinku léčiv a zároveň vědět, jak k tomuto jevu dochází. K mechanismům navození rezistence patří změna cílové molekuly, takže léčivo cíl nerozpozná a změna počtu cílových molekul, takže léčivo nebude dostatečně účinné. Tato procesy označujeme jako farmakodynamické. Další možné mechanismy vytvoření rezistence jsou změna distribuce léčiva v cílovém organismu, čímž se léčivo nedostane na místo účinku. Může se měnit i způsob metabolismu a léčivo je buď deaktivováno, vyloučeno anebo nedochází k jeho aktivaci. Může k tomu docházet i u parazita i u hostitele. Tyto procesy mohou ovlivňovat léčivo jen částečně a šance na přežití parazita se zvyšuje. Roli sehrávají biotransformační enzymy a transportní proteiny parazita a jedná se o farmakokinetický mechanismus.

Při častém kontaktu obzvláště v nižších koncentracích dochází k vytvoření obraných mechanismů proti danému léku, proto je důležité během léčby zvířata nepoddávat nebo nepoužívat prošlá antiparazitika, u kterých může dojít k poklesu koncentrace účinné látky vlivem rozkladu. Důležité je používat antiparazitika v opodstatněných případech.

Rezistence vlasovek se projevila již na všechny hlavní skupiny anthelmintik, ke kterým patří benzimidazoly, levamizol a další agonisté nikotinových receptorů, makrocyclické laktony a milbemiciny (včetně ivermektinu), ale i na další úzkospektrá léčiva jako například klozantel a monepantel.

Odolnost vůči jednomu členu skupiny anthelmintik obvykle znamená necitlivost i k dalším členům skupiny. Postupně se paraziti mohou stát multirezistentní, čili imunní proti více skupinám. Záznamy o reverzibilitě či ztrátě již nabyté rezistence nejsou.

V minulosti se doporučovala rotace anthelmintik, nyní se tento postup za vhodný nepovažuje, jelikož když se už rezistence jednou vyvine, tak se geneticky dále přenáší a šíří (Cvilink et al 2009, Sečkařová 2018, Wolstenholme et al. 2004).

## 2.3 Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy se nachází prakticky ve všech buňkách. Na subcelulární úrovni můžeme enzymy najít v endoplazmatickém retikulu, cytosolu a mitochondriích.

Tyto enzymy jsou zodpovědné za přeměnu xenobiotik (cizorodých látek které neslouží organismu jako zdroj energie ani pro syntézu biomolekul). Jsou bílkovinného charakteru a mají katalytickou aktivitu, to znamená, že snižují aktivační energii potřebnou k chemickým reakcím. Vznikají tak hydrofilnější a více polární molekuly, které obtížněji vstupují do dalších tkání a orgánů, méně interagují s dalšími biomakromolekulami a rychleji se eliminují z organismu. Biotransformace se dělí na 2 fáze a každá z fází má charakteristické enzymy. V první fázi (konverzní) dochází k oxidaci, redukci, hydrolýze, hydrataci a izomeraci, ve druhé (konjugační) pak ke glukuronidaci, sulfonaci, methylaci, acetylaci a konjugaci s glutathionem a aminokyselinami čili vytváření vazby s endogenními sloučeninami. Většina xenobiotik a potažmo i jejich metabolitů podléhá různým kombinacím těchto přeměn (Skálová et al. 2018).

### 2.3.1 Reduktasy

Jedná se o enzymy katalyzující redukční děje. Jsou NAD(P)H dependentní. Redukci podléhají hlavně nitro/nitroso sloučeniny, aldehydy, ketony, chinony, oxidy dusíku a síry, sulfoxidy a disulfidy. Enzymy redukující karbonylovou skupinu xenobiotik se dělí do tří skupin a to aldo-ketoreduktasy, dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem. Karbonylové sloučeniny jsou v přírodě rozšířené a mohou představovat hrozbu pro organismy, díky schopnosti kovalentně se vázat na sekundární aminoskupiny a thiolové skupiny proteinů. Některé aldehydy mohou působit mutagenně pro svou schopnost interakce s DNA buňky. Redukce karbonylu vede buď ke snížení farmakologické aktivity léčiv, nebo aktivaci proléčiv. Redukované metabolity jsou hydrofilnější než původní léčiva a mohou být snadněji eliminovány. Enzymy se v hojném počtu nacházejí v játrech, plicích, mozku, srdci, ledvinách, varlatech, krvi a slezině. Redukčních enzymů je samozřejmě celá řada, níže jsou popsány ty, které byly studovány v této práci. Poznatky jsou uvedeny o lidských enzymech, jelikož u červů nejsou plně prozkoumány, a proto mohou být odlišné.

Aldo-ketoreduktasy se vyskytují ve většině živých organismů. Redukují aldehydy a ketony na primární a sekundární alkoholy. Katalyzují více redukční než oxidační děje,

ale reakce mohou být v zásadě obousměrné. Jsou schopné přeměňovat endogenní sloučeniny (sacharidy, steroidní látky, retinal, produkty peroxidace lipidů) i xenobiotika (dolasetron, daunorubicin, oracin atd.)

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem se nachází ve všech živých organismech. Účastní se přeměny hlavně fyziologických látek, ale metabolizují i některé xenobiotika (hlavně CBR1 a 3). Nacházejí se v cytosolu a na hladkém endoplazmatickém retikulu.

Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem tvoří alkoholdehydrogenasy, mitochondriální proteiny dýchacího řetězce, acetylkoenzym a reduktasy, leukotrien B4 dehydrogenasy a polyoldehydrogenasy a chinonreduktasy. Jejich substráty jsou fyziologické (steroidy, prostaglandin, monosacharidy), ale i exogenní (alifatické a aromatické aldehydy a ketony, alkoholy atd.) (Skálová et al. 2018, Boušová et al. 2015).

#### **AKR1A1 (aldehydreduktasa)**

Enzym z nadrodiny aldo-ketoreduktas je u savců exprimován prakticky ve všech tkáních, nejvíce však v ledvinných proximálních tubulech. Nachází se v cytosolu a vykazuje nízkou substrátovou selektivitu. Preferuje sice sloučeniny s negativním nábojem na karboxylové skupině, ale redukuje i různé aldehydy. Metabolizuje doxorubicin a daunorubicin a některé benzo[a]pyreny. Je zapojený do syntézy kyseliny askorbové (u hlodavců se předpokládá, že fyziologickou úlohou enzymu je redukce D-glukuronátu přes další přeměny na kyselinu askorbovou, lidé ovšem kyselinu askorbovou nesyntetizují) (Skálová et al. 2018, Barski et al. 2008).

#### **AKR1B10 (aldosareduktasa)**

Tento enzym je exprimován hlavně v tenkém a tlustém střevě, jaterní tkáni, brzlíku a nadledvinkách. V nádorové tkáni konečníku, plic a jater dochází ke zvýšené expresi reduktasy, která ovlivňuje proliferaci nádorových buněk a je zodpovědná za chemorezistenci. Jedná se o cytosolický enzym, který vykazuje vyšší substrátovou selektivitu k all-trans-retinalu a některým ketonům včetně léčiv jako daunorubicin a dolasetron (antiemetikum). Pomocí redukce deaktivují potenciální cytostatikum oracin a tabákový nitrosamin (Skálová et al. 2018, Barski et al. 2008).

### **AKR1C (hydroxysteroiddehydrogenasy)**

Tato skupina enzymů se nachází hlavně v játrech, prostatě a prsní tkáni. Můžeme je najít v cytosolu. Na rozdíl od rodiny 1A a 1B katalyzují tyto enzymy reakce jak s aldehydy, tak i s ketony. Významně se podílí na metabolismu androgenů a estrogenů, takže mají vliv na vznik a rozvoj onemocnění jako karcinom prsu a prostaty a benigní hyperplazie prostaty. Metabolizují tabákový nitrosamin na méně toxickou sloučeninu, dále naltrexon (antagonista opioidních receptorů), dolasetron a deaktivují doxorubicin (protinádorové léčivo) a oracin (Skálová et al. 2018).

### **CBR1 (Karbonylreduktasa 1)**

Je to dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem. Nachází se v cytosolu ve většině tkání, nejvíce především v játrech, placentě a CNS. Přeměňuje řadu endogenních i exogenních ketonů a chinonů. Reguluje metabolismus prostaglandinů, čímž ovlivňuje metastáze nádorových buněk a účastní se metabolismu steroidních látek. K exogenním látkám patří *o*-chinony, *p*-chinony (menadion), anthracykliny (doxorubicin, daunorubicin) a některá další léčiva (např. metyrapon, haloperidol, warfarin) (Miura 2008, Skálová et al. 2018).

### **11 $\beta$ -HSD1 (11 $\beta$ – hydroxysteroiddehydrogenasa typ1)**

Mikrosomální enzym, dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem, který je hojně zastoupený v jaterní tkáni, adipocytech, mozku a v plicích. Je schopný aktivovat nebo inaktivovat glukokortikoidní hormony (např. přeměna kortisonu na kortisol) a různé studie poukazují na jeho vliv na vznik metabolického enzymu. Z xenobiotik byla popsána účast na přeměně tabákového nitrosaminu, metyraponu, menadionu, prednisolonu a oracinu. U potkanů je přítomnost daná pohlavím, u samic se nevyskytuje (Skálová et al. 2018, Škarydová & Wsól 2012).

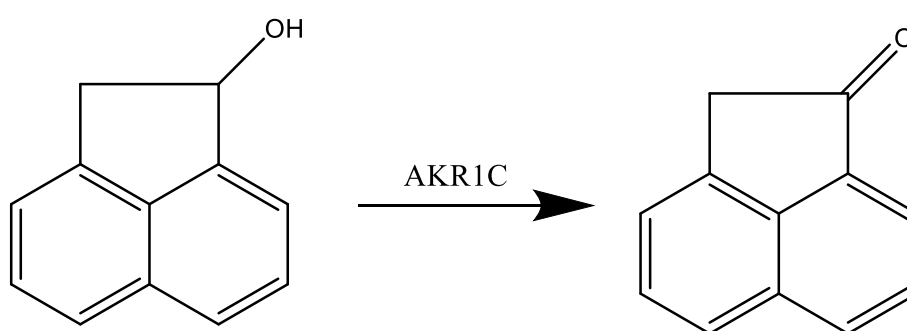
Enzymy helmintů se ale liší od těch savčích a nejsou zdaleka tak prozkoumané, proto je potřeba další výzkumy pro lepší zmapování. Odlišnosti se ovšem mohou nacházet i mezi helminty a výsledky v této práci jsou měřené pouze na vlasovce slezové.



## 2.4. Substráty karbonylreduktas

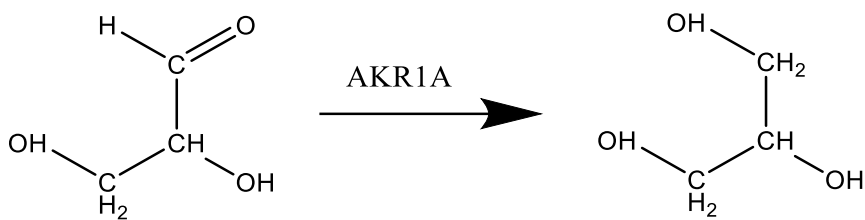
Ke zhodnocení aktivity redukčních enzymů u vlasovky slezové byly vybrány potenciální substráty na základě interakce s lidskými enzymy.

Acenaftenol – substrát pro lidskou AKR1C, je to bílá pevná látka špatně rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v DMSO, která je za přítomnosti kofaktoru  $\text{NADP}^+$  enzymaticky metabolizována na 1-acenaftenon (Obr. 1). Během reakce vzniká NADPH, který na rozdíl od  $\text{NADP}^+$  vykazuje ve spektru UV/VIS výrazné maximum při 340 nm (Zavřelová 2008).



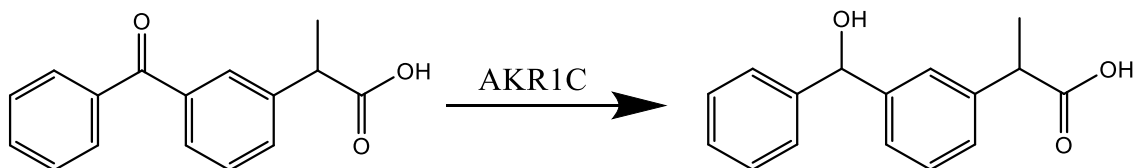
Obr. 1 Enzymatická přeměna acenaftenolu

Glyceraldehyd – substrát pro lidskou AKR1A, AKR1B10 a CBR1, pevná látka špatně rozpustná ve vodě, dobře v DMSO. V cytosolu je pomocí enzymů redukován na glycerol (Obr. 2). Během reakce dochází k přeměně koenzymu NADPH na  $\text{NADP}^+$  a tím k poklesu absorbance měřitelné při vlnové délce 340 nm (Cvilink et al. 2009, Urbánková 2007).



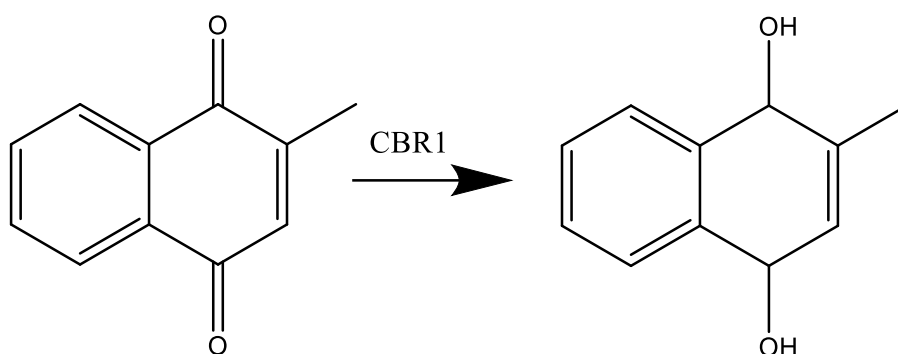
Obr. 2 Redukce glyceraldehdu na glycerol

Ketoprofen – pevná látka, ve vodě nerozpustná, rozpustná v DMSO. Terapeuticky se využívá jako nesteroidní antiflogistikum při zánětlivých a revmatických onemocněních. Redukuje se na dihydroketoprofen pomocí cytosolických enzymů skupiny AKR1C a mikrosomálního 11 $\beta$ -HSD1 (Obr. 3) za přeměny koenzymu NADPH na NADP<sup>+</sup> a poklesu absorbance (Urbánková 2007).



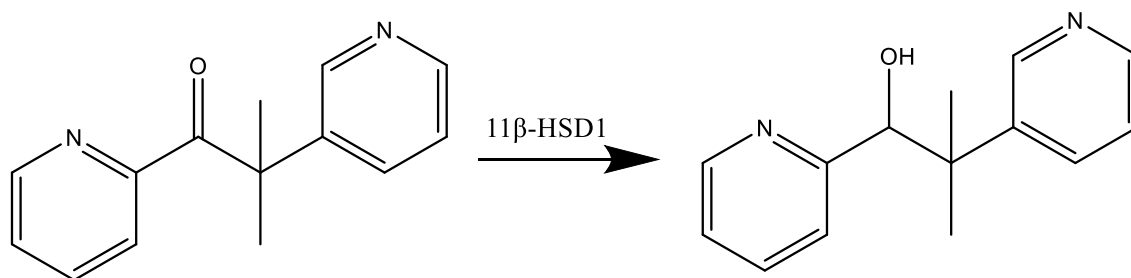
Obr.3 Enzymatická redukce ketoprofenu na dihydroketoprofen

Menadion – je substrátem CBR1 a 11 $\beta$ -HSD1. Bývá nazývaný vitamín K<sub>3</sub> a používá se jako doplněk krmiv pro zvířata. Pomáhá léčit krvácivé stavy. Některé výzkumy prokázaly, že léčba menadionem může vést k cytotoxicitě, proto je i předmětem výzkumu protinádorových léčiv (Chiou et al. 1999, Urbánková 2007). Jedná se o žlutou pevnou látku. Během redukce vzniká menadiol (Obr. 4) a díky vznikajícímu NADP<sup>+</sup> dochází k poklesu absorbance.



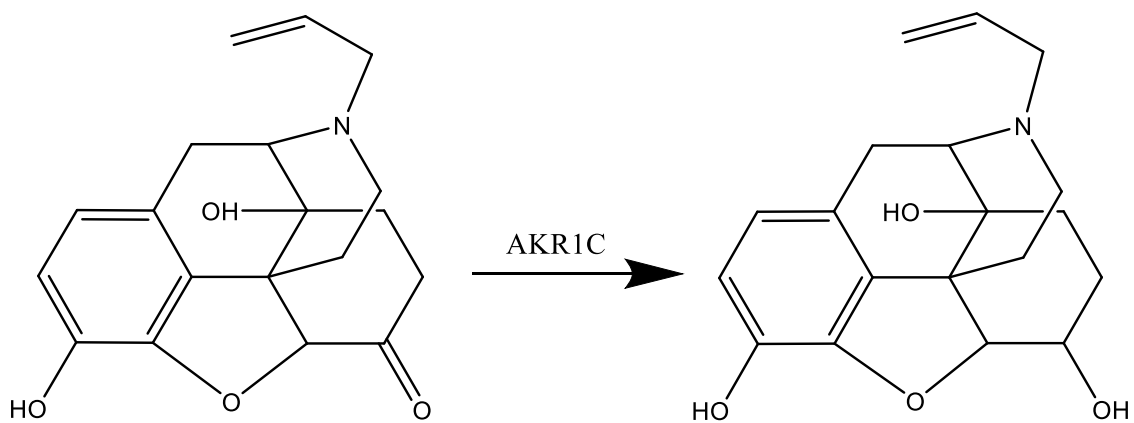
Obr. 4 Redukce menadionu na menadiol

Metyrapon – substrát pro lidskou AKR1C, AKR1A a CBR1 v cytosolu a  $11\beta$ -HSD1 v mikrosomech, pevná látka rozpustná ve vodě. Terapeuticky se využívá jako doplněk k léčbě nadprodukce glukokortikoidů a mineralokortikoidů (Cushingův syndrom, hyperaldosteronismus) a k diagnostice funkce předního laloku hypofýzy (Cvilink et al. 2009, Urbánková 2007). Během redukce metyraponu vzniká metyrapol a  $\text{NADP}^+$  (Obr. 5).



Obr. 5 Redukce metyraponu pomocí enzymu  $11\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa typ1 na metyrapol

Naloxon – metabolizován skupinou enzymů AKR1C. Pevná látka rozpustná ve vodě se terapeuticky využívá jako antidotum při předávkování opioidy a pro prevenci opiové závislosti. Enzymaticky a za účasti  $\text{NADPH}$  se redukuje na naloxol a vznikající  $\text{NADP}^+$  se projevuje poklesem absorbance (Obr. 6) (Urbánková 2007).



Obr. 6 Přeměna naloxonu na naloxol

## 2.5 Inhibice enzymů

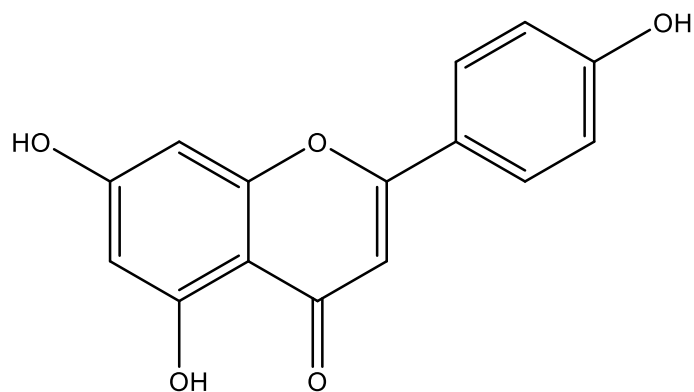
Enzymatická aktivita závisí na faktorech jako rychlost syntézy enzymu, rychlosti rozpadu, koncentrace substrátů, podmínky prostředí (pH, teplota,...), přítomnosti a koncentrace kofaktorů a modulátorů (inhibitorů a aktivátorů). Časté podávání farmakologicky aktivních látek může způsobovat indukci nebo inhibici daných biotransformačních enzymů. Inhibitor se váže na enzym a tím snižuje jeho aktivitu. Inhibice může být reverzibilní nebo ireverzibilní podle síly vazby mezi inhibitorem a enzymem.

Látky (organické, anorganické, ionty) mohou inhibovat reakci specificky či nespecificky. Specifické inhibitory se vážou pouze na určitou skupinu enzymů nebo dokonce jen na jediný enzym, k nespecifickým inhibitorům patří například těžké kovy (Skálová et al. 2018).

Specifické inhibitory účinkují pouze na určitou skupinu enzymů nebo dokonce jen na jediný enzym a umožňují snadnou identifikaci těchto enzymů. K identifikaci může být použit pokles absorbance v měřeném biologickém materiálu při změně reakčních podmínek. Po přidání daného inhibitoru do reakční směsi nedojde k přeměně substrátu, ke které za normálních podmínek došlo.

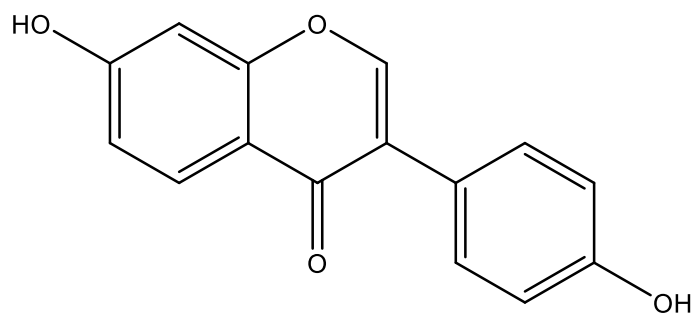
Jako potenciální specifické inhibitory enzymů redukujících karbonylovou skupinu byly v této práci zvoleny následující látky:

Apigenin – široce rozšířený flavonoid různých druhů ovoce a bylin. Má antioxidační, protizánětlivé účinky a jejich možné využití je v léčbě rakoviny a mnohých dalších onemocnění. Tato krystalická látka žluté barvy inhibuje enzym AKR1B10, CBR1 a AKR1C (Salehi et al. 2019, Malátková et al. 2013) a jeho struktura je představená níže (Obr. 7).



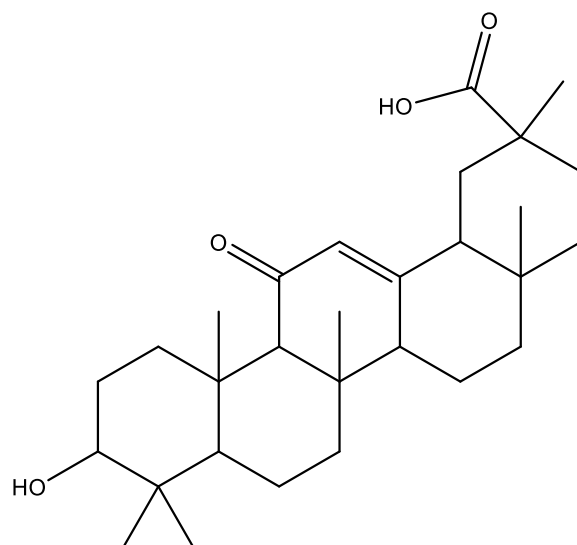
Obr. 7 Struktura apigeninu

Daidzein – řadí se mezi fytoestrogeny díky své strukturní (Obr. 8) podobě hormonu estrogeneru. Může se použít k prevenci i léčbě chorob jako je rakovina, osteoporóza, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění a diabetes. Je přítomný v luštěninách. Je to bílá až nažloutlá krystalická látka. Inhibuje reductasu AKR1B10, CBR1 (Sun et al. 2016).



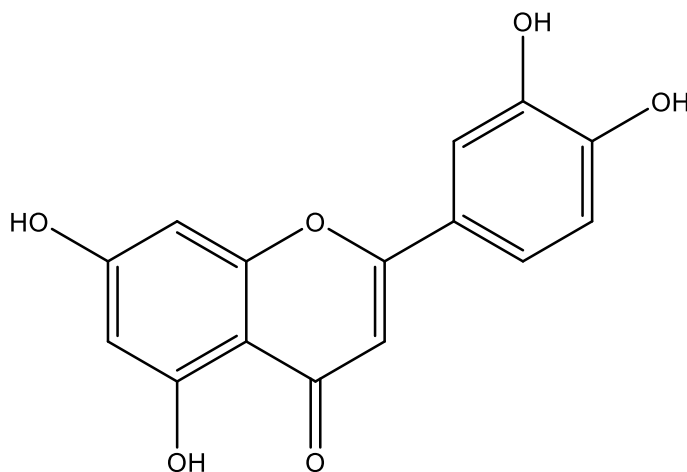
Obr. 8 Struktura daidzeinu

Glycyrrhetinová kyselina – je bílá krystalická látka izolována z lékořice. Struktura je zobrazena níže (Obr. 9). Inhibuje reductasu 11 $\beta$ -HSD1, AKR1D1 a AKR1B10. Působí antiflogisticky, inhibuje růst nádorových buněk. Může zvyšovat hladinu kortizolu a tím zadržovat v organismu vodu a sodík (Holečková 2012, Malátková et al. 2013).



Obr. 9 Struktura glycyrrhetinové kyseliny

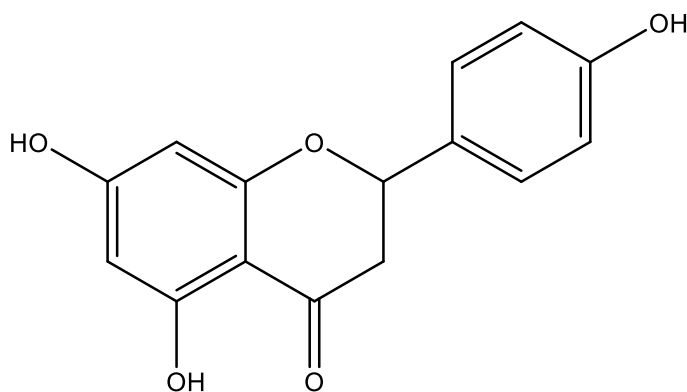
Luteolin – je žluté přírodní barvivo obsažené v široké řadě rostlin. Jde o krystalickou látku, flavonoid, s protizánětlivou, protimikrobní a protinádorovou aktivitou. Působí jako inhibitor enzymu AKR1B10, AKR1C a CBR1 (Seelinger et al. 2008).



Obr. 10 Struktura luteolinu

Naringenin – flavonoid nacházející se hlavně v grapefruitech, ale i v dalším ovoci a bylinkách. Využívá se v kosmetickém a parfémovém průmyslu, ale pro svůj

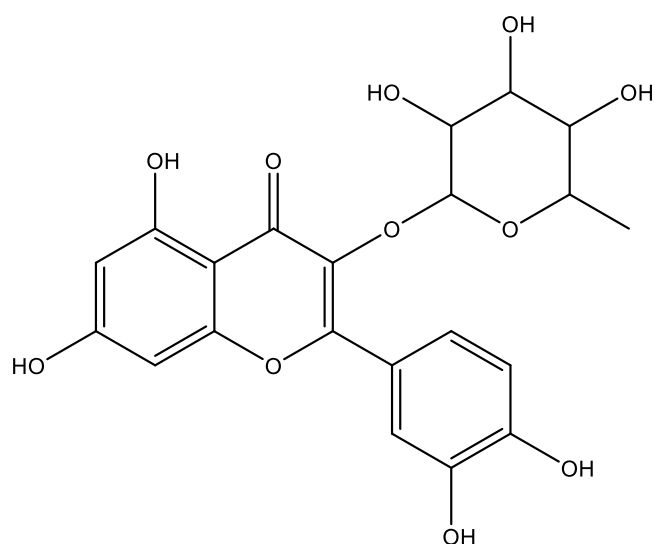
hypolipidemický, antihypertenzní, antiestrogenní, protinádorový a protizánětlivý efekt i v různých terapeutických odvětvích. Krystalická bílá až světle béžová látka, která je zobrazena strukturním vzorcem na obrázku pod textem (Obr. 11), inhibuje reduktasu AKR1C, AKR1B10, CBR1 a 11 $\beta$ -HSD1 (Patel et al. 2018, Zemanová et al. 2015, Schweizer et al. 2003).



Obr. 11 Struktura naringenu

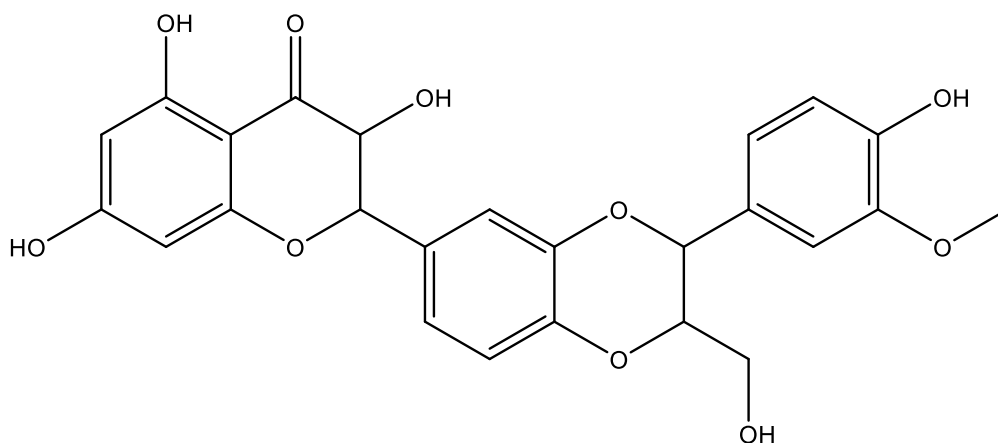
Kvercitrin – žlutá krystalická látka rozpustná v DMSO. Jeho struktura je představena níže (Obr. 12). Patří mezi flavonoidy, jako rostlinné barvivo se nachází v různých potravinách (červené víno, cibule, čaj, jablka) a využívá se k léčbě kardiovaskulárních chorob. Je inhibitorem CBR1, AKR1B10 a AKR1C (Pechová 2017, Malátková et al. 2013, Škarydová 2009).





Obr. 12 Struktura kvercitrinu

Silibinin (Obr. 13) je hlavní složkou silymarinu. Je to bílá krystalická látka, která inhibuje enzymy AKR1C a AKR1B10. Získává se ze semen ostropestřce. Používá se k léčbě jaterních onemocnění a vykazuje protinádorovou aktivitu. Působí antioxidačně a protizánětlivě, čehož se využívá k léčbě neurologických onemocnění, mezi jinými i k léčbě Alzheimerovy choroby, i když mechanismus není ještě plně pochopený (Wei et al. 2022, Zemanová et al. 2015).



Obr. 13 Struktura silibininu

### 3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat enzymy redukující karbonylové sloučeniny u citlivého (ISE) kmene vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*).

Pro získání výsledků bylo nutné:

- Připravit subcelulární frakce (mikrosomy a cytosol) z dospělců vlasovky slezové ISE kmene
- Zjistit koncentraci proteinu ve vzorcích mikrosomů a cytosolu
- Stanovit aktivitu reductas vůči různým substrátům v cytosolu a mikrosomech
- Pomocí specifických inhibitorů reductas určit (nebo odhadnout), zda se jedná o enzymy z nadrodiny aldo-ketoreductas nebo dehydrogenas/reductas s krátkým řetězcem

## 4. Biologický materiál, chemikálie a přístrojové vybavení

### 4.1 Biologický materiál

K výzkumu byly využité hlístice *Haemonchus contortus*– kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3). Jedná se o kmen citlivý na anthelmintika.

Materiál byl získán z ovcí (*Ovis aries*).

### 4.2 Chemikálie

BCA kit: Roztok A: NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BCA (bicinchoninic acid) v 0,1 M NaOH

Roztok B: 4 % CuSO<sub>4</sub>.6 H<sub>2</sub>O, Thermo Scientific

Roztok BSA (hovězí sérový albumin), Sigma-Aldrich

Menadion, Sigma

Acenaftenol, Sigma-Aldrich

Metyrapon, Fluka Chemie

DL – Glycerinaldehyd, BDH Chemicals Ltd

Naloxon, Sigma

Ketoprofen, Sigma

NADPH, Serva

NADP<sup>+</sup>, Serva

Apigenin, TRC Canada

18β-glycyrrhetinová kyselina, Sigma

Kvercitrin, Sigma-Aldrich

Luteolin, TRC Canada

Daidzein, TRC Canada

Naringenin, Sigma-Aldrich

Silibinin, Sigma

Další obvyklé laboratorní chemikálie

## **4.3 Přístroje**

Homogenizátor Potter-Elvehjem

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Ultracentrifuga Beckman Coulter Avanti J-30I

Spektrofotometr Tecan Infinite M200 PRO

pH metr Eutech pH 700

Ultrazvuková lázeň Kraintek

Ultrazvukový homogenizátor Bandelin

Analytické váhy Sartorius CP225D

## **4.4 Pracovní pomůcky**

Centrifugační kyvety Heraeus a Beckman, homogenizační zkumavka s pístem, nádoba s ledem, buničina, laboratorní sklo, injekční stříkačka s dlouhou jehlou, míchačka, míchadla, mikrozukavky Eppendorf, pipety, pipetovací špičky, 96 jamkové mikrotitrační GAMA destičky

## 5. Metodika

### 5.1 Příprava pufrů

0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 8,9

TRIS se rozpustil ve vodě (1,21 g/100 ml), zkontrolovalo se pH a přilévala se 0,1 M HCl za kontroly pH na pH-metru při laboratorní teplotě. Pufr byl poté uchováván v lednici.

0,1 M Draselno – fosfátový pufr, pH 6

V redestilované se rozpustil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tak, aby vznikly 0,1 M roztoky. Ke  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  se přidával  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  za stálé kontroly pH na pH-metru při laboratorní teplotě. Pufr se uchovával v lednici.

0,1 M Sodno – fosfátový pufr, pH 7,4

Rozpustilo se 17,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  v 500 ml redestilované vody a 3,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 250 ml vody a roztoky se smísily v odpovídajícím poměru na požadované pH. Následně byl pufr uchováván v lednici.

### 5.2 Příprava subcelulárních frakcí

Zmrazené vlasovky slezové kmene ISE se rozvážily do malých mističek po 5 g. Hlístice se rozstříhaly na menší kousky, z jedné mističky se vložily do homogenizační zkumavky a přililo se 15 ml 0,1 M sodno-fosfátového pufru pH 7,4. Obsah se zhomogenizoval pomocí pístu (homogenizátor Potter-Elvehjem) a přelil do 50 ml centrifugační kyvety. Píst a homogenizační zkumavka se propláchly 15 ml pufru a ten se rovněž přelil do centrifugační kyvety. Tento postup se opakoval s obsahem každé mističky.

Připravené kyvety se vložily do centrifugy Heraeus a homogenát se stočil se na 5000 g, 20 minut při teplotě 4 °C. Vzniklá peleta se skládala z potrháných buněčných membrán, cév, vaziva a jader.

Supernatant z 1. točení se přelil do čistých kyvet a stočil se ve stejném rotoru a centrifuze na 20 000 g, 60 minut a teplotě 4 °C. Peleta obsahovala mitochondrie.

3 točení se provádělo v ultracentrifuze Beckman. Supernatant se opatrně přelil do kyvet určených pro tuto centrifugu tak, aby tam nevětkly žádné kaly. Kyvety se plnily maximálně do tří čtvrtin a dvě proti sobě se vždy vyvážíly pufrem. Zavřené víčkem se vložily do rotoru a centrifuga se spustila na 105 000 g po dobu 65 minut, při 4 °C.

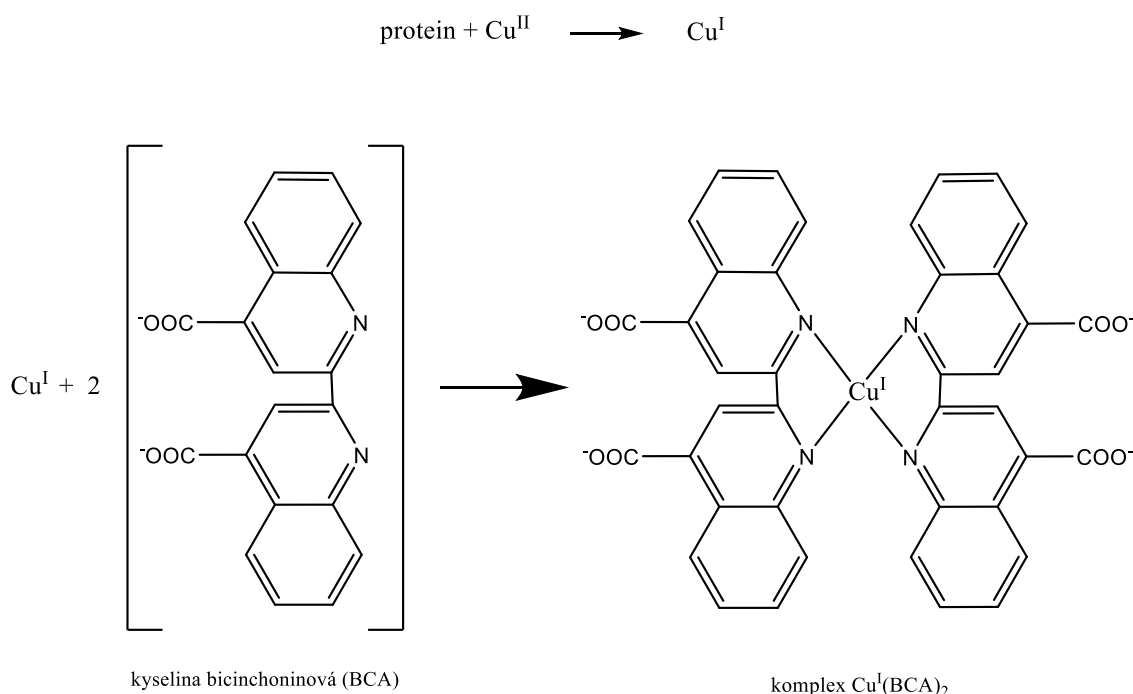
Po dokončení 3. točení se odebral supernatant neboli cytosol a za stálého míchání se rozpipetoval do mikrozkušavek Eppendorf.

Peleta se resuspendovala v pufru s 20 % glycerolem (v/v). Objem pufru odpovídal hmotnosti hlístic. Zhomogenizoval se nejdříve skleněnou tyčinkou, poté v ultrazvukové lázni a za stálého míchání se také rozpipetoval do mikrozkušavek.

Takto připravené vzorky se zmrazily na -80 °C a biologický materiál byl připravený pro další práci.

## 5.3 Stanovení koncentrace bílkovin

Stanovení koncentrace bílkovin v subcelulárních frakcích (cytosol a mikrosomy) je nezbytné pro výpočet specifických aktivit jednotlivých enzymů. Koncentrace proteinu se stanovila pomocí BCA (bicinchoninová kyselina). Díky proteinům se měďnaté ionty z roztoku B redukují na jednomocné a následně vytvářejí v alkalickém prostředí kolem pH 10 stabilní komplex s BCA (obr. 14). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny, které se stanovuje pomocí měření absorbance modrofialového komplexu při vlnové délce 562 nm.



Obr. 14 Reakce probíhající při stanovení proteinů metodou BCA

Pro výpočet množství proteinu ve vzorku je nutná kalibrační přímka zhotovena z 0,1% roztoku BSA (hovězí sérový albumin) a destilované vody podle níže uvedeného schématu.

Tab 1. Koncentrace a objemy použitých roztoků k zhotovení kalibrační přímky

Sloupec destičky	Koncentrace	0,1% roztok BSA	Destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	200 µg/ml	20 µl	80 µl
3	400 µg/ml	40 µl	60 µl
4	600 µg/ml	60 µl	40 µl
5	800 µg/ml	80 µl	20 µl
6	1000 µg/ml	100 µl	0 µl

Vzorky cytosolu a mikrosomů byly naředěné 10x a 20x destilovanou vodou, aby se naměřená absorbance vešla do rozmezí kalibrační přímky.

Do destičky se pipetovalo vždy 10 µl připravené bílkoviny (na kalibrační přímku) nebo vzorku (naředěných subcelulárních frakcí) a 200 µl pracovního roztoku C (smíchaný roztok A a B v poměru 50:1). Vzorky byly následně inkubovány v Thermomixeru při 37 °C po dobu 30 minut a poté byla pomocí přístroje Tecan změřená absorbance komplexu.

Na základě naměřené absorbance a pomocí kalibrační křivky byla vypočtena průměrná koncentrace proteinu ve vzorcích. Koncentrace byla dále využita pro výpočet specifické aktivity enzymů.



## 5.4 Stanovení aktivity reduktas karbonylové skupiny – spektrofotometrické stanovení v destičce

### 5.4.1 Stanovení aktivity reduktas pomocí acenaftenolu

Měření aktivity redukčních enzymů je založeno na vzrůstu absorbance během přeměny NADP<sup>+</sup> na NADPH. Stanovení se provádí při 340 nm za teploty 37 °C. Na základě výsledků je možné kvantitativně stanovit enzymatickou aktivitu.

Nejdříve se připravily zásobní roztoky acenaftenolu (0,1 M) a NADP<sup>+</sup> (20mM). Acenaftenol se rozpustil v DMSO v poměru 17,02 mg/ml DMSO a NADP<sup>+</sup> se rozpustil v redestilované vodě v poměru 23,6 mg/1,5 ml redestilované vody.

Ze zásobních roztoků a 0,1 M TRIS/HCl pufru, pH 8,9 se připravil mastermix, který na jednu destičku obsahoval 21,36 ml pufru, 240 μl acenaftenolu a 1200 μl NADP<sup>+</sup>.

Do každé jamky 96 jamkové GAMA destičky se napipetovalo 10 μl cytosolu/mikrosomů nebo sodno-fosfátového pufru pH 7,4 jako slepý vzorek a přidalo se 190 μl mastermixu multikanálovou pipetou. Vzorek v jedné jamce obsahoval 178 μl pufru, 2 μl acenaftenolu, 10 μl NADP<sup>+</sup> a 10 μl cytosolu. Slepý vzorek obsahoval 188 μl pufru, 2 μl acenaftenolu a 10 μl NADP<sup>+</sup>. Destička se vložila do spektrofotometru a po dobu 5 minut se sledoval vzrůst absorbance.

Každý vzorek se měřil v 6 paralelních měřeních a 3 nezávislých stanoveních tak, že v řádku A byl slepý vzorek a v řadě B-H různé vzorky.

Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána průměrná změna absorbance za minutu. Dále byla vypočítána aktivita enzymů a následně byla hodnota vztažena na mg proteinu pro výpočet specifické aktivity.

Vzorec pro výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * V_i * 1000}{\epsilon * l * V_S} \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

$\epsilon_{\text{NADPH}}$	$6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$l$	délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm
$V_i$	objem reakční směsi, tj. 0,2 ml
$V_s$	objem biologické frakce, tj. 0,01 ml

## 5.4.2 Stanovení aktivity reduktas pomocí různých substrátů

Metoda je založena na inkubaci subcelulární frakce se substrátem. Redukce substrátu je doprovázená oxidací NADPH, a to se spektrofotometricky projevuje jako pokles absorbance. Stanovení se provádí při 340 nm za teploty 37 °C.

Příprava zásobních roztoků různých substrátů:

Glyceraldehyd – rozpustit v DMSO, aby vznikl 1 M roztok

Ketoprofen – rozpustit v DMSO, aby vznikl 0,1 M roztok

Menadion – v 1 ml absolutního (bezvodého) ethanolu rozpustit 8,61 mg menadionu

Metyrapon – rozpustit ve vodě, aby vznikl 0,1 M roztok

Naloxon – rozpustit ve vodě, aby vznikl 0,1 M roztok

NADPH – rozpustit ve vodě tak, aby vznikl 4 mM roztok pro glyceraldehyd, 2 mM pro ketoprofen, metyrapon a naloxon a 5 mM pro menadion

Smícháním 240  $\mu$ l zásobního roztoku substrátu, 1200  $\mu$ l NADPH a 21,36 ml 0,1 M draselno – fosfátového pufru, pH 6 vznikne mastermix.

Reakční směsi byly připraveny v čase potřeby.

Do každé jamky 96 jamkové GAMA destičky se opět napipetovalo 10  $\mu$ l cytosolu/mikrosomů nebo sodno-fosfátového pufru pH 7,4 jako slepý vzorek a přidalo se 190  $\mu$ l mastermixu multikanálovou pipetou. Vzorek v jedné jamce obsahoval 178  $\mu$ l pufru, 2  $\mu$ l substrátu, 10  $\mu$ l NADPH a 10  $\mu$ l cytosolu. Slepý vzorek obsahoval 188  $\mu$ l pufru, 2  $\mu$ l substrátu a 10  $\mu$ l NADPH. Destička se vložila do spektrofotometru a po dobu 5 minut se sledoval pokles absorbance.

Každý vzorek se měřil v 6 paralelních měřeních a 3 nezávislých stanoveních tak, že v řádku A byl slepý vzorek a v řadě B-H různé vzorky.

Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána průměrná změna absorbance za minutu. Dále byla vypočítána aktivita enzymů a následně byla hodnota vztažená na mg proteinu pro výpočet specifické aktivity.

Vzorec pro výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * V_i * 1000}{\epsilon * l * V_s} \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

$\epsilon_{\text{NADPH}}$	6,22 mM <sup>-1</sup> *cm <sup>-1</sup>
$l$	délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm
$V_i$	objem reakční směsi, tj. 0,2 ml
$V_s$	objem biologické frakce, tj. 0,01 ml

## 5.5 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas

Měření bylo prováděno spektrofotometricky, stejně jako v případě stanovení aktivity reduktas. Pomocí poklesu absorbance byla stanovena míra inhibice aktivity redukčních enzymů různými přírodními látkami. Na základě stanovené aktivity v předchozích měřeních byly zvolené nejvhodnější substráty pro další měření.

Na začátku se opět připravily zásobní roztoky. Substráty a koenzymy se rozpustily ve vhodném rozpouštědle na požadovanou koncentraci stejně jako v předchozích měřeních a z nich a pufru se připravil mastermix. Dále se připravily roztoky inhibitorů v DMSO. Zásobní roztoky byly v koncentraci 10 mM, 1 mM a 0,1 mM.

Do jamek 96 jamkové GAMA destičky se napipetovaly 2  $\mu$ l DMSO nebo inhibitoru a přidalo se 188  $\mu$ l mastermixu. Nakonec se přidalo 10  $\mu$ l cytosolu nebo mikrosomů. Jamky se slepým vzorkem tedy obsahovaly 2  $\mu$ l DMSO, 186  $\mu$ l pufru, 2  $\mu$ l substrátu a 10  $\mu$ l koenzymu. Vzorky bez inhibitoru obsahovaly 2  $\mu$ l DMSO, 176  $\mu$ l pufru, 2  $\mu$ l substrátu, 10  $\mu$ l koenzymu a 10  $\mu$ l biologické frakce. Inhibované vzorky obsahovaly 2  $\mu$ l inhibitoru v dané koncentraci, 176  $\mu$ l pufru, 2  $\mu$ l substrátu, 10  $\mu$ l koenzymu a 10  $\mu$ l biologické frakce.

Každý vzorek cytosolu se měřil v 6 paralelních měřeních a 3 nezávislých stanoveních tak, že v řádku A byl slepý vzorek, v řádku B kontrolní vzorek bez inhibitoru a v řádkách C-E s inhibitory o různé koncentraci. Pokles absorbance byl sledován po dobu 5 minut při 340 nm. Vzorky mikrosomů se měřily pouze v 3 paralelních měřeních, opět v 3 nezávislých stanoveních z důvodu nedostatku biologického materiálu.

Na základě výsledků měření byla vypočítána aktivita enzymů u všech vzorků a na základě toho byl zhodnocený inhibiční vliv přírodních látek. Aktivita byla dále vztažena na mg proteinu pro výpočet specifické aktivity.

Vzorec pro výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs} \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

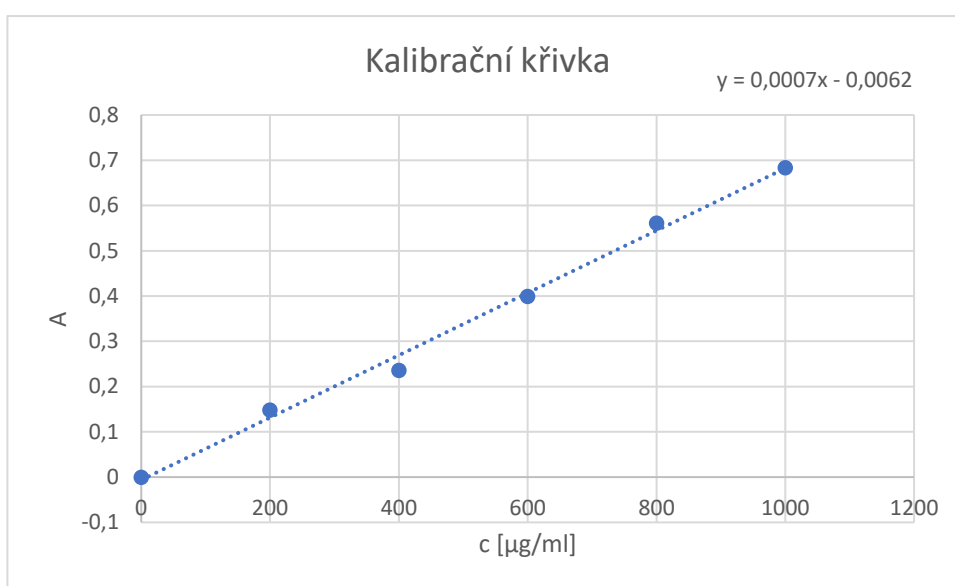
$$\epsilon_{\text{NADPH}} \quad 6,22 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

$l$	délka měřené vrstvy (výška jamky), tj. 0,75 cm
$V_i$	objem reakční směsi, tj. 0,2 ml
$V_s$	objem biologické frakce, tj. 0,01 ml

## 6. Výsledky

### 6.1 Stanovení koncentrace bílkoviny v subcelulárních frakcích

Koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích se stanovovala metodou BCA (kap. 5.3). Kalibrační přímka (Obr. 15) byla zhotovena na základě naměřené absorbance u roztoků BSA o známe koncentraci. Měření probíhalo ve 4 paralelkách.



Obr. 15 Kalibrační přímka – graf závislosti absorbance na koncentraci bílkoviny

Osa x – koncentrace bílkoviny, osa y – naměřená absorbance

Z rovnice přímky byla vypočtena koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích. Výsledná koncentrace je průměr jednotlivých vzorků o různém ředění. Koncentrace byla násobena daným ředěním.

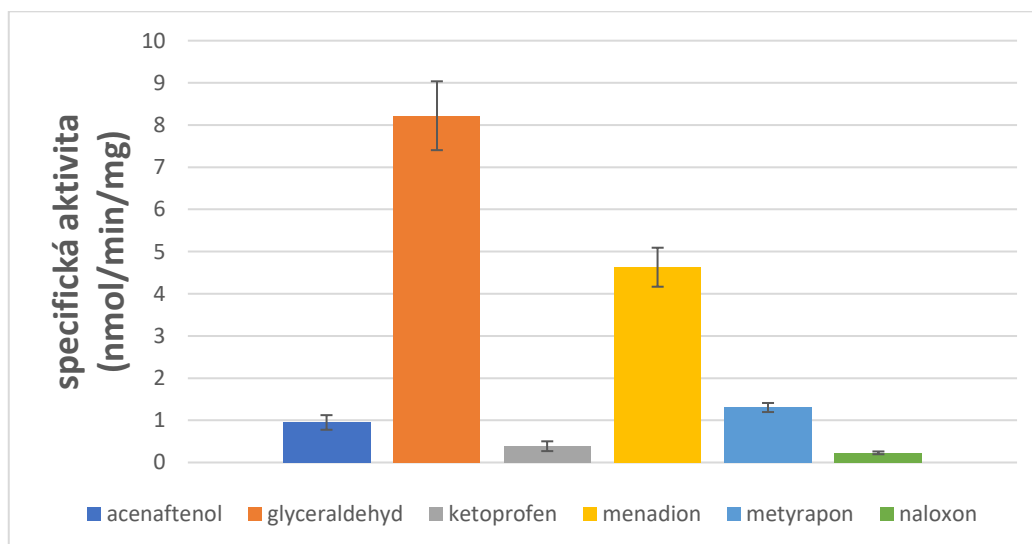
V cytosolu byla stanovena koncentrace proteinu 7,68 mg/ml a v mikrosomální frakci 8,79 mg/ml. Z těchto hodnot byla dále vypočtená specifická aktivita enzymů redukujících karbonylovou skupinu v subcelulárních frakcích.

## 6.2 Stanovení aktivity reductas v cytosolu

Stanovení probíhalo spektrofotometrickou metodou měřením absorbance, která byla dále přepočítaná na specifickou aktivitu (kap.5.4). Výsledky jsou zobrazeny níže v tabulce (Tab. 2) a rovněž graficky (Obr. 16).

Tab. 2 Specifická aktivita enzymů zjištěná v cytosolické frakci u různých substrátů

Substráty	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Acenaftenol	0,95 ± 0,17
Glyceraldehyd	8,22 ± 0,82
Ketoprofen	0,39 ± 0,12
Menadion	4,63 ± 0,46
Metyrapon	1,30 ± 0,11
Naloxon	0,23 ± 0,03



Obr. 16 Grafické zobrazení specifické aktivity redukčních enzymů v cytosolické frakci vlasovky slezové vůči různým substrátům. Jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření.



Z naměřených hodnot specifické aktivity můžeme vidět, že nejvyšší aktivitu mají reductasy vlasovky slezové vůči glycerinaldehydu, nižší vůči menadionu, dále metyraponu, acenaftenolu, ketoprofenu a nejnižší aktivitu mají vůči naloxonu.

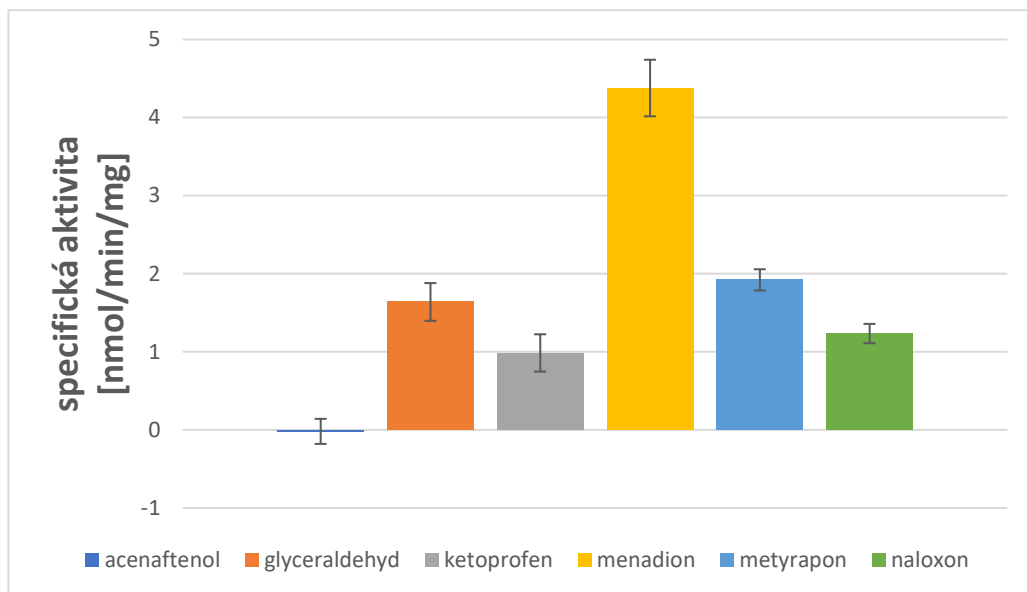
Na základě výsledků byly pro další měření efektů přírodních látek vybrány 2 substráty, a to glycerinaldehyd a menadion.

### 6.3 Stanovení aktivity reductas v mikrosomální frakci

Aktivita redukčních enzymů byla naměřena i v mikrosomální frakci vlasovky slezové a z ní se dále vypočítala specifická aktivita (kap. 5.4). Výsledky jsou zobrazeny v tabulce (Tab.3) i graficky (Obr. 17).

Tab. 3 Specifická aktivita enzymů zjištěná v mikrosomální frakci u různých substrátů

Substráty	Specifická aktivita [nmol/min/mg]
Acenaftenol	0
Glycerinaldehyd	1,64 ± 0,24
Ketoprofen	0,99 ± 0,24
Menadion	4,38 ± 0,36
Metyrapon	1,92 ± 0,14
Naloxon	1,23 ± 0,12



Obr. 17 Grafické zobrazení specifické aktivity redukčních enzymů v mikrosomální frakci vlasovky slizové vůči různým substrátům. Jsou uvedeny průměrné hodnoty ze tří nezávislých měření.

Z naměřených hodnot specifické aktivity můžeme vidět, že nejvyšší aktivitu mají reduktasy vlasovky slizové vůči menadionu, nižší vůči metyraponu, dále glyceraldehydu, naloxonu, ketoprofenu a vůči acenaftenolu nebyla naměřená aktivita žádná.

Pro další měření vlivu přírodních látek v této subcelulární frakci byly vybrány taktéž 2 substráty – menadion a metyrapon.

## 6.4 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas v cytosolu

Míra inhibice přírodními látkami se měřila pomocí poklesu absorbance (kap.5.5). Výsledky shrnující vliv inhibitorů v různých koncentracích jsou znázorněny v následujících tabulkách a grafech.

### 6.4.1 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči glyceraldehydu

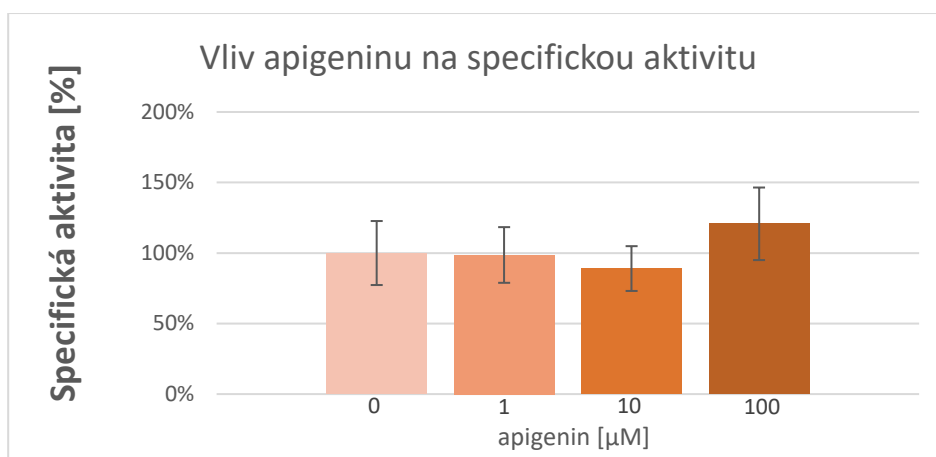
Tab. 4 Inhibice specifické aktivity redukčních enzymů vůči glyceraldehydu v cytosolické frakci různými přírodními látkami

Specifická aktivita [nmol/min/mg]				
Koncentrace inhibitorů [ $\mu$ M]	0	1	10	100
Apigenin	7,96 $\pm$ 1,81	7,85 $\pm$ 1,57	7,08 $\pm$ 1,26	9,60 $\pm$ 2,05
Daidzein	7,43 $\pm$ 1,06	7,62 $\pm$ 0,07	7,43 $\pm$ 0,33	7,69 $\pm$ 0,41
Glycyrrhetinová kys.	8,99 $\pm$ 0,25	9,15 $\pm$ 0,14	9,07 $\pm$ 0,34	6,64 $\pm$ 0,54 **
Luteolin	9,15 $\pm$ 0,69	7,41 $\pm$ 0,10	6,85 $\pm$ 0,53 *	2,71 $\pm$ 0,94 ***
Naringenin	7,99 $\pm$ 0,10	8,12 $\pm$ 0,58	7,78 $\pm$ 0,08	5,20 $\pm$ 0,75 **
Kvercitrin	7,51 $\pm$ 1,02	8,78 $\pm$ 0,65	8,60 $\pm$ 1,39	10,26 $\pm$ 0,85
Silibinin	8,70 $\pm$ 0,40	8,51 $\pm$ 0,34	8,51 $\pm$ 0,30	5,99 $\pm$ 0,40 **

\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ ), \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ ), \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

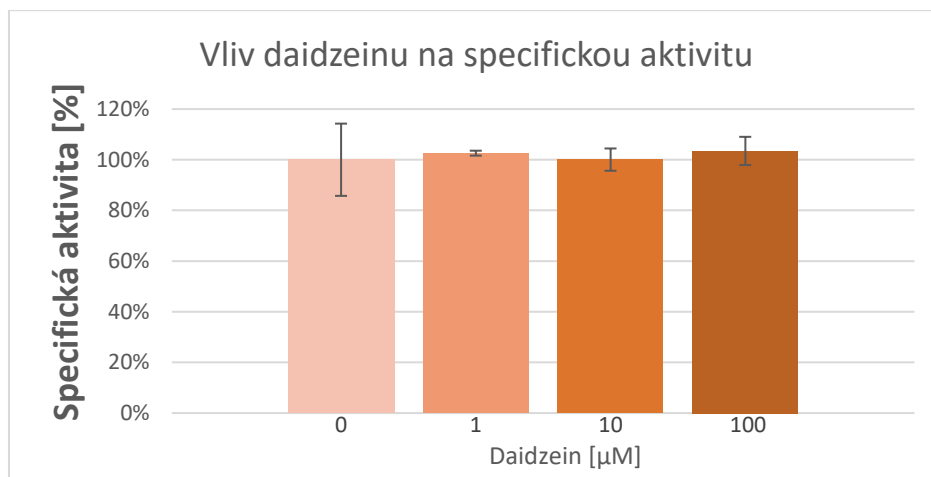
Z tabulky (Tab. 4) lze vidět, že k inhibici aktivity redukčních enzymů došlo u glycyrrhetinové kyseliny, luteolinu, naringeninu a silibininu. Nejvyšší inhibiční efekt lze pozorovat u luteolinu, který inhiboval aktivitu reduktas vůči glycerinaldehydu již při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . U zbylých inhibitorů došlo k inhibici v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .

U apigeninu, daidzeinu a kvercitrinu nedošlo k významné inhibici vůbec.



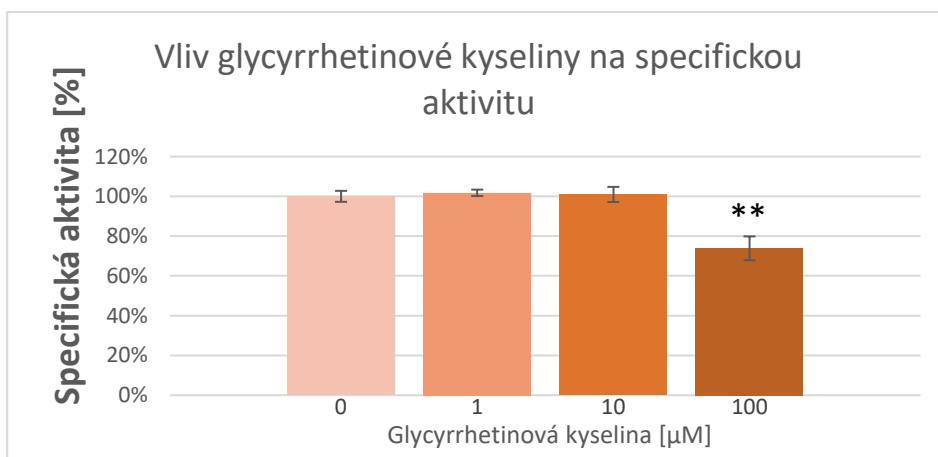
Obr. 18 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí apigeninu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

Z grafu (obr. 18) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných apigeninem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



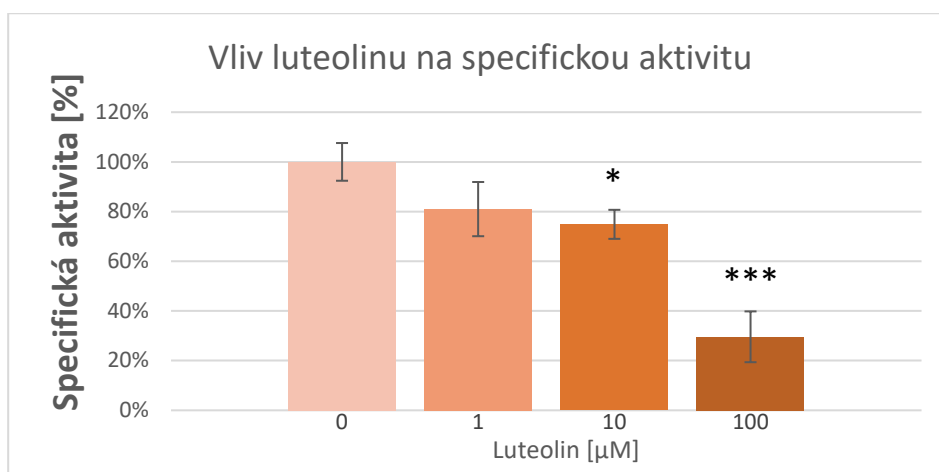
Obr. 19 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí daidzeinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 19) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných daidzeinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



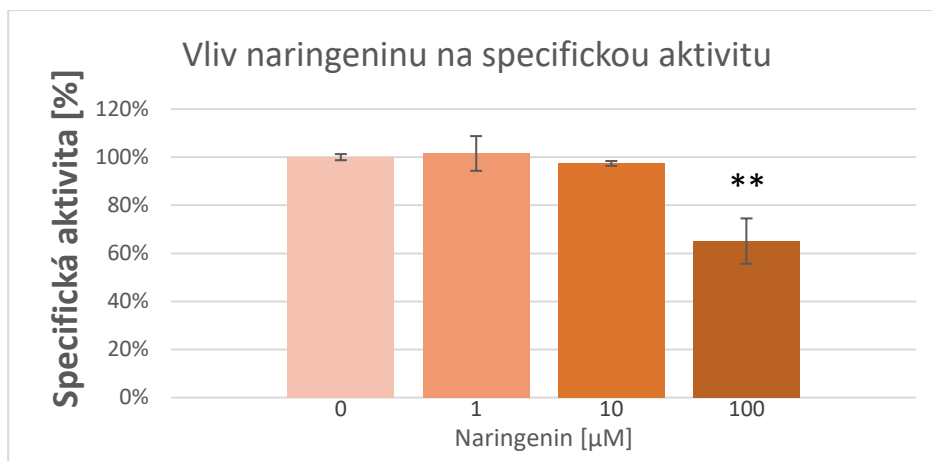
Obr. 20 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí glycyrrhizinové kyseliny v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 20) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných glycyrrhetinovou kyselinou v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



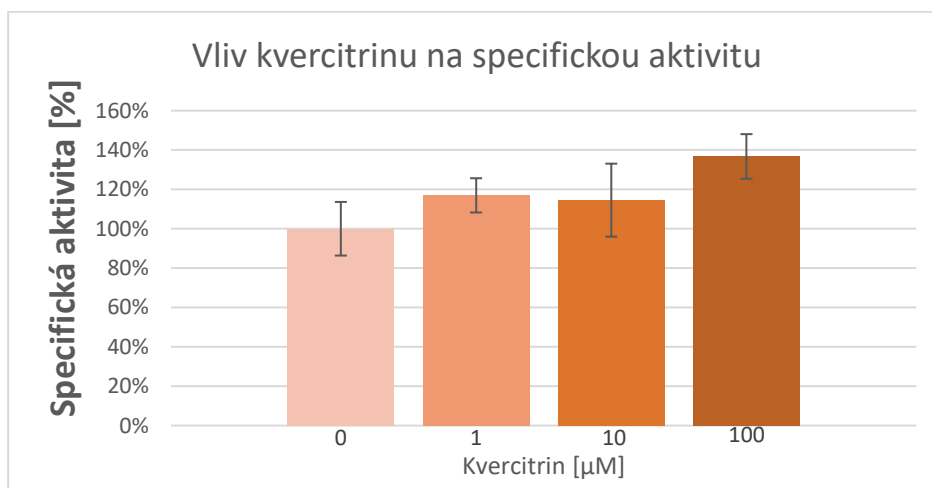
Obr. 21 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí luteolinu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$ , \* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ ), \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z grafu (obr. 21) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných luteolinem v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$  pro 10  $\mu\text{M}$  a  $p < 0,001$  pro 100  $\mu\text{M}$ ).



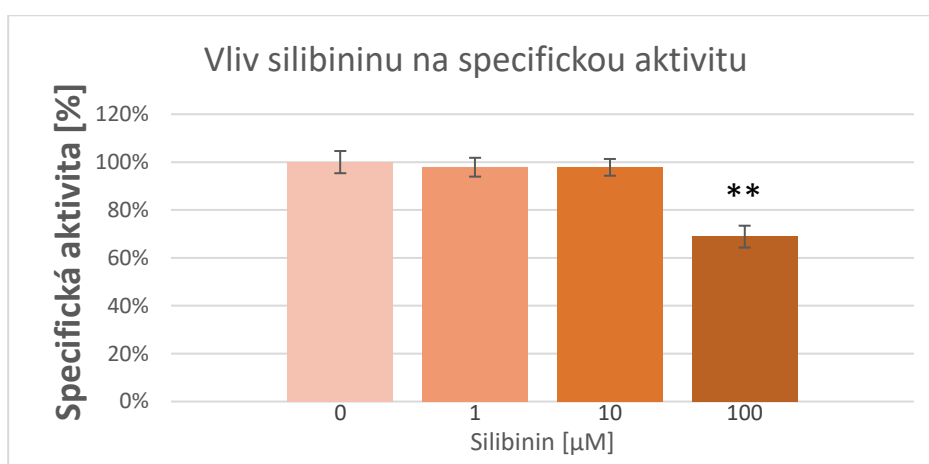
Obr. 22 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí naringeninu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 22) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných naringeninem v koncentraci 100 µM došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



Obr. 23 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí kvercitrinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 23) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných kvercitrinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 24 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí silibininu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$ , \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 24) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných silibininem v koncentraci  $100 \mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



## 6.4.2 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči menadionu

Tab. 5 Inhibice specifické aktivity redukčních enzymů vůči menadionu v cytosolické frakci různými přírodními látkami

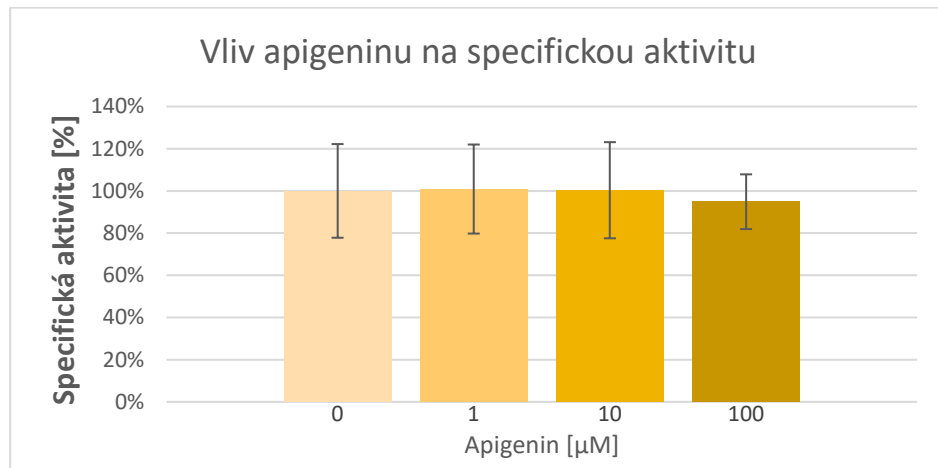
Specifická aktivita [nmol/min/mg]				
Koncentrace inhibitorů [ $\mu$ M]	0	1	10	100
Apigenin	7,10 $\pm$ 1,58	7,16 $\pm$ 1,50	7,12 $\pm$ 1,62	6,74 $\pm$ 0,92
Daidzein	3,67 $\pm$ 0,15	3,91 $\pm$ 0,57	3,63 $\pm$ 0,66	4,68 $\pm$ 0,62
Glycyrrhetinová kys.	6,39 $\pm$ 1,08	5,63 $\pm$ 0,44	5,19 $\pm$ 0,34	1,86 $\pm$ 0,57 **
Luteolin	4,72 $\pm$ 1,55	3,67 $\pm$ 1,76	3,99 $\pm$ 1,97	-
Naringenin	5,43 $\pm$ 0,50	5,19 $\pm$ 0,49	5,16 $\pm$ 0,59	3,86 $\pm$ 0,58 *
Kvercitrin	6,37 $\pm$ 0,31	6,05 $\pm$ 0,43	6,04 $\pm$ 0,46	4,88 $\pm$ 0,39 **
Silibinin	6,60 $\pm$ 0,30	6,49 $\pm$ 0,55	6,36 $\pm$ 0,34	4,86 $\pm$ 0,09 ***

\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ ), \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ ), \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z tabulky (Tab. 5) lze vidět, že k inhibici aktivity redukčních enzymů došlo u glycyrrhetinové kyseliny, naringenu, kvercitrinu a silibininu. Nejvyšší inhibiční efekt lze pozorovat u glycyrrhetinové kyseliny. U všech těchto inhibitorů došlo k inhibici v koncentraci 100  $\mu$ M.

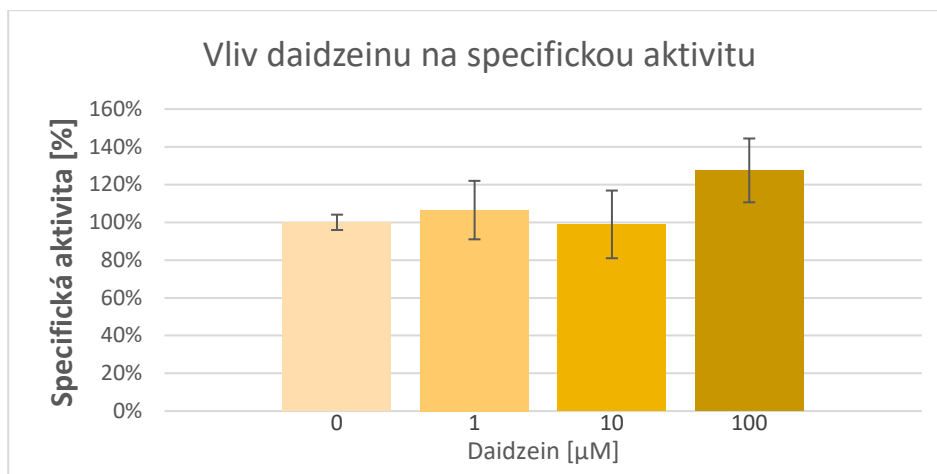
U apigeninu a daidzeinu nedošlo k významné inhibici vůbec.

U luteolinu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit. V nižších koncentracích k inhibici nedošlo.



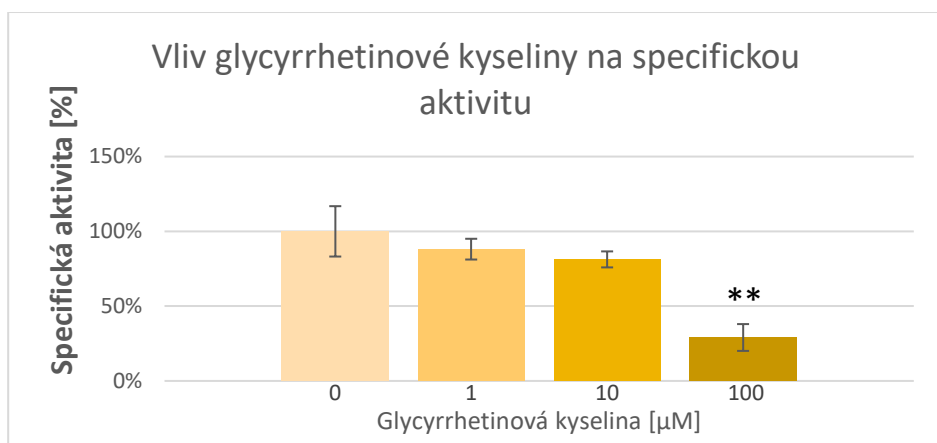
Obr. 25 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických cytosolických redukčních enzymů pomocí apigeninu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

Z grafu (obr. 25) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných apigeninem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



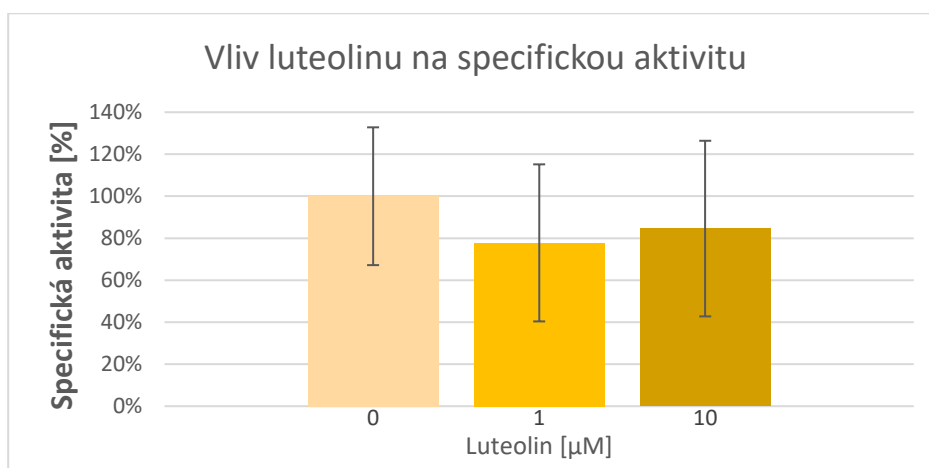
Obr. 26 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí daidzeinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 26) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných daidzeinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 27 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí glycyrrhizinové kyseliny v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

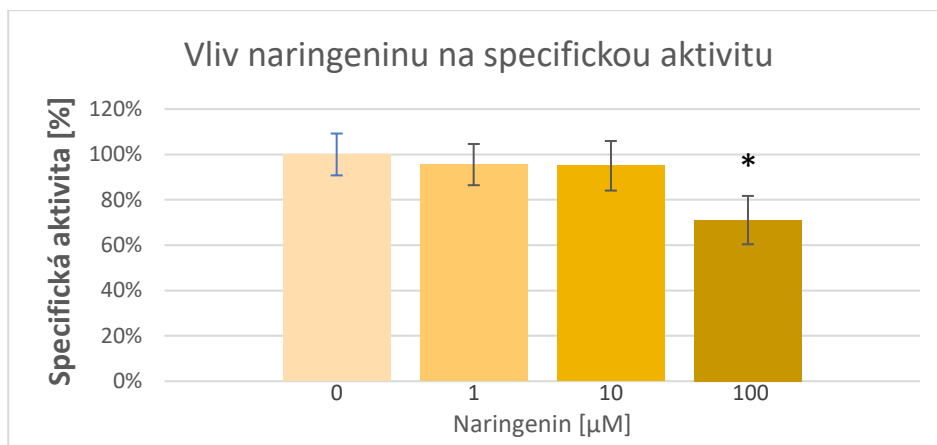
Z grafu (obr. 27) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných glycyrrhetinovou kyselinou v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



Obr. 28 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí luteolinu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

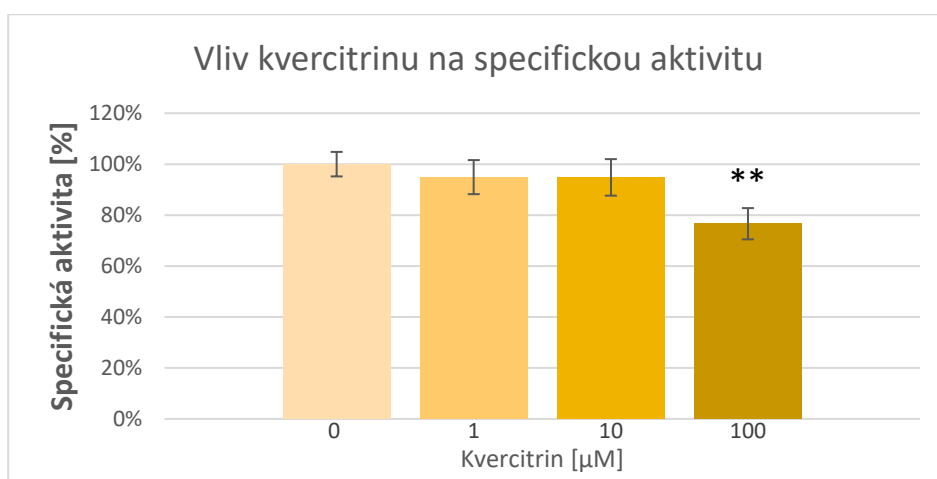
Z grafu (obr. 28) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných luteolinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

Při koncentraci inhibitoru 100  $\mu\text{M}$  došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit.



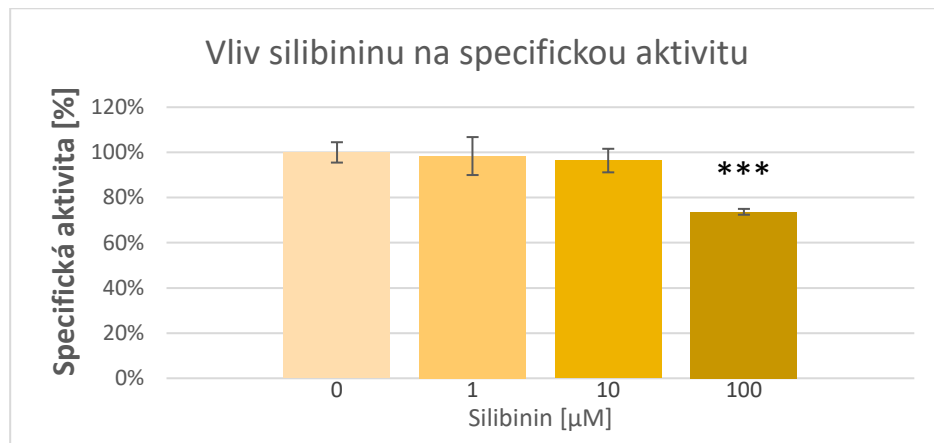
Obr. 29 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí naringeninu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ )

Z grafu (obr. 29) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných naringeninem v koncentraci 100 µM došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 30 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí kvercitrinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 30) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných kvercitrinem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



Obr. 31 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity cytosolických redukčních enzymů pomocí silibininu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$ , \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z grafu (obr. 31) vyplývá, že ve vzorcích cytosolu ovlivněných silibininem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,001$ ).

## 6.5 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas v mikrosomální frakci

Míra inhibice přírodními látkami se stanovila poklesem absorbance (kap.5.5). Výsledky shrnující vliv inhibitorů v různých koncentracích jsou znázorněny v následujících tabulkách a grafech.

### 6.5.1 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči menadionu

Tab. 6 Inhibice specifické aktivity redukčních enzymů vůči menadionu v mikrosomální frakci různými přírodními látkami

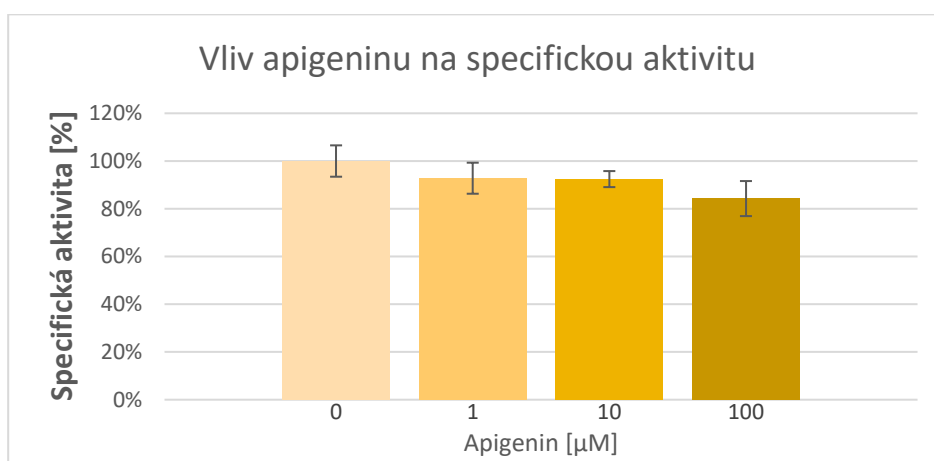
Specifická aktivita [nmol/min/mg]				
Koncentrace inhibitorů [μM]	0	1	10	100
Apigenin	5,60 ± 0,37	5,20 ± 0,36	5,18 ± 0,19	4,72 ± 0,41
Daidzein	5,91 ± 0,68	5,49 ± 0,41	5,76 ± 0,67	5,50 ± 0,59
Glycyrrhetinová kys.	4,94 ± 0,46	5,23 ± 0,48	5,45 ± 0,31	3,30 ± 0,28 **
Luteolin	4,88 ± 0,15	4,37 ± 0,43	3,75 ± 0,76	-
Naringenin	5,91 ± 0,29	5,74 ± 0,37	5,01 ± 0,73	4,19 ± 0,25 **
Kvercitrin	5,96 ± 0,46	5,63 ± 0,10	5,25 ± 0,98	4,70 ± 0,41 *
Silibinin	5,79 ± 0,51	5,57 ± 0,56	5,61 ± 0,59	4,33 ± 0,16 **

\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ ), \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ ), \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z tabulky (Tab. 6) lze vidět, že k inhibici aktivity redukčních enzymů došlo u glycyrrhetinové kyseliny, naringenin, kvercitrinu a silibininu. Nejvyšší inhibiční efekt lze pozorovat u glycyrrhetinové kyseliny. U všech těchto inhibitorů došlo k inhibici v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ .

U apigeninu, a daidzeinu nedošlo k významné inhibici vůbec.

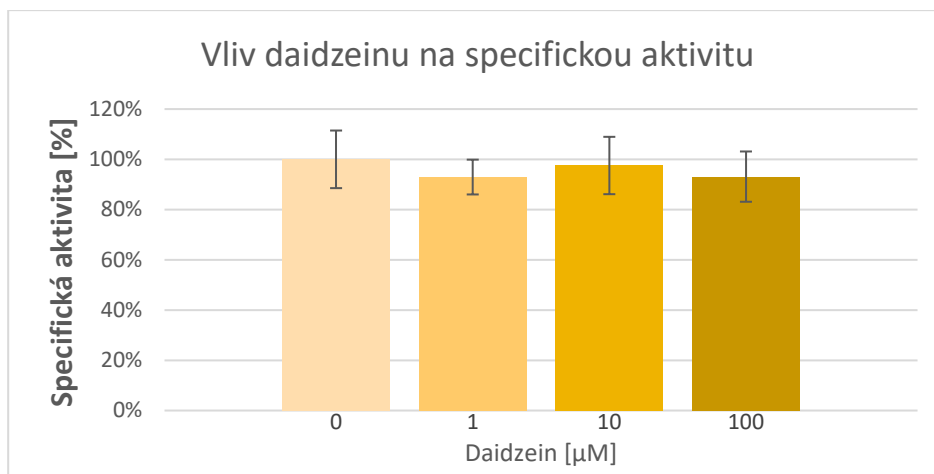
U luteolinu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit. V nižších koncentracích k inhibici nedošlo.



Obr. 32 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí apigeninu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

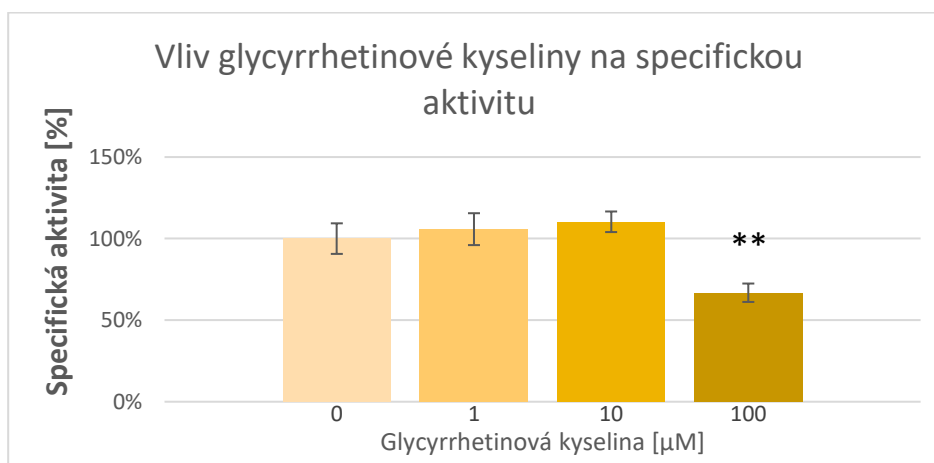
Z grafu (obr. 32) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných apigeninem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).





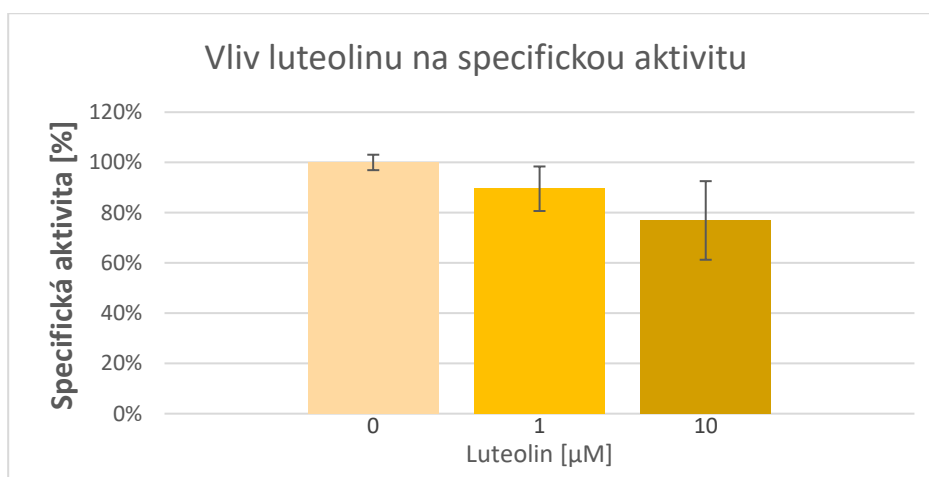
Obr. 33 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí daidzeinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 33) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných daidzeinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 34 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí glycyrrhetinové kyseliny v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

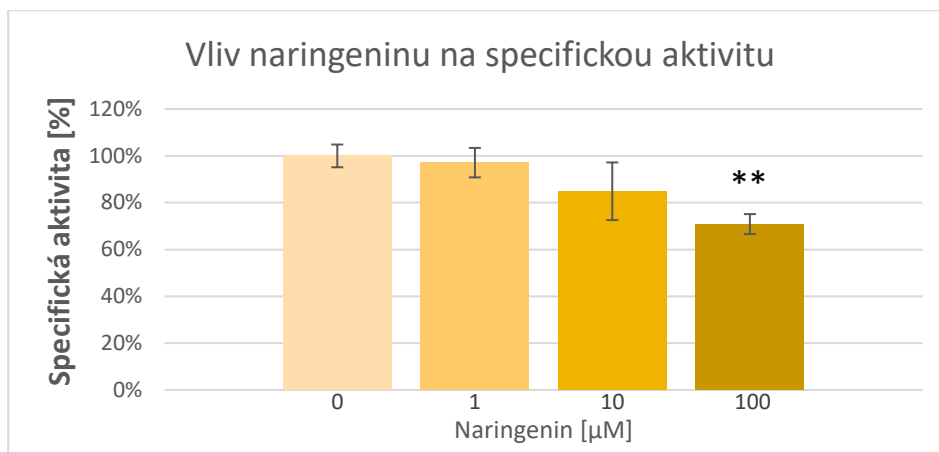
Z grafu (obr. 34) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných glycyrrhetinovou kyselinou v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



Obr. 35 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí luteolinu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

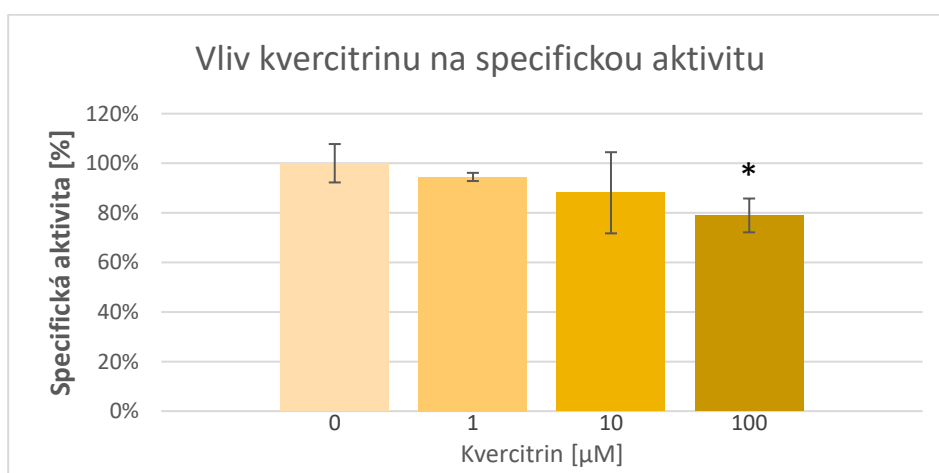
Z grafu (obr. 35) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných luteolinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

Při koncentraci inhibitoru 100  $\mu\text{M}$  došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit.



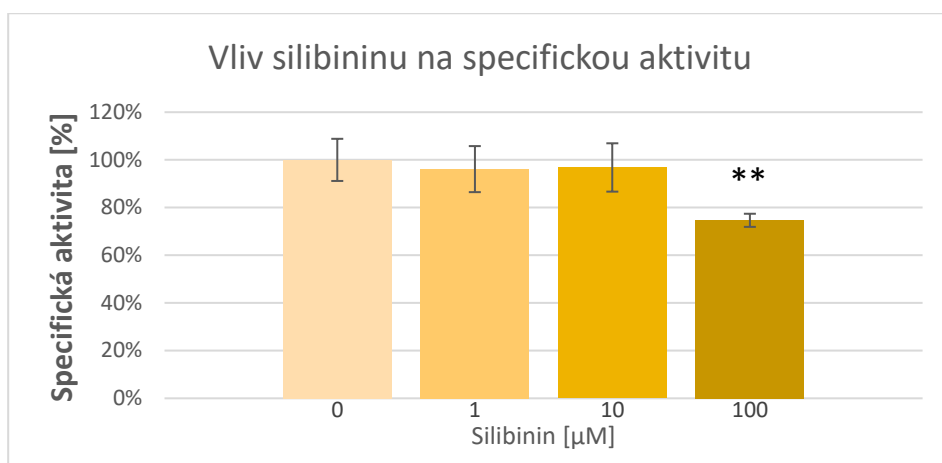
Obr. 36 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí naringeninu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci (p <0,01)

Z grafu (obr. 36) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných naringeninem v koncentraci 100 µM došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test, p <0,01).



Obr. 37 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí kvercitrinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci (p <0,05)

Z grafu (obr. 37) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných kvercitrinem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 38 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí silibininu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$ , \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 38) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných silibininem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).

## 6.5.2 Vliv přírodních látek na aktivitu reduktas vůči metyraponu

Tab. 7 Inhibice specifické aktivity redukčních enzymů vůči metyraponu v mikrosomální frakci různými přírodními látkami

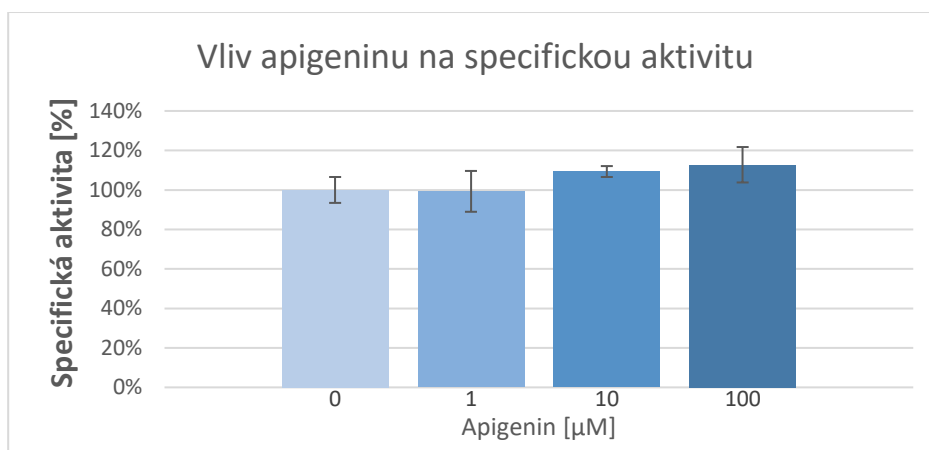
Specifická aktivita [nmol/min/mg]				
Koncentrace inhibitorů [μM]	0	1	10	100
Apigenin	4,54 ± 0,30	4,51 ± 0,47	4,96 ± 0,13	5,12 ± 0,41
Daidzein	4,22 ± 0,24	4,35 ± 0,67	4,32 ± 0,33	4,02 ± 0,40
Glycyrrhetinová kys.	4,15 ± 0,30	4,24 ± 0,12	4,78 ± 0,44	3,67 ± 0,42
Luteolin	3,53 ± 0,15	3,87 ± 0,47	3,28 ± 0,07	-
Naringenin	4,54 ± 0,28	4,20 ± 0,33	4,41 ± 0,09	3,16 ± 0,07 **
Kvercitrin	4,49 ± 0,18	4,28 ± 0,13	3,82 ± 0,38	3,15 ± 0,58 *
Silibinin	4,07 ± 0,19	4,41 ± 0,75	4,11 ± 0,47	2,76 ± 0,18 ***

\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ ), \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ ), \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z tabulky (Tab. 7) lze vidět, že k inhibici aktivity redukčních enzymů došlo u naringeninu, kvercitrinu a silibininu. Nejvyšší inhibiční efekt lze pozorovat u silibininu. U všech těchto inhibitorů došlo k inhibici v koncentraci 100 μM.

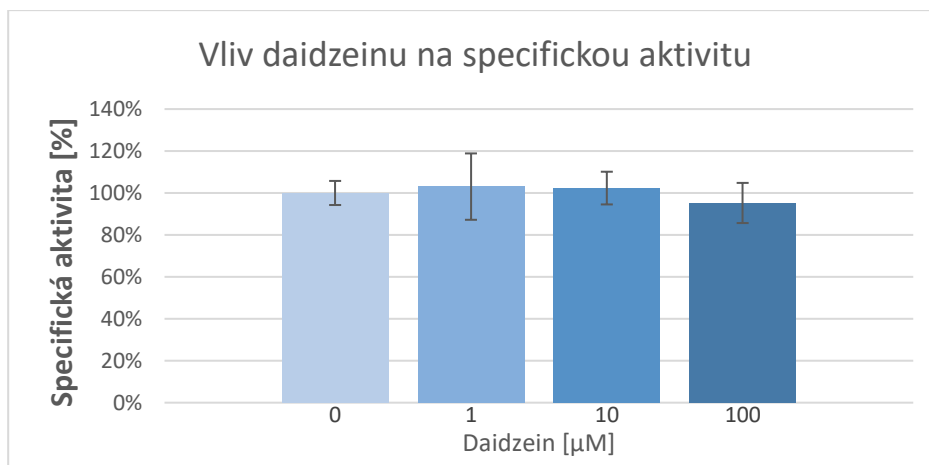
U apigeninu, daidzeinu a glycyrrhetinové kyseliny nedošlo k významné inhibici vůbec.

U luteolinu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit. V nižších koncentracích k inhibici nedošlo.



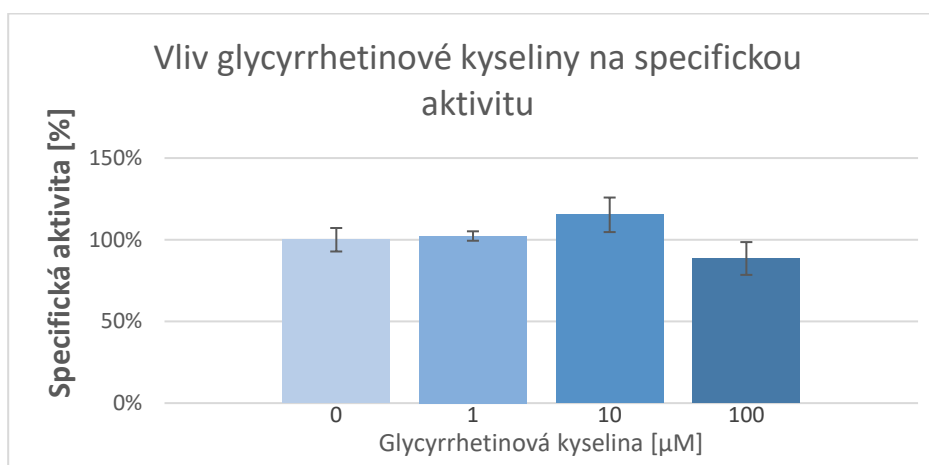
Obr. 39 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí apigeninu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

Z grafu (obr. 39) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných apigeninem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



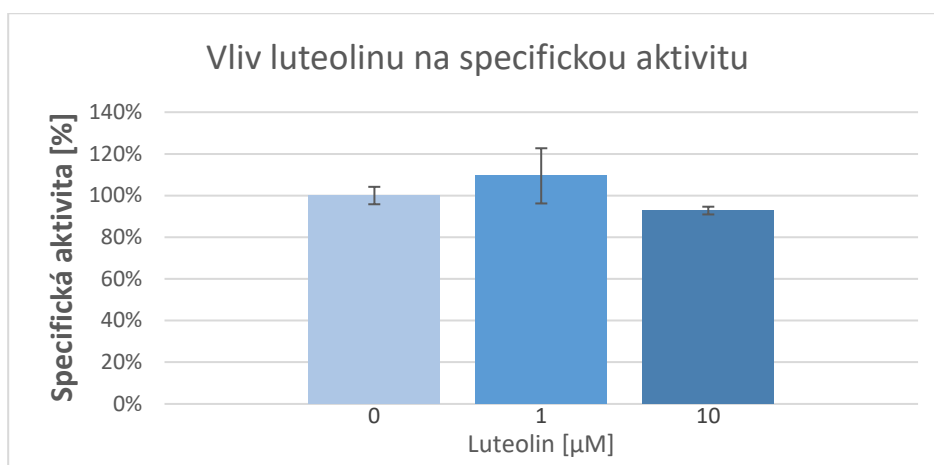
Obr. 40 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí daidzeinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 40) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných daidzeinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 41 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí glycyrrhethinové kyseliny v různých koncentracích vůči kontrole, n=3

Z grafu (obr. 41) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných glycyrrhetinovou kyselinou nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

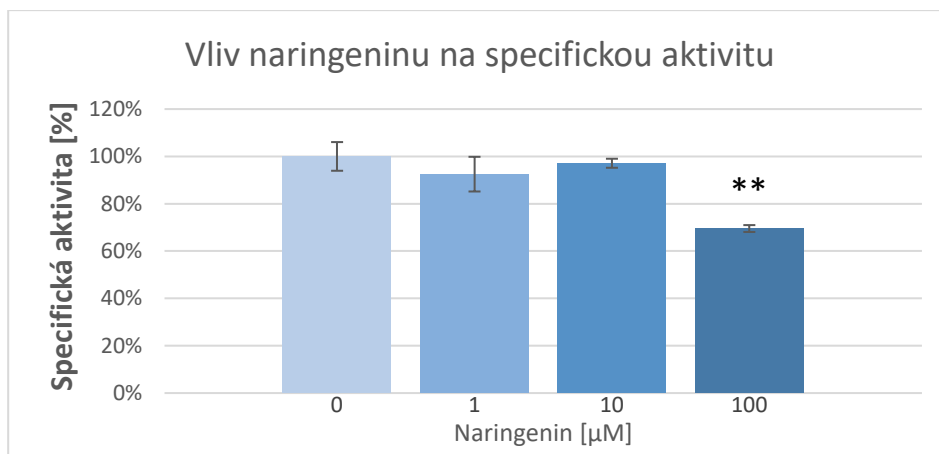


Obr. 42 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí luteolinu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$

Z grafu (obr. 42) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných luteolinem nedošlo ke statisticky významnému ovlivnění enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).

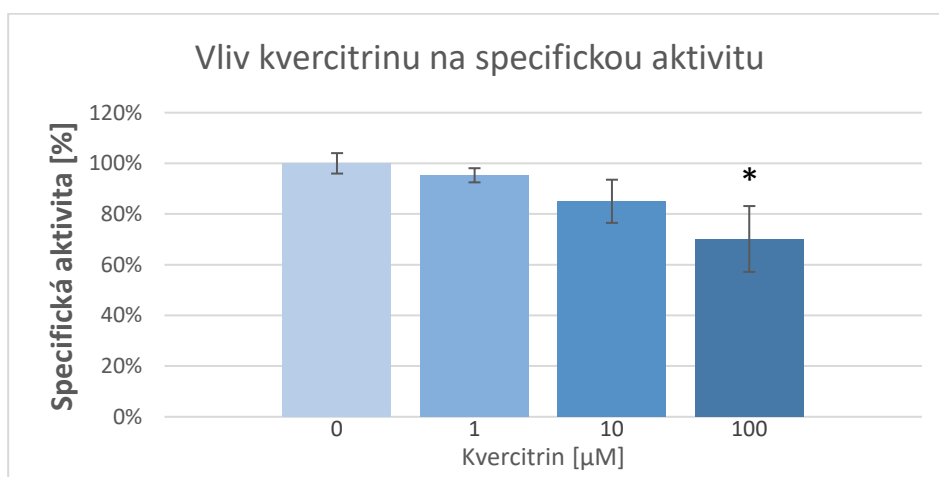
Při koncentraci inhibitoru 100 µM došlo k interferenci s použitou metodou, proto nebylo možné míru inhibice vyhodnotit.





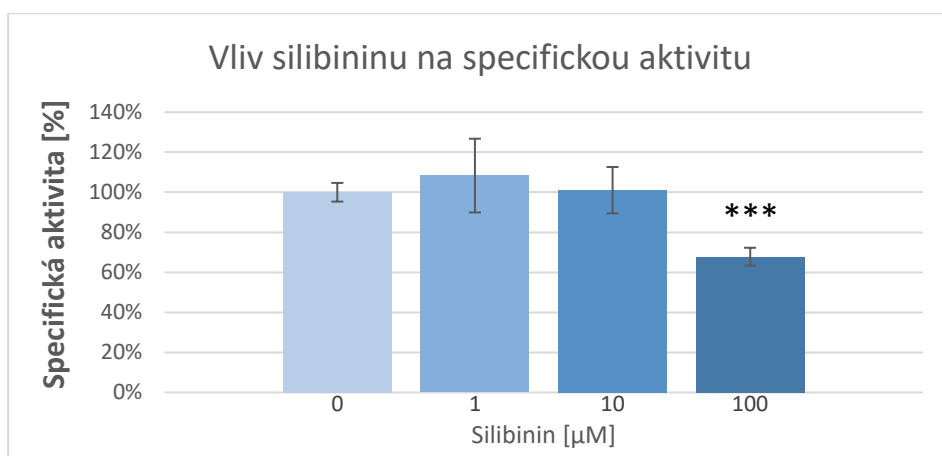
Obr. 43 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí naringeninu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,01$ )

Z grafu (obr. 43) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných naringeninem v koncentraci 100 µM došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,01$ ).



Obr. 44 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí kvercitrinu v různých koncentracích vůči kontrole, n=3, \* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,05$ )

Z grafu (obr. 44) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných kvercitrinem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,05$ ).



Obr. 45 Grafické procentuální zobrazení ovlivnění specifické aktivity mikrosomálních redukčních enzymů pomocí silibininu v různých koncentracích vůči kontrole,  $n=3$ , \*\*\* statisticky významný rozdíl vůči neinhibované reakci ( $p < 0,001$ )

Z grafu (obr. 45) vyplývá, že ve vzorcích mikrosomů ovlivněných silibininem v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  došlo ke statisticky významnému snížení enzymové aktivity redukčních enzymů vlasovky slezové (Studentův t-test,  $p < 0,001$ ).

## 7. Diskuse

Rezistence na anthelmintika je stále narůstající problém ve veterinární medicíně a zemědělství. Nákazy helminty s sebou nesou kromě zdravotních komplikací zvířat také ekonomické ztráty pro chovatele ať už snížením produktivity nebo náklady na léčbu stáda. Zatím jedinou efektivní cestou, jak bojovat s helmintózou jsou antiparazitická léčiva. Používají se širokospektrá anthelmintika, která pomáhají snížit následky onemocnění. Časté používání anthelmintik ale vyústilo v rozvoj rezistence, která je dnes celosvětový problém a bohužel je její vznik rychlejší než vývoj nových léčiv.

Konečný efekt anthelmintika v místě jeho účinku ovlivňuje více faktorů. Je ovlivněn jak metabolismem zvířete, tak metabolismem parazita. Zatím co u člověka a dalších savců jsou metabolizující enzymy relativně dobře prozkoumány, u helmintů jsou poznatky značně omezené. Metabolismus helmintů stále patří k neprozkoumaným oblastem a je potřeba se tomuto více věnovat. Více informací a lepší pochopení může vést ke snížení rezistence a vývoji nových potenciálně účinných léků.

Zatímco oxidační a konjugační enzymy jsou předmětem výzkumu už delší dobu a jsou tak lépe poznány, enzymy redukující karbonylové sloučeniny podstatně méně. Parazitující hlístice ve značné míře xenobiotika redukují, což může znamenat významnou úlohu reductas v obraně parazitů proti anthelmintikům (Babíková 2009). Tato práce je zaměřená na poznání redukčních enzymů vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) z kmene citlivého na anthelmintika (ISE – Inbred Susceptible Edinburgh) *in vitro*. *In vitro* výzkum neodpovídá přesným reálným podmínkám, protože se jedná o inkubaci subcelulárních frakcí (cytosolu a mikrosomů). V *in vitro* stanovení mohou být rovněž používány vysoké koncentrace substrátu i NADPH (Bečanová 2013).

Reduktasy jsou enzymy první fáze biotransformace. Jejich zvýšená exprese může být indukována stresovou odpovědí na podání léčiv, a proto výzkum jejich potenciálních inhibitorů může vést ke zvýšení efektivity léčby onemocnění.

*Haemonchus contortus* je nejvíce zkoumaná parazitická hlístice, hlavně díky své patogenitě, rozšíření po celém světě a vysoké rezistenci na všechny skupiny anthelmintik. Používá se pro hledání nových léků, mechanismů jejich účinků a pochopení rezistence. Měření probíhalo na subcelulárních frakcích, konkrétně cytosolu a mikrosomech.

Na základě znalostí o lidských enzimech byly zvoleny potenciální substráty pro enzymy hlístic. Lidské enzymy mohou být nicméně odlišné, a proto se spektrofotometricky stanovila biotransformační aktivita v daných frakcích a na základě ní se zvolily substráty pro další zkoumání enzymů. Pro každou frakci byly zvoleny dva substráty, u kterých byla prokázána nejvyšší specifická aktivita redukčních enzymů. U zbylých substrátů specifická aktivita prokázána nebyla anebo byla nižší, a tudíž pro inhibiční studie nebyly vhodné.

Acenaftenol je typický substrát pro AKR1C u savců (Zavřelová 2008). V cytosolické frakci byl acenaftenol metabolizován, což naznačuje přítomnost tohoto enzymu z nadrodiny AKR u vlasovek. Jelikož se jedná o cytosolický enzym, tak se dle předpokladů v mikrosomální frakci specifická enzymatická aktivita neprojevila. V cytosolu byla specifická aktivita nízká, a proto tento substrát pro další měření zvolený nebyl.

Vysoká specifická aktivita reduktas vůči glycerinaldehydu byla naměřena v cytosolu a méně významná v mikrosomální frakci. Je to substrát charakteristický pro cytosolické enzymy AKR1A, AKR1B10 a CBR1 (Cvilink et al. 2009, Urbánková 2007). Substrát byl vybrán pro inhibiční studii v cytosolu. Z vybraných specifických inhibitorů došlo ke snížení aktivity cytosolických reduktas vlasovek s glycyrrhetinovou kyselinou, luteolinem, naringeninem a silibininem. To poukazuje na přítomnost enzymů z nadrodiny AKR (AKR1B10) i SDR (CBR1). Největší míra inhibice se projevuje u luteolinu, který je inhibitorem obou enzymů a dále u naringeninu, který je rovněž enzymový inhibitor obou (Holečková 2012, Malátková et al. 2013, Zemanová et al. 2015). Ve vzorcích ovlivněných kvercitrinem nedošlo k výraznému ovlivnění enzymové aktivity. Důvodem mohou být odlišnosti v enzimech člověka a vlasovky.

Pro porovnání s lidskými enzymy podle Zemanové et al. (2015) k inhibici AKR1B10 naringeninem či silibininem došlo již v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a taktéž s luteolinem. Největší míra inhibice byla ale prokázána u apigeninu a daidzeinu, u kterých v tomto výzkumu k inhibici nedošlo vůbec. Výzkum Zemanové et al. (2015) byl prováděn na substrátu all-trans-retinalu.

Pro ketoprofen nebyla prokázána významná specifická aktivita v cytosolu. V mikrosomální frakci byla změřená aktivita vyšší. Pravděpodobně je to způsobené přítomností enzymu 11 $\beta$ -HSD1, který je typický právě pro tuto subcelulární lokalizaci

(Urbánková 2007). Nicméně aktivita reduktas vůči ketoprofenu byla nižší než u jiných substrátů a měření s ketoprofenem dále nepokračovalo.

Menadion se ukázal jako vhodný substrát jak pro cytosolickou, tak i pro mikrosomální frakci. Přeměňuje ho cytosolická reduktasa CBR1 a mikrosomální 11 $\beta$ -HSD1 (Urbánková 2007). V cytosolu k nejvyšší inhibici došlo u glycyrrhetinové kyseliny. Může to být způsobeno odlišností mezi enzymy helmintů a člověka, nebo přítomností dalších enzymů v cytosolu vlasovek, které se na redukcii také podílejí a jsou kyselinou glycyrrhetinovou inhibovány. Stejný případ je i u silibininu. K významné inhibici došlo i po přidání 100  $\mu$ M naringeninů a kvercitrinu do reakční směsi. Tyto dvě látky jsou specifickými inhibitory CBR1, tedy reduktasy z nadrodiny SDR (Malátková et al. 2013, Zemanová et al. 2015). Aktivita lidské CBR1 vůči substrátu NNK a isatinu byla však inhibována již 5  $\mu$ M koncentrací kvercitrinu (Malátková et al. 2013). V mikrosomální frakci se jako nejsilnější inhibitor ukázala stejná látka, a to kyselina glycyrrhetinová v nejvyšší použité koncentraci (100  $\mu$ M). Inhibuje aktivitu mikrosomální 11 $\beta$ -HSD1 z nadrodiny SDR (Holečková 2012, Malátková et al. 2013, Schweizer et al. 2003). Lidská 11 $\beta$ -HSD1 je inhibována kyselinou glycyrrhetinovou výrazněji, hodnota IC<sub>50</sub> je 1,57  $\mu$ M (Schweizer et al. 2003). Dalšími vhodnými inhibitory vůči testované látce jsou naringenin, kvercitrin a silibinin. To může mít opět více důvodů. Může se lišit substrátová specifita enzymů vlasovek a saveců anebo jsou enzymy redukující karbonylovou skupinu sloučenin různě citlivé vůči testovaným inhibitorům. U inhibice luteolinem došlo v nejvyšší použité koncentraci inhibitoru k interferenci s použitou analytickou metodou a nebylo tak možné zhodnotit potenciální míru inhibice ani v cytosolu ani v mikrosomální frakci.

Metyrapon je substrát charakteristický pro více enzymů. V cytosolu dochází k jeho redukcii pomocí AKR1A, AKR1C a CBR1, v mikrosomech pomocí 11 $\beta$ -HSD1 (Cvilink et al. 2009, Urbánková 2007). V cytosolické frakci nebyl pro další měření vybrán z důvodu přítomnosti substrátů, vůči nimž měly enzymy vlasovek vyšší specifickou aktivitu, nicméně v závislosti na prokázané aktivitě nelze potvrdit ani vyvrátit přítomnost některé z výše uvedených cytosolických reduktas. V mikrosomální frakci byla nalezená vyšší aktivita, takže metyrapon byl zvolen i pro měření míry inhibice různých látek. K inhibici došlo pomocí naringeninů, který je kromě jiných enzymů (cytosolických AKR1C, AKR1B10, CBR1) inhibitorem mikrosomální reduktasy 11 $\beta$ -HSD1 (Patel et al. 2018, Zemanová et al. 2015, Schweizer et al. 2003). Inhibiční potenciál byl prokázán i u

kvercitrinu a silibininu, takže je pravděpodobná přítomnost jiných enzymů a/nebo odlišnosti od lidských enzymů. Glycyrrhetinová kyselina je inhibítoem lidské 11 $\beta$ -HSD1, nicméně u vlasovky k inhibici redukce metyraponu touto látkou očividně nedošlo, přestože redukce menadionu byla inhibována. Možnou příčinou by mohla být odlišná substrátová specifita enzymu u vlasovky.

Posledním vybraným substrátem byl naloxon. Jedná se o substrát lidské AKR1C (Urbánková 2007), ale v cytosolické frakci hlístic nebyla prokázána prakticky žádná aktivita. Nejedná se tedy pravděpodobně o substrát této reductasy u vlasovky. V mikrosomální frakci byla aktivita s tímto substrátem naměřená vyšší, což naznačuje přítomnost enzymů schopných naloxon redukovat. Jedním z možných enzymů by mohla být 11 $\beta$ -HSD1, která je membránově vázaná a její aktivita byla u vlasovek prokázána vůči menadionu.

Inhibitory apigenin a daidzein neovlivnily žádnou reakci. Můžeme tedy předpokládat, že ačkoliv jsou inhibitory pro lidskou AKR1B10 a CBR1 a apigenin i pro AKR1C (Salehi et al. 2019, Malátková et al. 2013, Sun et al. 2016), tak zřejmě nejsou inhibitory pro obdobu lidských enzymů u vlasovky slezové.

V této práci jsem se experimentálně pokusila charakterizovat některé enzymy redukující karbonylové sloučeniny u vlasovky slezové pomocí substrátů a inhibitorů specifických pro lidské reductasy. V každé subcelulární frakci byla měřena inhibice enzymové aktivity relativně specifickými inhibitory vůči dvěma nejvíce metabolizovaným specifickým substrátům. Některé substráty, které nebyly zahrnuté v inhibiční studii, také byly redukovány v subcelulárních frakcích vlasovky slezové, ovšem s nižší aktivitou.

Výsledky dokazují, že vlasovka slezová je schopná metabolizovat xenobiotika s karbonylovou skupinou pomocí redukčních enzymů a bránit se tak účinkům léčiv, ale je možné tyto enzymy inhibovat. Podle výsledku této práce lze určit potenciální inhibitory použitelné pro další výzkum boje s rezistencí na anthelmintika a vyloučit látky, které neměly žádný efekt. Na základě použitých specifických substrátů a inhibitorů podle informací o lidských reductasach, které mohou ale nemusí být nutně shodné, lze přítomné enzymy z nadrodin AKR a SDR spíše odhadnout než pevně stanovit.

## 8. Závěr

V získaných subcelulárních frakcích dospělců citlivého (ISE) kmene vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) bylo změřeno a vypočítáno množství proteinů. Hodnota byla vypočtena zvlášť pro cytosolickou a zvlášť pro mikrosomální frakci.

Na základě znalostí lidských biotransformačních enzymů byly vybrány potenciální substráty pro biotransformační enzymy hlístic. Nejvyšší specifická aktivita redukčních enzymů vlasovky slezové v cytosolu byla zjištěna pro substráty glycerinaldehyd ( $8,22 \pm 0,82$  [nmol/min/mg]) a menadion ( $4,63 \pm 0,46$  [nmol/min/mg]). V mikrosomální frakci to byly substráty menadion ( $4,38 \pm 0,36$  [nmol/min/mg]) a metyrapon ( $1,92 \pm 0,14$  [nmol/min/mg]). Uvedené substráty redukčních enzymů byly využity v následující inhibiční studii.

Specifické inhibitory (glycyrrhetinová kyselina, luteolin, naringenin, kvercitrin a silibinin) způsobily pokles aktivity redukčních enzymů v cytosolické i mikrosomální frakci. Na základě získaných hodnot byly určeny některé enzymy z nadrodin AKR a SDR. Z výsledků je patrná přítomnost cytosolických enzymů AKR1B10 a AKR1C z nadrodiny AKR a cytosolické CBR1 a mikrosomální 11 $\beta$ -HSD1 z nadrodiny SDR.

Zde prezentované výsledky odhalují pouze část přítomných metabolizujících enzymů. Pro kompletní pochopení metabolismu a zjištění, zda se na redukci podílí i další reduktasy by bylo potřebné prezentované výsledky rozšířit o další studie.

## 9. Literatura

ANGULO-CUBILLÁN, F.J., L. GARCÍA-COIRADAS, J.M. ALUNDA, M. CUQUERELLA a C. DE LA FUENTE. Biological characterization and pathogenicity of three *Haemonchus contortus* isolates in primary infections in lambs. *Veterinary Parasitology*. 2010, **171**(1-2), 99-105. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2010.03.004

BABÍKOVÁ, Martina. *Vliv flubendazolu na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů u parazitujících červů Haemonchus contortus*. 2009. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Skálová, Lenka

BARSKI, Oleg A., Srinivas M. TIPPARAJU a Aruni BHATNAGAR. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 2008, **40**(4), 553-624. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.1080/03602530802431439

BARTÁSKOVÁ, Lenka. *Rozdíly mezi citlivými a rezistentními kmeny vlasovky slézové (Haemonchus contortus)*. 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Svobodová, Hana.

BEČANOVÁ, Aneta. *Biotransformace vybraných anthelmintik u tasemnice ovčí (Moniezia expansa)*. 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Svobodová, Hana.

BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. In: *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 2016, s. 95-143. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.022

BOUŠOVÁ, Iva, Lenka SKÁLOVÁ, Pavel SOUČEK a Petra MATOUŠKOVÁ. The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols. *Drug Metabolism Reviews*. 2015, **47**(4), 520-533

BURKE, J.M., J.E. MILLER a T.H. TERRILL. Impact of rotational grazing on management of gastrointestinal nematodes in weaned lambs. *Veterinary Parasitology*. 2009, **163**(1-2), 67-72. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.054

CVILINK, Viktor, Lenka SKÁLOVÁ, Barbora SZOTÁKOVÁ, Jiří LAMKA, Risto KOSTIAINEN a Raimo A. KETOLA. LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed ex vivo by *Haemonchus contortus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, **391**(1), 337-343. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-1863-9



- CVILINK, Viktor, Jiri LAMKA a Lenka SKÁLOVÁ. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*. 2009, **41**(1), 8-26. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.1080/03602530802602880
- GHISI, Marc, Ronald KAMINSKY a Pascal MÄSER. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*. 2007, **144**(3-4), 313-320. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.003
- GILLEARD, JOHN S. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*. 2013, **140**(12), 1506-1522. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182013001145
- HOLEČKOVÁ, Dana. Mikroskopie kořenů z různých druhů rodu *Glycyrrhiza* (Fabaceae). II. 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognozie. Vedoucí práce Spilková, Jiřina
- CHIOU, Tzeon-Jye, Yu-Tai WANG a Woan-Fang TZENG. DT-diaphorase protects against menadione-induced oxidative stress. *Toxicology*. 1999, **139**(1-2), 103-110. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-483X(99)00109-2
- JELENKOVÁ, Klára. *Vliv monepantelu na expresi vybraných enzymů u vlasovky slezové*. 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Matoušková, Petra.
- LAING, Roz, Taisei KIKUCHI, Axel MARTINELLI, et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. 2013, **14**(8). ISSN 1465-6906. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2013-14-8-r88
- MALÁTKOVÁ, Petra, Vladimír WSÓL, Jaume FARRÉS, et al. Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*. 2013, **46**(1), 96-123. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2013.853078
- MIURA, Takeshi, Toru NISHINAKA a Tomoyuki TERADA. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2008, **315**(1-2), 113-121. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-008-9794-5
- PATEL, Kanika, Gireesh Kumar SINGH a Dinesh Kumar PATEL. A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2018, **24**(7), 551-560. ISSN 1672-0415. Dostupné z: doi:10.1007/s11655-014-1960-x
- PECHOVÁ, Martina. *Stanovení vybraných fenolických látek v ovoci*. Hradec Králové, 2017. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Sklenářová, Hana.

- SALEHI, Bahare, Alessandro VENDITTI, Mehdi SHARIFI-RAD, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(6). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20061305
- SALLÉ, G., S. R. DOYLE, J. CORTET, J. CABARET, M. BERRIMAN, N. HOLROYD a J. A. COTTON. The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate. *Nature Communications*. 2019, **10**(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-12695-4
- SEČKAŘOVÁ, Anna. *Biotransformace vybraných anthelmintik u vlasovky slezové*. 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Raisová Stuchlíková, Lucie
- SEELINGER, Günter, Irmgard MERFORT a Christoph SCHEMPP. Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Luteolin. *Planta Medica*. 2008, **74**(14), 1667-1677. ISSN 0032-0943. Dostupné z: doi:10.1055/s-0028-1088314
- SCHWEIZER, Roberto A.S., Atanas G. ATANASOV, Brigitte M. FREY, et al. A rapid screening assay for inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases (11 $\beta$ -HSD): flavanone selectively inhibits 11 $\beta$ -HSD1 reductase activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003, **212**(1-2), 41-49. ISSN 03037207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2003.09.027
- SKÁLOVÁ, Lenka. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, 2018, 1 (172 stran). ISBN 978-80-246-3762-4.
- SUN, Meng-Yao, Ying YE, Ling XIAO, Khalid RAHMAN, Wei XIA a Hong ZHANG. Daidzein: A review of pharmacological effects. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2016, **13**(3), 117-132. ISSN 0189-6016. Dostupné z: doi:10.4314/ajtcam.v13i3.15
- ŠKARYDOVÁ, Lucie, Lucie ŽIVNÁ, Guangming XIONG, et al. AKR1C3 as a potential target for the inhibitory effect of dietary flavonoids. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, **178**(1-3), 138-144. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.10.015
- ŠKARYDOVÁ, Lucie a Vladimír WSÓL. Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, **44**(2), 173-191. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2011.638304
- URBÁNKOVÁ, Marie. *Aktivita biotransformačních enzymů u muflonů s dikroceliózou a u zdravých muflonů*. 2007. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Szotáková, Barbora.
- WEI, Pengsheng, Xue LI, Shuai WANG, et al. Silibinin Ameliorates Formaldehyde-Induced Cognitive Impairment by Inhibiting Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022, **2022**, 1-13. ISSN 1942-0994. Dostupné z: doi:10.1155/2022/5981353

WOLSTENHOLME, Adrian J., Ian FAIRWEATHER, Roger PRICHARD, Georg VON SAMSON-HIMMELSTJERNA a Nicholas C. SANGSTER. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 2004, **20**(10), 469-476. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2004.07.010

ZAJÍČKOVÁ, Markéta, Lukáš PRCHAL, Martina NAVRÁTILOVÁ, Nikola VODVÁRKOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ, Ivan VOKŘÁL, Linh Thuy NGUYEN a Lenka SKÁLOVÁ. Sertraline as a new potential anthelmintic against *Haemonchus contortus*: toxicity, efficacy, and biotransformation. *Veterinary Research*. 2021, **52**(1). ISSN 1297-9716. Dostupné z: doi:10.1186/s13567-021-01012-x

ZAVŘELOVÁ, Iva. *Spektrofluorimetrické stanovení aktivit aldo/ketoreduktas*. 2008. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Skálová, Lenka.

ZEMANOVA, Lucie, Jakub HOFMAN, Eva NOVOTNA, et al. Flavones Inhibit the Activity of AKR1B10, a Promising Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Journal of Natural Products*. 2015, **78**(11), 2666-2674. ISSN 0163-3864. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00616