

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**VLIV ALBENDAZOLU NA AKTIVITU VYBRANÝCH ENZYMŮ  
U TASEMNICE *HYMENOLEPIS DIMINUTA***

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Andrea Krejzová

## **PROHLÁŠENÍ**

„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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala panu PharmDr. Ivanu Vokřálovi, PhD. za cenné rady a vedení mé diplomové práce. Dále děkuji pracovníkům katedry biochemických věd za vytvoření příjemného prostředí pro provedení experimentální části práce. A v neposlední řadě mé poděkování patří Karolíně Lukačikové za spolupráci při experimentu.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studentka:** Andrea Krejzová

**Školitel:** PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vliv albendazolu na aktivitu vybraných enzymů u tasemnice *Hymenolepis diminuta*

Účinnost anthelmintik, používaných pro terapii onemocnění způsobených helminty, není vždy dostačující a v některých případech se setkáváme přímo s rezistencí na tato léčiva. Helminti, mezi něž patří i tasemnice, se dokáží toxickému vlivu anthelmintik bránit pomocí řady mechanismů. Mezi tyto mechanismy patří také enzymy metabolizující xenobiotika a transportní proteiny. Jsou-li enzymy metabolizující xenobiotika indukovány, může být účinnost terapie významně snižována. Vliv xenobiotika metabolizujících enzymů na vznik rezistence u řady helmintů je již znám a popsán. U tasemnic dosud tyto informace schází.

Hlavním cílem této práce bylo stanovení vlivu albendazolu na aktivitu vybraných xenobiotika metabolizujících enzymů tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Tasemnice byly inkubovány s albendazolem (1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ) po dobu 24 hodin. Následně byly stanoveny v cytosolické, mikrosomální a mitochondriální frakci aktivity vybraných enzymů. V této práci jsme se zaměřili na aktivitu karbonylreduktasy, dvě isoformy aldoketoreduktasy (AKR1C a AKR1A1), katalasu, superoxid dismutasu, peroxidasu, glutathionreduktasovou aktivitu thioredoxin-glutathionreduktasy, glutathion-S-transferasu, UDP-glukuronosyltransferasu a UDP-glukosyltransferasu.

Vliv albendazolu na aktivitu enzymů *H. diminuta* byl prokázán. Došlo ke zvýšení aktivity některých enzymů v cytosolické a mikrosomální frakci, a naopak ke snížení aktivity některých enzymů v mitochondriální frakci. Zvýšení aktivity těchto enzymů u *H. diminuta* po inkubaci s albendazolem podporuje hypotézu o spojitosti enzymů metabolizujících xenobiotika s lékovou rezistencí u tasemnic.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

**Student:** Andrea Krejzová

**Supervisor:** PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Effect of albendazole on the activity of selected enzymes in tapeworm *Hymenolepis diminuta*

The efficacy of anthelmintics used to treat diseases caused by helminths is not always sufficient, and in some cases, we are directly facing resistance to these drugs. Helminths, including tapeworms, are able to defend against the toxic effect of anthelmintics using several mechanisms. Xenobiotic metabolizing enzymes and transport proteins belong to these mechanisms. When xenobiotic metabolizing enzymes are induced, the efficacy of therapy may be significantly reduced. The effect of xenobiotic metabolizing enzymes on the drug resistance development has been already described in number of helminths. In tapeworms this information is still missing.

Main aim of this study was to determine effect of drug albendazole on the activity of selected xenobiotic metabolizing enzymes in rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*). Tapeworms were incubated with albendazole (1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) for 24 hours. Then activities of selected enzymes in cytosol-like, microsome-like and mitochondria-like fractions were determined. This study is focused on activity of carbonylreductase, two isoforms of aldo-ketoreductase (AKR1C and AKR1A1), catalase, superoxide dismutase, peroxidase, glutathionereductase activity of thioredoxin-glutathionreductase, glutathione-S-transferase, UDP-glucuronosyltransferase and UDP-glucosyltransferase.

The effect of albendazole on the activity of enzymes in *H. diminuta* has been demonstrated. The activity of some enzymes was increased in cytosol-like and microsome-like fractions, and on the contrary decreased in mitochondria-like fraction. Increased activity of these enzymes in *H. diminuta* supports the hypothesis that xenobiotic metabolizing enzymes participate in drug resistance development in tapeworms.



# OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	9
2	ÚVOD .....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1	<i>Hymenolepis diminuta</i> .....	12
3.1.1	Obecná charakteristika .....	12
3.1.2	Popis dospělé tasemnice podtřídy <i>Eucestoda</i> .....	12
3.1.3	Životní cyklus.....	15
3.1.4	Hymenolepióza .....	16
3.1.5	Další onemocnění způsobené tasemnicemi.....	17
3.2	Anthelmintika využívaná k terapii cestodóz.....	19
3.2.1	Benzimidazolová anthelmintika .....	19
3.2.2	Prazikvantel.....	23
3.2.3	Niklosamid.....	24
3.3	Biotransformační enzymy.....	25
3.3.1	Reduktasy .....	26
3.3.1.1	Aldo-ketoreduktasy .....	26
3.3.1.2	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem.....	27
3.3.2	Enzymy s antioxidační funkcí.....	27
3.3.2.1	Thioredoxin-glutathionreduktasa .....	28
3.3.2.2	Katalasa.....	29
3.3.2.3	Superoxid dismutasa .....	29
3.3.2.4	Peroxidasa .....	29
3.3.3	Konjugační enzymy .....	30
3.3.3.1	Glutathion-S-transferasa .....	31
3.3.3.2	UDP-glykosyltransferasy .....	31
4	CÍLE PRÁCE.....	33
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1	Materiál.....	34
5.1.1	Chemikálie .....	34
5.1.2	Přístroje a pomůcky.....	35
5.1.3	Biologický materiál.....	36
5.2	Metodika práce .....	37

5.2.1	Izolace jedinců tasemnice krysí ( <i>Hymenolepis diminuta</i> ) z laboratorního potkana ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	37
5.2.2	Inkubace tasemnice krysí ( <i>Hymenolepis diminuta</i> ) s albendazolem.....	37
5.2.3	Příprava subcelulárních frakcí z tasemnice krysí ( <i>Hymenolepis diminuta</i> ) .....	38
5.2.4	Stanovení aktivit vybraných enzymů <i>Hymenolepis diminuta</i> .....	40
5.2.4.1	Stanovení aktivity karbonylreduktasy pomocí menadionu .....	40
5.2.4.2	Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1A1 pomocí 4-pyridinkarboxaldehydu .....	41
5.2.4.3	Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1C pomocí acenaftenolu .....	42
5.2.4.4	Stanovení glutathionreduktasové aktivity .....	43
5.2.4.5	Stanovení aktivity katalasy pomocí molybdenanu amonného .....	45
5.2.4.6	Stanovení aktivity superoxid dismutasy.....	46
5.2.4.7	Stanovení aktivity peroxidasy pomocí anilinu a pyrokatecholu.....	48
5.2.4.8	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy .....	49
5.2.4.9	Stanovení aktivit UDP-glykosyltransferas.....	50
5.2.5	Stanovení množství bílkoviny ve vzorku subcelulární frakce.....	52
5.3	Vyhodnocení a statistické zpracování dat.....	54
6	VÝSLEDKY .....	55
6.1	Aktivita aldoketoreduktasy 1C .....	55
6.2	Aktivita aldoketoreduktasy 1A1 .....	57
6.3	Aktivita karbonylreduktasy .....	58
6.4	Glutathionreduktasová aktivita .....	60
6.5	Aktivita katalasy .....	62
6.6	Aktivita superoxid dismutasy .....	63
6.7	Aktivita peroxidasy.....	65
6.8	Aktivita glutathion-S-transferasy.....	67
6.9	Aktivita UDP-glukuronosyltransferasy .....	69
6.10	Aktivita UDP-glukosyltransferasy.....	71
7	DISKUSE.....	73
8	ZÁVĚR .....	76
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77



# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABZ	albendazol
ABZ.SO	albendazol sulfoxid
ABZ.SO <sub>2</sub>	albendazol sulfon
ABZ1	skupina vzorků inkubovaných s 1 μM albendazolem
ABZ10	skupina vzorků inkubovaných s 10 μM albendazolem
AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	bovine serum albumin
BZD	benzimidazolová anthelmintika
CAT	katalasa
CBR	karbonylreduktasa
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrobenzen
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetal bovine serum
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidováný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
K	kontrolní skupina vzorků v čase t = 24 h
KOH	kontrolní skupina vzorků v čase t = 0 h
MBZ	mebendazol
MBZ-R	redukováný mebendazol
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
PBS	phosphate buffered saline
PEN/STREP	penicilin/streptomycin
Px	peroxidasa
PZQ	prazikvantel

SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SOD	superoxid dismutasa
TCA	trichloroctová kyselina
TGR	thioredoxin-glutathionreduktasa
TxR	thioredoxinreduktasa
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UDP-Glc	UDP-glukosa
UGlcT	UDP-glukosyltransferasa
UGT	UPD-glukuronosyltransferasa

## 2 ÚVOD

Tasemnice způsobují vážná infekční onemocnění u zvířat i člověka. Jsou příčinou zdravotních obtíží, ale také ekonomických ztrát. Pro kontrolu těchto onemocnění jsou používána zejména benzimidazolová anthelmintika, prazikvantel, niklosamid, případně některá další léčiva. Bohužel účinnost těchto léčiv není ve všech případech dostačující. Tasemnice i ostatní helminti disponují řadou mechanismů, kterými se dokáží vlivu anthelmintik a dalších xenobiotik bránit. Jedním z těchto mechanismů je i biotransformace léčiv prostřednictvím biotransformačních enzymů, v průběhu které může docházet k inaktivaci léčiva. Dalším důležitým mechanismem jsou efluxní transportéry, pomocí kterých může být anthelmintikum nebo jeho inaktivní forma snadno vypuzena z těla ven. Těmito obrannými mechanismy je snižována úspěšnost terapie onemocnění způsobených tasemnicemi (Bártíková et al., 2012).

V rámci této práce bychom rádi objasnili, zda má přítomnost albendazolu, zástupce skupiny benzimidazolů, vliv na aktivitu vybraných enzymů tasemnice kryší (*Hymenolepis diminuta*). Ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů albendazolem (ABZ) jsme sledovali u enzymů s redukční aktivitou, konkrétně u karbonylreduktasy (CBR) a dvou isoformů aldo-ketoreduktasy (AKR1C a AKR1A1). Dále u katalasy (CAT), peroxidasy (Px), superoxid dismutasy (SOD) a thioredoxin-glutathionreduktasy (TGR), u které jsem se zaměřili pouze na její glutathionreduktasovou aktivitu. Tyto čtyři enzymy s primárně antioxidační funkcí se mohou u helmintů podílet na oxidačním metabolismu xenobiotik (Bártíková et al., 2012). Z konjugačních enzymů jsme se zabývali aktivitou glutathion-S-transferasy (GST), UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) a UDP-glukosyltransferasy (UGlcT). Studium vlivu albendazolu na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů bychom rádi přispěli k výše zmíněné problematice nedostatečné účinnosti anthelmintik, potažmo vzniku lékové rezistence u helmintů v souvislosti s aktivitou biotransformačních enzymů.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 *Hymenolepis diminuta*

#### 3.1.1 Obecná charakteristika

Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) je běžný parazit vyskytující se u potkanů, myši a dalších hlodavců po celém světě, vzácně se hostitelem může stát i člověk (Bogitsh et al., 2005). *H. diminuta* je také pro svůj jednoduchý životní cyklus často využívána jako laboratorní model při studiu fyziologie, biochemie, imunologie a zhodnocení efektu anthelmintik u tasemnic (Bártíková et al., 2012).

Dle taxonomie *H. diminuta* náleží do kmene ploštěnců (*Platyhelminthes*), do třídy *Cestoda* a její podtřídy *Eucestoda* neboli pravé tasemnice. Jedinci podtřídy *Eucestoda* jsou vysoce specializováni k parazitickému způsobu života, dospělci jsou endoparazité, žijící v zažívacím traktu obratlovců a larvální stádia se vyskytují u obratlovců i bezobratlých živočichů. *H. diminuta* dále náleží do řádu kruhovok (*Cyclophyllidea*), čeledi *Hymenolepididae* a rodu *Hymenolepis* (Bogitsh et al., 2005; Smrž, 2014).

#### 3.1.2 Popis dospělé tasemnice podtřídy *Eucestoda*

Charakteristickým znakem pro všechny ploštěnce je bilaterální souměrnost organismu. Tělo dospělé tasemnice se skládá ze tří úseků, z hlavy (skolex), krku a vlastního těla tasemnice (strobila) (Bogitsh et al., 2005; Smrž, 2014).

Na hlavové části se nacházejí přísavky, které pomáhají tasemnici s přichycením ke stěně intestinálního traktu hostitele. Rozlišujeme dva základní typy skolexu. První typ, charakteristický pro zástupce řádu *Cyclophyllidea*, se vyznačuje čtyřmi přísavkami uspořádanými v ekvatoriální rovině. Přísavky mohou být dále doprovázeny pomocnými přichytnými strukturami, například háčky, které se ale u *H. diminuta* neobjevují. Druhý typ skolexu se vyznačuje dvěma podélnými štěrbinami, tento typ se odborně nazývá bothrium. Přichycení u obou typů dále napomáhají svalová vlákna skolexu. Morfologie a rozměry skolexu hrají klíčovou roli v identifikaci jedinců (Bogitsh et al., 2005; Smrž, 2014).

Na hlavu tasemnice navazuje krk, je to nečlánkovaný úsek a obvykle nejužší část z celého organismu. Tvoří se zde nové segmenty (proglotidy), které posouvají starší směrem ke konci těla a vzniká tak řetězec proglotid. Tento proces se nazývá strobilace (Bogitsh et al., 2005).

Vzniklému řetězci proglotid říkáme strobila neboli vlastní článkované tělo tasemnice. Dospělci mohou dosáhnout délky těla až 90 cm. Šířka každé proglotidy je větší než její délka. V každé proglotidě se nachází rozmnožovací ústrojí, které se postupně vyvíjí, přičemž rozmnožovací ústrojí proglotid nejbližší krku je vyvinuté nejméně. Podle tohoto postupného vývoje reprodukčních orgánů je strobila dělena na úseky tvořené nezralými, zralými a gravidními proglotidami. U nezralých proglotid jsou reprodukční orgány viditelné, ale nefunkční. Zralé proglotidy mají reprodukční orgány plně funkční. Gravidní proglotidy se nacházejí na konci vlastního článkovaného těla tasemnice a jsou vyplněny vajíčky, reprodukční orgány bývají v gravidních proglotidách často atrofované. K uvolnění vajíčka z terminálních proglotid může dojít dvojím způsobem, buď jsou vyloučena samotná vajíčka přímo do střevního lumen hostitele, anebo dochází k oddělování celých gravidních proglotid od těla tasemnice. Samotná vajíčka nebo celé proglotidy pak opouštějí tělo hostitele společně se střevním obsahem (Bogitsh et al., 2005).

Povrch těla tasemnice se nazývá tegument, jedná se o soubuní. Ochrannou vrstvu tegumentu tvoří vrstva polysacharidů glykokalyx, který parazita chrání před trávicími enzymy hostitele a také zvyšuje absorpci živin. Na celém povrchu těla tasemnice nacházíme specializované mikroklky, které zajišťují lepší přilnutí k epitelu intestinálního traktu hostitele, zvětšují povrch těla a usnadňují odstraňování odpadních produktů. Velikost těchto mikroklků je závislá na umístění na strobile a také na konkrétním druhu tasemnice (Bogitsh et al., 2005).

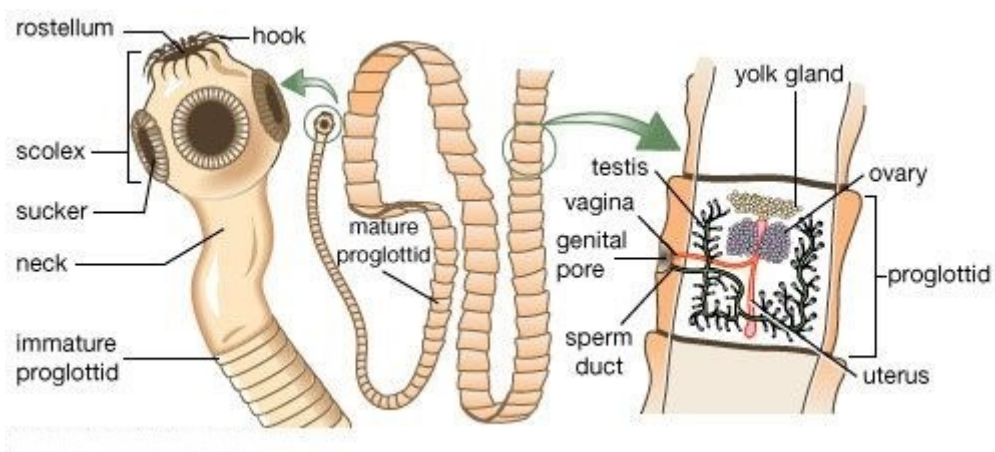
Vylučování odpadních produktů je zajištěno protonefridiemi, které se skládají z plaménkových buněk a sběrných kanálků. Podélné sběrné kanálky jsou čtyři, dva umístěné dorzálně, dva ventrálně a vedou po celé délce strobily. Ventrálně umístěné kanálky jsou na každé proglotidě propojeny novým kanálkem a vedou tekutinu směrem od skolexu, kdežto dorzální kanálky opačným směrem. Ventrální a dorzální kanálky bývají propojeny v oblasti skolexu. U mladších tasemnic ventrální kanálky ústí do vylučovacího měchýřku terminální proglotidy. U starších tasemnic dochází

k vylučování přímo do okolního prostředí, protože původní terminální článek byl odloučen. Plaménkové buňky bývají obvykle uskupeny po čtyřech a jsou přidružené k ventrálním podélným kanálkům (Bogitsh et al., 2005).

Pro tasemnice je charakteristická žebříčkovitá nervová soustava. Skládá se z mozkového ganglia v hlavové části a několika párů podélných nervů po celé délce strobily, které jsou na každé proglotidě spojeny spojovacím nervem. Dále je nervová soustava tvořena kratšími motorickými nervy, které odstupují od podélných nervů a inervují například reprodukční orgány a svalstvo. Senzorické nervy spojují nervovou soustavu s tegumentem. Hojně inervované jsou také přísavky (Bogitsh et al., 2005).

Třída tasemnic postrádá trávicí soustavu, všechny nutrienty jedinci čerpají přímo z tenkého střeva hostitele. Nutrienty prostupují tegumentem prostou i zprostředkovanou difúzí a aktivním transportem. Míra metabolismu je v různých částech těla tasemnice odlišná, odráží se od potřeb konkrétního úseku. Například oblasti krku a nezralých proglotid se vyznačují vysokou mírou metabolických dějů (Bogitsh et al., 2005).

Tasemnice patří mezi hermafrodity, tudíž každá proglotida obsahuje samčí a samičí pohlavní systém (viz **Obr.1**). K oplození může dojít mezi dvěma různými proglotidami jednoho jedince nebo mezi dvěma různými jedinci. Oplození mezi dvěma jedinci je vhodnější z hlediska předcházení vzniku vývojových vad a udržení vitality (Bogitsh et al., 2005).



**Obr. 1** Uspořádání pohlavní soustavy v proglotidě a stavba těla dospělé tasemnice.  
Modifikováno dle: Canacopegd1 (2006)

Samčí rozmnožovací systém je zastoupen jedním nebo i více varlaty (testes) v každé proglotidě. Od každého varlete vedou odvodné žlázy, které se následně modifikují v cirus. Cirus slouží k přenesení samčích pohlavních buněk do jiné proglotidy, kde se uskuteční oplodnění vajíčka. Dále jsou také přítomny semenné váčky, které slouží jako úložný prostor pro spermie (Bogitsh et al., 2005).

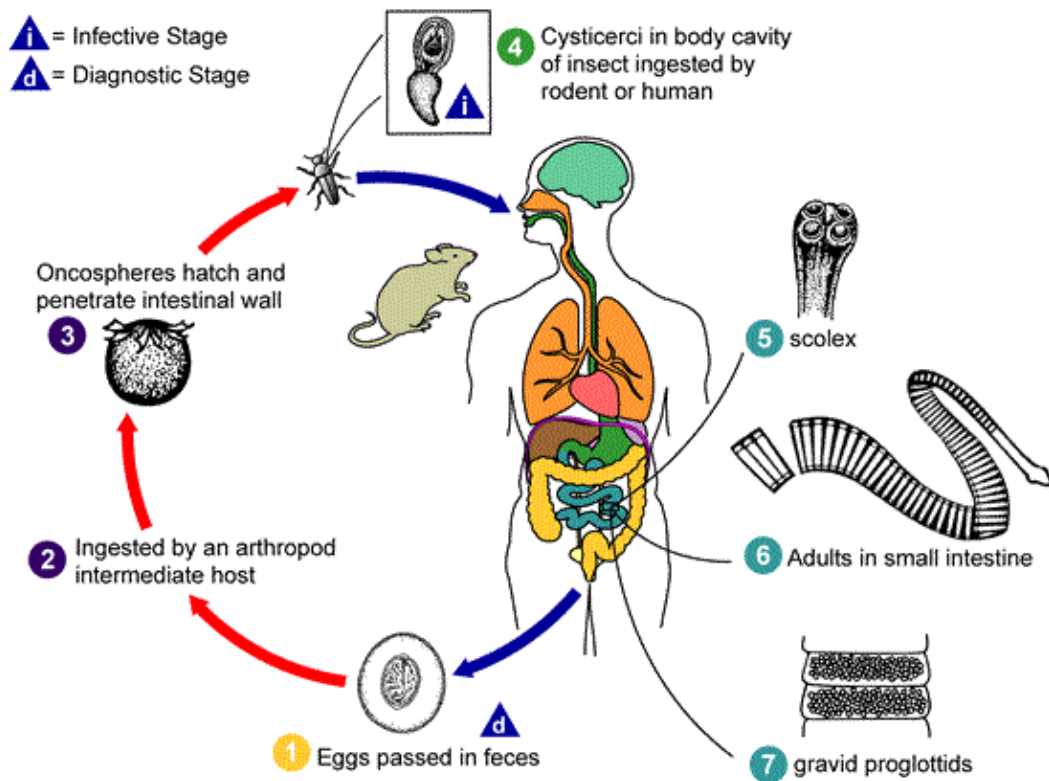
Samičí reprodukční systém je tvořen jedním či dvěma vaječníky, které produkují vajíčka. Na vaječníky navazuje vejcovod, kde dochází ke splynutí samčí a samičí pohlavní buňky za vzniku zygoty. Spermie se do proglotidy dostávají pomocí cirusu skrz genitální otvor. Zygota dále pokračuje do místa, kde se nachází Mehlisova žláza produkující látky potřebné k vytvoření vaječné skořápky a také žlutková žláza produkující živiny a další látky pro vývoj skořápky. Vejcovod vede do dělohy (uterus), kde jsou vyvíjející se vajíčka skladována. Děloha tasemnic řádu *Cyclophyllidea*, kam náleží *H. diminuta*, nemá uterinní otvor, který slouží k vyloučení samotného vajíčka do intestinálního traktu hostitele. U *H. diminuta* dochází po naplnění dělohy vajíčky k odloučení celého gravidní proglotidy (Bogitsh et al., 2005).

### 3.1.3 Životní cyklus

Jak již bylo zmíněno *H. diminuta* patří do řádu *Cyclophyllidea*. Životní cyklus zástupců tohoto řádu je vázán na souš. Jako mezihostitelé pro *H. diminuta* slouží bezobratlí živočichové, nejčastěji brouci z rodů *Tenebrio* a *Tribolium*. Při této práci byl jako mezihostitel použit potěmník moučný (*Tenebrio molitor*). Definitivním hostitelem jsou primárně hlodavci, například běžně se vyskytující potkan obecný (*Rattus norvegicus*), ale může se jím stát i člověk (viz **Obr. 2**) (Bogitsh et al., 2005; Yang et al., 2017).

Gravidní proglotidy vyplněné vajíčky se oddělují od terminálního konce dospělé tasemnice a jsou vylučovány společně s obsahem intestinálního traktu hostitele. K nakažení mezihostitele dochází po pozření takto vyloučeného vajíčka. V trávicím traktu mezihostitele dojde k vylíhnutí vajíčka v larvu (onkosféru). Larva následně pomocí háčků a sekretů z penetrační žlázy projde z trávicího traktu do dutiny zvané hemocoel, kde se vyvine do stádia cysticerkoidu. Cysticerkoid je vybaven plně vyvinutým skolem, který je obklopen několika vrstvami tkáně s háčky na povrchu. Jakmile se infikovaný

mezihostitel dostane do těla hostitele, dojde v tenkém střevě k uvolnění cysticercoidu. Následně dojde k rozrušení vrstev tkáně, které obklopovaly scolex a k přichycení ke stěně tenkého střeva hostitele. Jedinec začíná růst a pohlavně dozrávat. Pohlavně dospělým se stává za 25 dní a životní cyklus se opět uzavírá vylučováním gravidních proglotid, které obsahují vajíčka, ven z těla hostitele (Bogitsh et al., 2005).



**Obr. 2** Životní cyklus *Hymenolepis diminuta*. Modifikováno dle: Centers for Disease Control and Prevention (2017)

### 3.1.4 Hymenolepióza

Hymenolepióza je onemocnění způsobené tasemnicí dětskou (*Hymenolepis nana*) nebo *H. diminuta*. Jedná se o zoonózu, tedy infekci přenosnou ze zvířat na lidi. Vyskytuje se globálně, ale endemickými oblastmi jsou zejména Asie, jižní a východní Evropa, jižní a střední Amerika a Afrika. Příčinou většiny hymenolepióz u člověka je *H. nana*, ale vyskytují se i případy způsobené *H. diminuta*. Pro porovnání *H. nana* byla identifikována



jako příčina hymenolepiózy u více než 175 miliónů případů, oproti tomu *H. diminuta* pouze u několika stovek infekcí (Yang et al., 2017).

Lidé se mohou nakazit pozřením infikovaného potměníka moučného, který se nachází například v cereáliích, obilovinách, sušeném ovoci a dalších podobných potravinách. Nejčastěji se infekce objevuje u dětí. Onemocnění bývá bezpříznakové, nebo se může projevit příznaky jako bolest břicha, průjem, nechutenství, abdominální křeče a svědění kůže (Bogitsh et al., 2005; Karuna and Khadanga, 2013; Yang et al., 2017).

Vajíčka *H. diminuta* mají kulovitý tvar a dvě tenké a hladké membrány. Vajíčka *H. nana* jsou oválná, mají také dvě membrány, přičemž vnitřní membrána má dvě charakteristická silnější místa na pólech. Tyto rozdíly jsou využívány při mikroskopické identifikaci vajíček (Karuna and Khadanga, 2013; Sreedevi et al., 2015).

### 3.1.5 Další onemocnění způsobené tasemnicemi

Mezi další onemocnění způsobené tasemnicemi patří například tenióza, způsobena tasemnicí bezbrannou (*Taenia saginata*) či tasemnicí dlouhočlennou (*Taenia solium*). Mezihostitelem je hovězí dobytek v případě *T. saginata* a vepřový dobytek u *T. solium*. K infikaci mezihostitele dochází po pozření onkosféry, která penetruje skrz stěnu trávicího traktu do svalové tkáně, kde se vyvine v cysticerkoid. K infikaci člověka dochází pozřením nedostatečně tepelně upraveného či syrového masa, které obsahovalo cysticerkoid. Dospělci obou těchto tasemnic parazitují v tenkém střevě člověka, onemocnění je převážně asymptomatické, může se projevit abdominálním dyskomfortem či ztrátou váhy. Pokud dojde u člověka k ingesci onkosféry, může následovat i tvorba larválního stádia v různých oblastech lidského těla, například v podkoží, svalech či centrálním nervovém systému (Bogitsh et al., 2005; Okello and Thomas, 2017).

Hydatidóza neboli echinokokóza také patří mezi onemocnění způsobené tasemnicemi. Onemocnění je způsobeno měchožilem zhoubným (*Echinococcus granulosus*), který způsobuje cystickou echinokokózu, nebo měchožilem bublinatým (*Echinococcus multilocularis*), který způsobuje alveolární echinokokózu. Dospělci těchto tasemnic měří pouze 2 až 8 mm a jedná se o jedny z nejmenších zástupců z třídy tasemnic. Dospělci žijí v tenkém střevě psovitých, příležitostně i kočkovitých šelem.

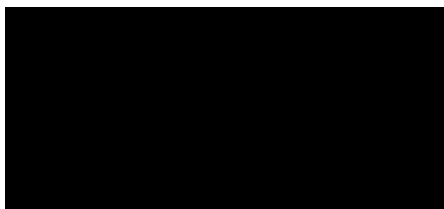
Mezihostitelem *E. granulosus* je obvykle ovce, ale mohou se jím stát i přežvýkavci nebo vepřový dobytek. Mezihostitelem pro *E. multilocularis* jsou hlodavci. Člověk není definitivním hostitelem, ale může figurovat jako mezihostitel. Obvykle se nakazí při kontaktu s infikovaným psem, nebo z potravy kontaminované exkrementy psovíťích šelem. Onkosféra po pozření pronikne skrz stěnu intestinálního traktu člověka a následně vytvoří cystu, nejčastěji v játrech, plicích, svalech, mozku, ledvinách. Cysty rostou velice pomalu, ale mohou způsobit vážné zdravotní problémy (Bogitsh et al., 2005).

## 3.2 Anthelmintika využívaná k terapii cestodóz

Anthelmintika jsou skupinou léčiv pro terapii helmintóz, což jsou infekční choroby způsobené parazitickými červy s výskytem u zvířat i člověka. Tato onemocnění jsou vyvolávány zástupci třech tříd parazitických červů, třídou tasemnice (*Cestoda*), motolice (*Trematoda*) a hlístice (*Nematoda*). Podle účinnosti anthelmintik proti jednotlivým třídám dělíme anthelmintika na antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Mnoho anthelmintik má současně účinky proti více třídám parazitických červů (Lamka and Ducháček, 2014). Mezi anticestoda řadíme zástupce ze skupiny benzimidazolů, niklosamid a prazikvantel (PZQ), kterým je věnována následující část.

### 3.2.1 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazolová anthelmintika (BZD) jsou skupinou široce používaných léčiv ve veterinární i humánní medicíně. V roce 1960 byl objeven thiabendazol, jako první léčivá látka této skupiny (viz **Obr. 3**). Thiabendazol vykazuje aktivitu vůči třídě *Nematoda*, jeho účinek je však poměrně krátkodobý. U člověka dochází k jeho přeměně na 5-hydroxythiabendazol, následně je tento metabolit konjugován s kyselinou glukuronovou a vyloučen z organismu. Z tohoto důvodu byly další látky této skupiny odvozeny substitucí v poloze 5 benzimidazolového jádra. Vznikl tak flubendazol, mebendazol (MBZ) a oxibendazol s aktivitou proti třídám *Nematoda* a *Cestoda*, a dále albendazol (ABZ), fenbendazol a jeho proléčivo febantel, které jsou účinné proti všem třem třídám parazitických červů (Ekman et al., 2014; Hartl et al., 2012; Jaeger and Carvalho-Costa, 2017; Lamka and Ducháček, 2014).



**Obr. 3** Strukturální vzorec thiabendazolu. Převzato z: wikimedia (2009)

Mechanismus účinku BZD spočívá v inhibici polymerace  $\beta$ -tubulinu, který společně s  $\alpha$ -tubulinem tvoří hlavní složku mikrotubulů (Jaeger and Carvalho-Costa, 2017; Rang et al., 2016). Mikrotubuly jsou součástí buněčného cytoskeletu, který se podílí na vnitrobuněčném transportu organel a pomáhá udržet tvar a organizaci buňky (Miloš Langmeier a kolektiv, 2009). Zásah do tvorby mikrotubulů se projeví poškozením funkčnosti celé buňky. Díky vysoké afinitě k parazitárnímu  $\beta$ -tubulinu oproti  $\beta$ -tubulinu buněk hostitelského organismu je zabráněno toxickému účinku na hostitelský organizmus (Jaeger and Carvalho-Costa, 2017; Lamka and Ducháček, 2014). ABZ a MBZ také blokuje příjem glukózy a tvorbu glykogenu a ATP (Hartl et al., 2012).

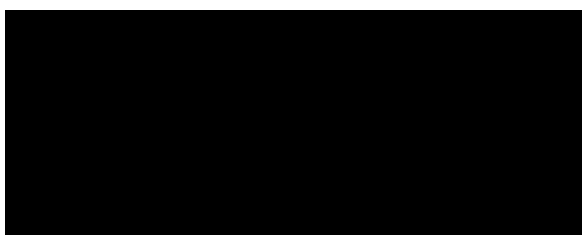
Mezi nežádoucí účinky BZD jsou zařazeny převážně gastrointestinální obtíže, například průjem, nauzea, zvracení a abdominální bolest. U MBZ se dále mohou vyskytnout hypersenzitivní či kožní alergické reakce. Při terapii ABZ se mohou objevit bolesti hlavy, únava, závratě, nespavost, horečka a alopecie. ABZ i MBZ není doporučeno podávat dětem mladším 2 let z důvodu nedostatku zkušeností. Zároveň je doporučeno vyhnout se podávání těchto látek těhotným ženám, na základě prokázání teratogenního účinku MBZ u myši a nedostatku dalších informací o bezpečnosti podávání v těhotenství (Katzung et al., 2012; Rang et al., 2016). U zvířat je kontraindikováno podávání některým laktujícím přežvýkavcům s produkcí pro lidský konzum a také samicím v březosti, z důvodu negativního ovlivnění raných stádií plodu (Lamka and Ducháček, 2014).

V České republice je nyní pro humánní užití registrovaný pouze léčivý přípravek VERMOX 100 mg tableta s účinnou látkou MBZ. Léčivý přípravek s účinnou látkou ABZ u nás v současné době registrovaný není, ale například na Slovensku ano. Jedná se o léčivý přípravek ZENTEL, buď ve formě tablety s obsahem ABZ 400 mg nebo jako perorální suspenze 20 ml/400 mg (SÚKL, 2018; ŠÚKL, 2018).

Pro veterinární užití jsou v České republice aktuálně registrované tři veterinární léčivé přípravky s účinnou látkou ABZ. A to ALBEX 10% perorální suspenze, ALDIFAL perorální suspenze v síle 25 mg/ml a 100 mg/ml a ALDIVERM perorální suspenze 100 mg/ml. Indikační skupinou těchto přípravků jsou ovce a skot. S účinnou látkou MBZ jsou v České republice registrované dva veterinární léčivé přípravky, a to RAFENDAZOL prášek pro aplikaci do krmiva a RAFENDAZOL PREMIX pro medikaci krmiva. Oba dva přípravky jsou určeny pro spárkatou zvěř (ÚSKVBL, 2017).

## Albendazol

ABZ je účinný proti všem třem třídám parazitických červů, proti dospělcům, vývojovým stádiím i vajíčkům (Katzung et al., 2012). Po podání je u savců rychle oxidován na aktivní metabolit ABZ-sulfoxid (ABZ.SO), který je následně v játrech metabolizován na inaktivní formu ABZ-sulfon (ABZ.SO<sub>2</sub>) (Ceballos et al., 2018; Mkupasi et al., 2013). Chemicky se jedná o methyl-*N*-[5-(propylsulfanyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát (viz **Obr. 4**) (Hartl et al., 2012).



**Obr. 4** Strukturní vzorec albendazolu. Převzato z: wikipedia (2011)

Absorpce ABZ z gastrointestinálního traktu je ovlivněna potravou. Zpravidla vyšší absorpce nastává, pokud je ABZ podán společně s jídlem, nejlépe s jídlem obsahujícím vysoký podíl tuků. K nižší absorpci ABZ dochází, pokud je podán nalačno. Tohoto faktu se také využívá při terapii, v závislosti na infekci gastrointestinální či tkáňové (Katzung et al., 2012; Rang et al., 2016).

ABZ je první volbou při terapii lidských onemocnění způsobených měchožilem zhoubným (*E. granulosus*), měchožilem bublinatým (*E. multilocularis*) a tasemnicí dlouhočlennou (*T. solium*), kteří patří do třídy *Cestoda*. Dále je používán k terapii onemocnění způsobených zástupci třídy *Nematoda*, například škrkavkou dětskou (*Ascaris lumbricoides*) nebo měchovcem lidským (*Ancylostoma duodenale*). Uplatňuje se i v terapii onemocnění způsobených zástupci třídy *Trematoda*, například motolicí žlučovou (*Clonorchis sinensis*) (Katzung et al. 2012).

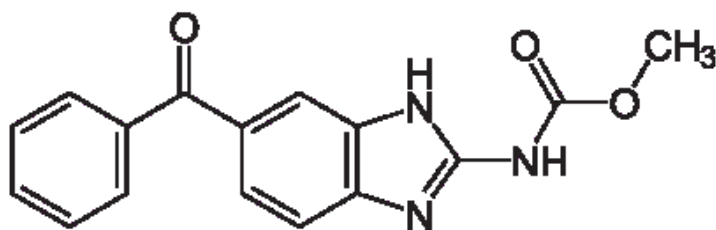
Dávkování ABZ je různé podle toho, o jakou infekci se jedná. Například při léčbě askariózy se podá jediná dávka ABZ 400 mg perorálně, pokud se jedná o těžší infekci lze stejnou dávku podávat 2-3 dny. Oproti tomu v případě echinokokózy je nutné užívat 400 mg ABZ dvakrát denně společně s jídlem po dobu jednoho měsíce nebo i déle

(Katzung et al., 2012). V případě veterinárního užití je doporučena dávka 5-10 mg/kg v závislosti na druhu a konkrétní infekci (Mkupasi et al., 2013).

BZD mohou být metabolizovány také pomocí enzymatického systému některých helmintů (Bártíková et al., 2012). To může snížit účinky terapie a také přispět ke vzniku rezistence helmintů (Vokřál et al., 2013). Konkrétně u *H. diminuta*, která byla pro tuto práci použita, k metabolismu ABZ nedochází. Ale například u tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*, *Cestoda*) nebo vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*, *Nematoda*) byl prokázán vznik oxidovaných metabolitů ABZ. K oxidačnímu metabolismu xenobiotik u helmintů pravděpodobně slouží enzymy s primárně antioxidačními účinky jako je například SOD, CAT, Px. Protože aktivita oxidačního systému cytochromu P450 a také flavinových monooxygenas je u většiny helmintů velice nízká. U *H. contortus* byl také objeven vznik tří konjugovaných metabolitů ABZ s glukózou (Bártíková et al., 2012; Prchal et al., 2014; Vokřál et al., 2013).

## Mebendazol

MBZ, další zástupce skupiny BZD, účinný proti třídám *Cestoda* a *Nematoda*. Chemicky se jedná o methyl-*N*-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)karbamát (viz **Obr. 5**) (Hartl et al., 2012).



**Obr. 5** Strukturní vzorec mebendazolu. Převzato z: wikipedia (2008)

Stejně jako u ABZ je absorpce MBZ vyšší, pokud je podán společně s tučným jídlem. Po vstřebání MBZ podléhá vysokému first pass efektu a je přeměněn na inaktivní molekuly, které jsou následně konjugovány a vyloučeny z těla hostitele (Katzung et al., 2012). Jedním z hlavních metabolitů první fáze biotransformace u savců je amino-MBZ, který vzniká z MBZ hydrolyzou karbamátové skupiny. V menší míře se vyskytuje také

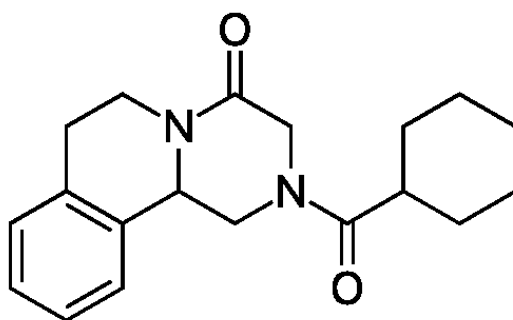
redukovaný MBZ (MBZ-R). Konjugované metabolity MBZ druhé fáze biotransformace bohužel u savců nebyly dostatečně popsány (Matoušková et al., 2016).

Na rozdíl od ABZ je *H. diminuta* schopna MBZ metabolizovat, dochází k redukcí karbonylové skupiny za vzniku MBZ-R (Bártíková et al., 2012). MBZ-R vzniká také například u tasemnice ovčí (*M. expansa*, *Cestoda*) či motolice velké (*Fascioloides magna*, *Trematoda*) (Matoušková et al., 2016; Prchal et al., 2014).

Mezi konkrétní zástupce třídy *Cestoda* citlivé na terapii MBZ patří tasemnice bezbranná (*Taenia saginata*). Dále je MBZ účinný proti zástupcům třídy *Nematoda*, a to například proti roupu dětskému (*Enterobius vermicularis*), svalovci stočenému (*Trichinella spiralis*), škrkavce dětské (*Ascaris lumbricoides*) nebo tenkohlavci lidskému (*Trichuris trichiura*) (Katzung et al., 2012).

### 3.2.2 Prazikvantel

PZQ je anthelmintikum s účinkem proti zástupcům tříd *Cestoda* a *Trematoda*. Chemicky se jedná o (*RS*)-2-cyklohexylkarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4*H*-pyrazino[2,1-*a*]isochinolin-4-on (viz **Obr. 6**) (Hartl et al. 2012).



**Obr. 6** Strukturní vzorec prazikvantelu. Převzato z: wikipedia (2007)

Podstatou mechanismu účinku je vazba na  $\beta$  podjednotku napětově řízeného kanálu pro vápenaté ionty s následným influxem vápenatých iontů a spastickou paralýzou helminta. PZQ také ovlivňuje tegument, kde odkrývá antigeny parazita a tím dává podnět imunitnímu systému hostitele k zahájení obranných mechanismů (Neal, 2015; Rang et

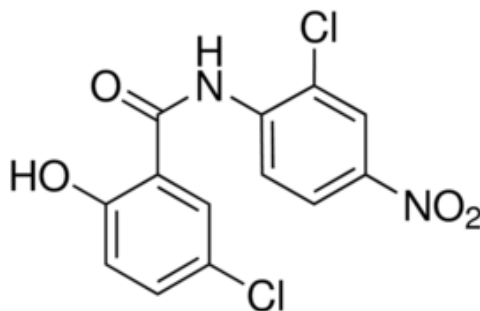
al., 2016). Absorpce PZQ je po perorálním podání vysoká. Metabolickou přeměnou molekuly PZQ vznikají hydroxy-deriváty, které jsou inaktivní. PZQ nemá ovocidní účinky (Katzung et al., 2012).

První volbou je PZQ například u onemocnění způsobených krevničkou střevní (*Schistosoma mansoni*), krevničkou močovou (*Schistosoma haematobium*) či motolicí žlučovou (*Clonorchis sinensis*) jako zástupců třídy *Trematoda*. Dále se používá pro terapii onemocnění způsobených zástupci třídy *Cestoda*, například *H. nana*, tasemnicí bezbrannou (*T. saginata*), škulovcem širokým (*Diphyllobothrium latum*) nebo tasemnicí dlouhočlennou (*T. solium*) (Katzung et al., 2012).

### 3.2.3 Niklosamid

Niklosamid (5-chlor-*N*-(2-chlor-4-nitrofenyl)-2-hydroxybenzamid) (viz **Obr. 7**), je anthelmintikum ze skupiny halogenovaných fenolů. Předpokládá se, že mechanismem účinku je interakce kyselé fenolické skupiny niklosamidu s bazickými skupinami proteinů a následné narušení oxidativní fosforylace helminta. Dále se předpokládá, že niklosamid stimuluje ATPázovou aktivitu parazita. Ke vstřebávání niklosamidu z gastrointestinálního traktu dochází jen ve velmi malé míře (Hartl et al., 2012; Katzung et al., 2012).

Niklosamid vykazuje anthelmintickou aktivitu pouze proti dospělcům tříd *Cestoda* a *Trematoda*. Ze třídy *Cestoda* se jedná o zástupce *T. saginata*, *T. solium*, *Diphyllobothrium latum*, *H. nana* a *H. diminuta*. Mezi citlivé zástupce třídy *Trematoda* řadíme velkou střevní motolicí (*Fasciolopsis buski*) a malou střevní motolicí (*Heterophyes heterophyes*) (Katzung et al., 2012; Rang et al., 2016).



**Obr. 7** Strukturní vzorec niklosamidu. Převzato z: Pan et al. (2012)



### 3.3 Biotransformační enzymy

Každý živý organismus přichází do kontaktu s cizorodými látkami, které pro něho představují potenciaální riziko. Biotransformační enzymy a transportní proteiny jsou jedny ze základních mechanismů, které organismus před tímto potenciaálně škodlivým vlivem chrání. Biotransformační enzymy katalyzují přeměny chemické struktury xenobiotik s cílem omezit distribuci do dalších orgánů či tkání, omezit interakce s biomakromolekulami a usnadnit eliminaci xenobiotika. Transportní proteiny se nacházejí v buněčných membránách a jejich činností jsou xenobiotika nebo jejich metabolity aktivně odstraňována z lumen buňky (Skálová et al., 2011).

Biotransformační reakce xenobiotik probíhají ve dvou fázích, reakce první fáze vedou ke zvýšení polaritě látky. Jedná se o reakce oxidační, redukční, hydrolytické a také o izomerizaci a hydrataci. Vzniklé metabolity se dále konjugují s endogenními látkami, například s kyselinou glukuronovou, glutathionem, aminokyselinami. Z dalších konjugačních reakcí lze zmínit sulfonaci, metylaci a acetylaci. Konjugační reakce tvoří druhou fázi biotransformace xenobiotik. Konjugace vyžaduje dodání energie, proto endogenní látky, které slouží jako konjugační činidla musí být aktivovány vazbou s makroergním kofaktorem (Ledvina et al., 2009; Skálová et al., 2011).

Metabolismus anthelmintik u helmintů se liší nejen od savčího metabolismu, ale jsou také patrné rozdíly mezi jednotlivými třídami a zástupci. Helminti se mohou lišit v zastoupení i aktivitě jednotlivých xenobiotika metabolizujících enzymů. Jako příklad může sloužit vznik odlišných metabolitů po podání flubendazolu. U motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*, *Trematoda*) byl prokázán vznik metabolitu s redukovanou karbonylovou skupinou a dvou různých methyl-konjugátů, které vznikly pravděpodobně činností methyltransferasy. Oproti tomu u vlasovky slezové (*H. contortus*, *Nematoda*) byl prokázán vznik stejného redukováního metabolitu flubendazolu a dále vznik dvou různých konjugátů s glukosou (Matoušková et al., 2016).

Následující část bude zaměřena především na konkrétní biotransformační enzymy, u kterých byl v rámci této práce stanoven vliv ABZ na jejich aktivitu.

### 3.3.1 Reduktasy

O studium redukčních enzymů byl projeven zájem po identifikaci karbonylreduktas, které hrají významnou roli v přeměně některých xenobiotik a endogenních steroidů (Skálová et al., 2011). Reduktasy katalyzují redukční reakce mnoha funkčních skupin, ale dále se budu věnovat pouze reduktasám aldehydů a ketonů, protože do této skupiny náleží reduktasy, které byly v rámci této práce zkoumány. Reduktasy aldehydů a ketonů jsou rozděleny do tří nadrodin. První nadrodinu tvoří aldo-ketoreduktasy (AKR), druhou dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a třetí rodina se skládá z dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) (Skálová et al., 2011).

Nadrodiny SDR a MDR se liší v délce aminokyselinového řetězce. Řetězce SDR jsou složeny přibližně z 250 aminokyselinových zbytků, MDR potom z přibližně 350 aminokyselinových zbytků. Dalším rozdílem je závislost funkce MDR na přítomnosti kovu, protože se jedná o metaloproteiny (Eklund and Ramaswamy, 2008).

Reduktasy hrají u helmintů důležitou roli v metabolismu xenobiotik. U řady zástupců byl prokázán vznik redukovaných metabolitů anthelmintik. Současně byla prokázána indukce těchto enzymů vlivem anthelmintik. Například u *H. contortus* byla zjištěna vyšší aktivita reduktas po vystavení flubendazolu (Matoušková et al., 2016).

#### 3.3.1.1 Aldo-ketoreduktasy

AKR jsou cytosolické enzymy, které katalyzují redukční i oxidační reakce, přičemž převládají reakce redukční. Dochází k redukci karbonylové skupiny na primární či sekundární hydroxylovou skupinu. Pro redukční reakci je nezbytná přítomnost redukovaného kofaktoru NADPH. Spektrum substrátů je velmi široké, zahrnuje jak alifatické, tak aromatické aldehydy i ketony, prostaglandiny, steroidy, monosacharidy a řadu xenobiotik (Mindnich and Penning, 2009; Skálová et al., 2011). Celkově se jedná o více jak 150 enzymů, které pochází z různých organismů (Mindnich and Penning, 2009).

Isoforma 1A1 neboli aldehydreduktasa je jednou z prvních popsáných AKR, vyskytuje se hojně ve všech tkáních a vykazuje nízkou substrátovou specifitu. Katalyzuje

reakce substrátů s negativně nabitým karboxylem, ale také aromatických, steroidních i malých tříuhlíkatých aldehydů (Skálová et al., 2011).

Podrodina AKR1C zahrnuje celkem čtyři enzymy AKR1C1-4, jedná se o hydroxysteroiddehydrogenasy. Enzymy této podrodiny hrají zásadní roli v metabolismu androgenů a estrogenů. Svou činností se mohou mimo jiné podílet i na vzniku a progresi androgen/estrogen – dependentních onemocnění, jako je například benigní hyperplazie prostaty (Mindnich and Penning, 2009; Skálová et al., 2011).

### ***3.3.1.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem***

Nadrodina SDR je nejrozsáhlejší skupinou enzymů s více než 160 000 členy rozdělenými do 47 rodin. Enzymy mají společné strukturní rysy, jako vazebné místo pro kofaktor nebo katalytickou tetradu, ale jinak je jejich celková podobnost nižší než 20-30 %. Pro funkci je nezbytná přítomnost kofaktoru NADPH. V organismu SDR plní převážně fyziologické funkce, ale podílejí se i na metabolismu xenobiotik, kde největší roli hrají karbonylreduktasy (CBR) 1 a 3 (Skálová et al., 2011).

V rámci této práce byla stanovena aktivita CBR pomocí menadionu. Jsou známy dvě isoformy, a to CBR1 (SDR21C1) a CBR3 (SDR21C2), které se liší v substrátové specifitě. Oba tyto enzymy se vyskytují v cytosolu. CBR1 katalyzuje redukce mnoha endogenních i xenobiotických ketonů a chinonů. Z xenobiotických substrátů se jedná konkrétně o p-chinony, kterým je i pro stanovení použitý menadion, a také o-chinony. CBR3 byla objevena později, katalyzuje redukce některých o-chinonů a vykazuje vyšší substrátovou specifitu. Odlišnost v substrátové specifitě je dána rozdílností aktivních míst a vlastností povrchů enzymů (Skálová et al., 2011).

### **3.3.2 Enzymy s antioxidační funkcí**

Většina organismů má vyvinuté antioxidační mechanismy, kterými se brání vůči oxidačnímu stresu. Antioxidační reakce mohou být katalyzované enzymy, nebo mohou probíhat bez přítomnosti enzymů, za využití malých molekul antioxidantů, například kyseliny askorbové či vitamínu E (Huang et al., 2012).

Klíčovou roli v metabolismu xenobiotik i eobiotik hraje u většiny organismů nadrodina hemoproteinů cytochromů P450 (CYP), které katalyzují oxidační a redukční reakce (Skálová et al., 2011). U helmintů není oxidační metabolismus tak rozvinutý jako u ostatních druhů. Aktivita CYP byla prokázána pouze u některých zástupců helmintů, například u larválních stádií *H. contortus* (Laing et al., 2015). Geny pro expresi CYP byly nalezeny i u některých dalších helmintů, mezi které patří také *T. solium* a *E. granulosus*. Přestože je aktivita CYP u většiny helmintů nízká nebo vůbec žádná, byl u nich prokázán vznik oxidovaných metabolitů xenobiotik. Současně byly také u helmintů stanoveny aktivity antioxidantních enzymů, a předpokládá se, že oxidační reakce xenobiotik mohou být katalyzovány právě antioxidantními enzymy. Jako příklad může sloužit *M. expansa*, u které byl objeven oxidovaný metabolit ABZ.SO, byla prokázána aktivita antioxidantních enzymů a zároveň nebyla prokázána žádná aktivita CYP nebo flavinových monooxygenas (Prchal et al., 2014).

### **3.3.2.1 Thioredoxin-glutathionreduktasa**

Většina organismů disponuje dvěma hlavními mechanismy pro udržení redoxní homeostázy a obranu proti oxidačnímu stresu. První z těchto mechanismů je závislý na přeměně redukováného glutathionu (GSH) na oxidovaný glutathion (GSSG), který je následně recyklován pomocí NADPH. U savců je tento mechanismus charakteristický pro enzym glutathionreduktasu (GR). Druhý mechanismus je závislý na přítomnosti thioredoxinu, kofaktoru NADPH a činnosti thioredoxinreduktasy (TxR) (Prast-Nielsen et al., 2011). Tyto enzymy mají různé i zároveň se překrývající funkce, což umožňuje případné zastoupení při dysfunkci jednoho z nich (Bonilla et al., 2008).

Pro ploštěnce je charakteristická thioredoxin-glutathionreduktasa (TGR), která v podstatě spojuje aktivity GR a TxR v jednom enzymu. TGR je složena ze dvou domén, z nichž první má aktivitu glutathionreduktasovou a druhá doména thioredoxinreduktasovou. Na C-konci aminokyselinového řetězce TGR se nachází redoxní centrum se selenocysteinem, na kterém jsou závislé obě aktivity tohoto enzymu (Bonilla et al., 2008). V rámci této práce byla stanovena pouze glutathionreduktasová aktivita enzymu TGR.

### 3.3.2.2 *Katalasa*

Katalasa (CAT) je antioxidační enzym, který se skládá ze čtyř identických podjednotek. Každá z těchto podjednotek je tvořena jedním polypeptidovým řetězcem asociovaným s prostetickou skupinou, kterou je protoporfyrin s navázaným železem tzv. hem (Becker et al., 2007; Pal et al., 2014). Činností CAT je rozkládán peroxid vodíku na molekulu vody a kyslíku. Reakce probíhá jako redoxní přenos dvou elektronů (Dash and Phillips, 2012).

### 3.3.2.3 *Superoxid dismutasa*

Superoxid dismutasa (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidového anionu ( $O_2^-$ ) na peroxid vodíku, tato přeměna se také nazývá dismutace. Mechanismus dismutace zahrnuje redukci a reoxidaci kovu, který se nachází v aktivním místě enzymu (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). V závislosti na kovu, vázaném v aktivním místě enzymu, existují dva různé typy SOD. Prvním typem jsou SOD, které obsahují ve své struktuře zinek a měď. A druhý typ SOD v aktivním místě obsahují mangan a železo. Podle výskytu jsou SOD děleny na cytosolické s označením SOD-1, mitochondriální SOD-2 a extracelulární SOD-3 (Huang et al., 2012). Cytosolické SOD-1 se vyskytuje jako homodimer. Mitochondriální SOD-2 se nachází v matrix ve formě homotetrameru a účastní se dismutace  $O_2^-$ , vzniklého činností dýchacího řetězce. Extracelulární typ SOD-3 se vyskytuje ve formě homotetrameru, a to konkrétně dvou dimerů spojených disulfidickým můstkem (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

### 3.3.2.4 *Peroxidasa*

Peroxidasa (Px) patří k nejvýznamnějším enzymovým antioxidantům. Hlavní funkcí Px je odstranění toxického peroxidu vodíku či jiných organických hydroperoxidů (Skálová et al., 2011). Dále je Px schopna katalyzovat oxidační reakce xenobiotik, tyto reakce probíhají v přítomnosti peroxidu vodíku, který zde slouží jako elektronový akceptor (Falade et al., 2017).

Přítomnost Px byla prokázána u různých druhů organismů. Jedná se o hemoproteiny, které ve své struktuře obsahují jako prostetickou skupinu protoporfyrin IX (Falade et al., 2017; Skálová et al., 2011). Vyskytují se v monomerní, dimerní a tetramerní formě. Různé isoformy Px mají odlišnou specifitu k jednotlivým substrátům, liší se v celkové kinetice redoxní reakce a sdílí podobné strukturní a funkční rysy (Khan et al., 2014).

### 3.3.3 Konjugační enzymy

Konjugační enzymy katalyzují konjugační reakce metabolitů vzniklých reakcemi první fáze biotransformace s endogenními molekulami. Produktem reakcí jsou konjugáty, které jsou více hydrofilní, snadněji eliminovatelné, méně toxické a také mají nižší biologickou aktivitu. Konjugační reakce katalyzují transferasy, které se nejčastěji vyskytují v cytosolu a mikrosomech. Hydrofilní vlastnosti konjugátů značně omezují možnost pasivní difúze, proto jsou pro přenos konjugátů ven z buňky nezbytné transportní membránové proteiny. Aktivitou a afinitou těchto transportních proteinů je ovlivněna rychlost eliminace konjugátů. Konjugačním reakcím kromě xenobiotik podléhají také endogenní molekuly s výraznou biologickou aktivitou, mezi které patří například hormony, cholesterol a žlučové kyseliny (Skálová et al., 2011).

Konjugačních reakcí je známo několik typů. O tom, která konjugační reakce bude u dané sloučeniny probíhat rozhoduje její struktura, zejména přítomnost funkčních skupin a také prostorové uspořádání a elektronové vlastnosti. Xenobiotikum často podléhá více typům konjugačních reakcí. Koncentrace vzniklých konjugátů se mnohou měnit v závislosti na koncentraci xenobiotika, kapacitě konjugačního enzymu a afinitě k danému substrátu. U jednotlivých druhů organismů existují velké rozdíly v zastoupení i aktivitě jednotlivých konjugačních enzymů, proto se můžeme u různých organismů setkat s různými konjugáty téhož xenobiotika (Skálová et al., 2011).

### 3.3.3.1 *Glutathion-S-transferasa*

Glutathion-S-transferasy (GST) katalyzují konjugační reakce substrátů s redukovaným glutathionem (GSH). GST jsou rozděleny do tří nadrodin, podle toho, zda se enzymy nacházejí v cytosolu, mikrosomech či mitochondriích. Největší je nadrodina cytosolická (Hollman et al., 2016). GST jsou dimerní enzymy, mohou být homodimerní i heterodimerní. Každá podjednotka obsahuje místo na N-konci aminokyselinového řetězce, kde je navázán GSH a na C-konci místo, kam se váže substrát (Dong et al., 2016). GSH je v organismu syntetizován z aminokyselin glycinu, glutamátu a cysteinu ve dvou po sobě jdoucích reakcích (Skálová et al., 2011).

U helmintů jsou GST velmi důležitými enzymy, účastní se detoxifikačních reakcí, zejména metabolismu lipidových hydroperoxidů a reaktivních karbonylových sloučenin vzniklých oxidačním stresem. GST helmintů jsou schopné vázat široké spektrum xenobiotik, včetně anthelmintik. Dosud však u helmintů nebyl prokázán vznik konjugovaných metabolitů anthelmintik s glutathionem. Proto mohou GST u helmintů sloužit spíše jako proteiny vázající xenobiotika než metabolizující enzymy. Schopnost GST vázat anthelmintika může přispět ke snížení účinku na základě pasivní detoxifikace (Brophy and Barrett, 1990; Matoušková et al., 2016).

### 3.3.3.2 *UDP-glykosyltransferasy*

Enzymy nadrodiny UDP-glykosyltransferas byly nalezeny u všech žijících organismů, včetně rostlin, bakterií a virů. Katalyzují konjugaci glykosylu se substrátem reakce. Jako konjugační činidlo mohou sloužit různé aktivované monosacharidy, například UDP-galaktosa, UDP-glukosa, UDP-glukuronová kyselina nebo UDP-xylosa. Konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou je velice častá u savců. UDP-glukosa je potom častěji využívána pro konjugační reakce u rostlin a hmyzu (Huang et al., 2008).

Konjugační reakce s UDP-glukosou jsou charakteristické také pro helminty (*Nematoda*). Jeví se jako exkluzivní deaktivující cesta benzimidazolových anthelmintik, která je také spojována se vznikem rezistence u helmintů v souvislosti s indukcí těchto enzymů. Důkazem může být prokázáný vznik většího množství konjugovaných

metabolitů ABZ a flubendazolu s glukosou u rezistentního kmene *H. contortus*, oproti kmeni citlivému (Matoušková et al., 2016).

V rámci této práce jsme se zaměřili na aktivitu UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), pro kterou jako konjugační činidlo slouží UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA). A také na aktivitu UDP-glukosyltransferasy (UGlcT), která katalyzuje konjugační reakce substrátu s UDP-glukosou (UDP-Glc).

Reakce, které katalyzují UGT se také nazývají glukuronidace a jsou hlavní metabolickou cestu druhé fáze biotransformace, substrátem mohou být endogenní látky i xenobiotika (Knights et al., 2013). Mezi endogenní látky, které se konjugují s kyselinou glukuronovou patří například bilirubin a estradiol (Hong et al., 2017).

UDP-GA vzniká oxidací UDP-Glc, tato reakce je katalyzovaná enzymem UDP-glukosadehydrogenasou a probíhá v cytosolu. Následně dochází k transportu UDP-GA do endoplazmatického retikula, protože UGT jsou membránové enzymy hladkého endoplasmatického retikula orientované do lumen. Transport probíhá pravděpodobně jako antiport s UDP. Pro činnost systému je dále potřebný transportér konjugátu z lumen endoplasmatického retikula do cytosolu (Skálová et al., 2011). Kyselina glukuronová se v substrátu váže na atom kyslíku, dusíku nebo síry (Fujiwara et al., 2018). Nadrodina enzymů UGT je členěna celkem do čtyř rodin, z nichž se enzymy rodiny UGT1 a UGT2 primárně účastní metabolismu xenobiotik a rodiny UGT3 a UGT8 zahrnují enzymy, které katalyzují glukuronidaci endogenních substrátů (Fujiwara et al., 2018).



## 4 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je objasnění vlivu albendazolu na aktivitu vybraných enzymů tasemnice krysí (*H. diminuta*).

Dalším cílem této práce je porovnání aktivit enzymů dvou různých kontrolních skupin a na základě těchto informací určit, zda měla inkubace v samotném inkubačním médiu vliv na aktivitu enzymů *H. diminuta*.

Dílčí cíle potřebné k celkovému vyhodnocení jsou:

1. Stanovení specifické aktivity vybraných biotransformačních enzymů v cytosolické, mikrosomální a mitochondriální frakci u:
  - a) kontrolní skupiny (K), která byla připravena z tasemnic po inkubaci v samotném inkubačním médiu
  - b) skupiny vzorků (ABZ1), připravené z tasemnic inkubovaných s 1  $\mu\text{M}$  ABZ
  - c) skupiny vzorků (ABZ10), připravené z tasemnic inkubovaných s 10  $\mu\text{M}$  ABZ
  - d) kontrolní skupiny (KOH), která byla připravena z tasemnic ihned po izolaci z tenkého střeva laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*).
2. Porovnat výsledné specifické aktivity enzymů kontrolní skupiny (K) s aktivitami naměřenými u skupin ABZ1 a ABZ10. A zjistit, zda má ABZ vliv na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů *H. diminuta*.
3. Dále porovnat aktivity kontrolní skupiny (K) a kontrolní skupiny (KOH). A zjistit, zda měla 24 hodinová inkubace v samotném inkubačním médiu vliv na aktivitu vybraných biotransformačních enzymů *H. diminuta*.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Chemikálie

acenaftenol – Sigma-Aldrich  
albendazol – Sigma-Aldrich  
amoniak – Sigma-Aldrich  
anilin – Sigma-Aldrich  
BCA set roztoků – Thermo SCIENTIFIC  
bovine serum albumin (BSA) – Thermo SCIENTIFIC  
dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich  
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma-Aldrich  
fetal bovine serum (FBS) - Sigma-Aldrich  
glutathion oxidovaný (GSSG) – Koch Light Laboratories  
glutathion redukovaný (GSH) – Sigma-Aldrich  
glycerol – Dr. Kulich pharma  
HCl – Penta  
H<sub>2</sub>O  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Penta  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Penta  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Penta  
menadion – Sigma-Aldrich  
MgCl<sub>2</sub> – Sigma-Aldrich  
molybdenan amonný – Lachema  
NADP – Serva  
NADPH – Merck  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O - Penta  
NaOH – Lach: Ner  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – Penta  
penicilin/streptomycin (PEN/STREP) - Sigma-Aldrich  
phosphate buffered saline (PBS) - Sigma-Aldrich  
pyrokatechol – Lachema

p-nitrofenol – Fluka  
RPMI 1640 R8758 médium - Sigma-Aldrich  
slovasol - Slovchema  
SOD Assay Kit – Sigma-Aldrich  
trichloroctová kyselina (TCA) – Sigma-Aldrich  
TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan) – Penta  
UDP-glukóza (UDP-Glc) – Sigma-Aldrich  
UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA) – Sigma-Aldrich  
1-chlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) – Fluka  
2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (HEPES) - Sigma-Aldrich  
4-pyridinkarboxaldehyd – Sigma-Aldrich

### **5.1.2 Přístroje a pomůcky**

analytické váhy SCALTEC  
automatické pipety BIOHIT a Finnpiquette různých objemů  
centrifuga Heraeus Biofuge Stratos  
centrifugační květy  
laboratorní nádobí (kádinky, Petriho misky, lahve a další)  
magnetická míchačka IKA Color squid  
mikrotitrační destičky GAMA a GREINER  
mikrozkumavky Eppendorf (5,0 ml)  
mikrozkumavky Eppendorf Safe-Lock (0,5; 1,5; 2,0 ml)  
mrazicí box JOUAN VXE SERIES – Thermo SCIENTIFIC  
mrazicí box Trigon plus  
MS2 Minishaker IKA  
multikanálová automatická pipeta  
nádoby na led  
pH metr inoLab  
PLATE FUGE microplate microcentrifuge – Benchmark Scientific  
Potter S homogenizátor 30 ml s pístem – B. Braun Biotech International  
přístroj na destilaci vody Elix M Progard TNP2 – Merck Millipore  
špičky na pipety epT.I.P.S. Standard (50 - 1000µl)

špičky na pipety NEPTUNE (2100.Y 200 $\mu$ l a 2110.B 1000 $\mu$ l)  
špičky na pipety Sartorius Biohit A (0,1 - 10 $\mu$ l) - Fisher Scientific  
TECAN infinite M200PRO (NanoQuant)  
Thermomixer comfort - eppendorf  
ultracentrifuga AVANTI J-30I – Beckman Coulter  
ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex  
váhy KERN K8

### 5.1.3 Biologický materiál

potemník moučný (*Tenebrio molitor*)  
potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*), 6 jedinců  
tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*), 45 jedinců

Pro experiment byli použiti potkani kmene Wistar samčího pohlaví o hmotností 120-150 g, kteří byli dovezeni z firmy Velaz s.r.o.. Následně byli ponecháni tři týdny v aklimatizaci a poté proběhla infekce cysticerkoidy. V době infekce byla hmotnost potkanů přibližně 250 g a v době izolace dospělých tasemnic od 350 g do 410 g. Chování byli za standardních podmínek daných vyhláškou č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Strava a voda ad libitum.

## 5.2 Metodika práce

Praktická část této práce byla realizována na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové v časovém rozmezí od 15. 3. 2016 do 15. 9. 2017. Veškeré experimenty byly provedeny v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů a pod dohledem lokální Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### 5.2.1 Izolace jedinců tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) z laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*)

Pro experiment bylo použito 6 jedinců laboratorního potkana (*R. norvegicus*), z nichž každý byl infikován pomocí gastrointestinální sondy 12 cysticerkoidy tasemnice krysí (*H. diminuta*). Cysticerkoidy byly získány z dospělců potměníka moučného (*T. molitor*). Infikovaní jedinci *R. norvegicus* byli chováni po dobu 7 týdnů za standardních laboratorních podmínek. V průběhu této doby byla dvakrát provedena kontrola potkaního trusu. Nejprve u směsného vzorku a poté u každého z potkanů jednotlivě, v obou případech byly v trusu nalezeny vajíčka *H. diminuta*, kontroly tedy byly pozitivní. Následně bylo provedeno usmrcení všech potkanů (etherová anestezie, dislokace krční páteře a následné vykrvení). Z tenkého střeva byli izolováni dospělci tasemnice krysí, kteří byli omyti třikrát v nesterilním roztoku PBS (37 °C) a poté ve sterilním roztoku PBS s PEN/STREP. Celkem bylo izolováno 53 jedinců, ale pro experiment bylo použito jen 45 tasemnic krysích. Zbylých 8 bylo nestandardních (malá velikost), izolovaných ze stejného potkana, a proto jsme se rozhodli je v experimentu nepoužít.

### 5.2.2 Inkubace tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) s albendazolem

Po izolaci a omytí bylo ihned před inkubací 10 jedinců tasemnice krysí zmrazeno (-80 °C), tato skupina byla označena jako KOH (kontrola v čase  $t = 0$  h). Stanovené aktivity enzymů této kontrolní skupiny byly následně porovnány s aktivitami enzymů druhé kontrolní skupiny. Porovnáním výsledků těchto dvou kontrolních skupin

byl ověřen případný vliv inkubace v samotném inkubačním médiu na aktivitu vybraných enzymů.

Inkubováno bylo tedy celkem 35 tasemnic, které byly náhodně rozděleny do pěti různých skupin. Z nichž první byla tvořena 10 tasemnicemi, které byly inkubovány bez přidání léčiva. Tato skupina nese označení K (kontrola v čase  $t = 24$  h) a jedná se druhou kontrolní skupinu, ke které byly následně vztaženy aktivity enzymů ostatních zkoumaných skupin. Další skupina s označením ABZ1 byla tvořena 6 tasemnicemi, které byly inkubovány s ABZ ( $1\mu\text{M}$ ). Poslední skupina označena ABZ10 byla tvořena 7 tasemnicemi inkubovanými s ABZ ( $10\mu\text{M}$ ). Zbýlých 12 tasemnic bylo využito ke stanovení vlivu mebendazolu na aktivitu vybraných enzymů v rámci jiné diplomové práce.

Inkubace každé tasemnice probíhala individuálně v inkubační lahvi. Inkubace probíhala v  $\text{CO}_2$  inkubátoru po dobu 24 hodin ( $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5 %). Jako inkubační médium bylo u všech skupin použito 20 ml RPMI 1640 R8758 obohacené o 2,5 ml PEN/STREP (10 000 jednotek PEN/ 10 mg STREP v 1 ml), 5 % FBS a 10 ml HEPES (1 M). Experiment byl odstartován přidáním 20  $\mu\text{l}$  DMSO v případě kontrolní skupiny či 20  $\mu\text{l}$  roztoku ABZ v DMSO o koncentraci 1 mM nebo 10 mM. V průběhu inkubace byl přidáván k inkubačnímu médiu vodný roztok amoniaku, aby bylo zajištěno stabilní pH. Po uplynutí 24 hodin byla inkubace ukončena, tasemnice byly omyty v PBS, zváženy a zamrazeny ( $-80^\circ\text{C}$ ). Z kontrolní skupiny (K) byly vyřazeny dvě nestandardní tasemnice, které přestaly jevit po uplynutí doby inkubace motilitu.

### **5.2.3 Příprava subcelulárních frakcí z tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)**

#### Použité zásobní roztoky:

0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 7,4 (připraven postupným sléváním 1 000 ml 0,1 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a 250 ml 0,1 M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do požadované hodnoty pH 7,4)

Na-fosfátový pufr s 20% (v/v) glycerolem (připraven smísením glycerolu a 0,1 M Na-fosfátového pufru v poměru 1:4)

V chladicí místnosti byl připraven sudý počet vzorků tasemnic. Jednotlivé vzorky byly dány do mechanického homogenizátoru s 15 ml Na-fosfátového pufru a homogenizovány. Homogenizované vzorky byly přelity do centrifugačních kyvet. Píst i homogenizátor byly opláchnuty 15 ml Na-fosfátového pufru, který byl poté přidán do centrifugačních kyvet.

Kyvety byly následně centrifugovány pomocí centrifugy Heraeus (rotor #3335) po dobu 20 minut při 4 °C na 5000 g (1. točení). Peleta obsahující potrhane buněčné membrány, vaziva, cévy a jádra byla odstraněna. Supernatant byl přelit do čistých kyvet a stočen ve stejném rotoru na 20 000 g po dobu 60 minut při 4 °C. Supernatant, který vznikl druhým točením, byl opatrně (aby nedošlo ke znečištění kaly) přelit do kyvety pro ultracentrifugu Beckman. Kyvety byly naplněny maximálně do tří čtvrtin, byly přesně vyváženy a vloženy do rotoru proti sobě. Třetí centrifugace probíhala po dobu 60 minut na 105 000 g při 4 °C.

V peletě z druhého točení jsou obsaženy mitochondrie, pro jejich získání byly odstraněny kaly a peleta byla resuspendována v 5 ml Na-fosfátového pufru pomocí skleněné tyčinky. Dále bylo množství pelety v kyvetě doplněno stejným pufrem tak, aby hladina byla přibližně 2 cm pod horním okrajem. Kyvety byly znovu stočeny na 20 000 g po dobu 60 minut při 4 °C (4. točení). Supernatant s ostatními buněčnými elementy byl odstraněn a peleta byla resuspendována v pufru s 20% glycerolem v takovém množství, které odpovídá hmotnosti původního vzorku. Vzniklá mitochondriální frakce byla za stálého míchání rozpipetována po 330  $\mu$ l do mikrozkušavek Eppendorf o objemu 0,5 ml.

Supernatant ze třetího točení je frakcí cytosolu, která byla za stálého míchání rozpipetována po 1100  $\mu$ l do mikrozkušavek Eppendorf o objemu 1,5 ml. Peleta za třetího točení byla resuspendována v 5 ml pufru pomocí malého homogenizačního pístu, přelita do kyvet a odstředěna v Beckmanově ultracentrifuze (5. točení). Vzniklý supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán pufr s 20% glycerolem v množství odpovídajícím původní hmotnosti tasemnic. Takto získaná mikrosomální frakce byla zhomogenizována a za stálého míchání rozpipetována do mikrozkušavek o objemu 0,5 ml po 330  $\mu$ l.

Všechny frakce byly ihned po rozpipetování uloženy do hlubokomrazicího boxu a uchovávány při teplotě -80 °C.

#### 5.2.4 Stanovení aktivit vybraných enzymů *Hymenolepis diminuta*

Jednotlivá stanovení aktivity vybraných enzymů byla provedena vždy minimálně třikrát. Z výsledných aktivit těchto jednotlivých stanovení byly následně vypočteny průměrné hodnoty. Jedinou výjimku tvoří skupina vzorků ABZ10 u mikrosomální frakce, kdy byla aktivita enzymů AKR1A1, UGT a UGlcT stanovena pouze dvakrát z důvodu nedostatku vzorku.

Stanovené aktivity enzymů jsou vyjádřeny v jednotkách [nmol/min/ml], případně v jednotkách [ $\mu$ mol/min/ml] u enzymu CAT. Následně byly tyto aktivity vztaženy na množství proteinů v příslušném vzorku a tím byly určeny hodnoty specifických aktivit v jednotkách [nmol/min/mg], případně [ $\mu$ mol/min/mg] u CAT.

##### 5.2.4.1 Stanovení aktivity karbonylreduktasy pomocí menadionu

###### Princip metody:

Metoda je založena na inkubaci subcelulárních frakcí se substrátem menadionem. Redukce menadionu CBR je doprovázena oxidací NADPH, což je spektrofotometricky zaznamenáno jako pokles absorbance. Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH lze kvantitativně vyjádřit aktivitu CBR.

###### Použité zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,4 (připraven z roztoků  $K_2HPO_4$  a  $KH_2PO_4$ )

8,71 g  $K_2HPO_4$  do 500 ml redestilované vody

2,72 g  $KH_2PO_4$  do 200 ml redestilované vody

50 mM menadion (8,61 mg menadionu v 1 ml ethanolu)

5 mM NADPH (6,25 mg NADPH v 1,5 ml redestilované vody)

Na-fosfátový pufr, pH 7,4

###### Postup:

Do jamek GAMA destičky napipetovat 10  $\mu$ l subcelulárních frakcí nebo 10  $\mu$ l Na-fosfátového pufru o pH 7,4 v případě slepého vzorku a preinkubovat 5 minut



při 37 °C. Dále do každé jamky napipetovat 190 µl Master mixu multikanálovou pipetou. Master mix byl připraven z následujících roztoků v objemu potřebném na jednu destičku tak, aby do každé jamky přišlo 178 µl K-fosfátového pufru, 2 µl menadionu a 10 µl NADPH. Destičku vložit do TECANU, který byl předem nastaven na 37 °C. Při této teplotě probíhalo spektrofotometrické měření poklesu absorbance při 340 nm po dobu 10 minut. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 8 paralelních vzorků od každé frakce.

Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs}$$

$Avz$  = absorbance vzorku

$Asl$  = absorbance slepého vzorku

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

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,75 cm)

$Vi$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$Vs$  = objem biologické frakce (tj. 0,010 ml)

#### **5.2.4.2 Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1A1 pomocí 4-pyridinkarboxaldehydu**

Princip metody:

Metoda je založena na inkubaci subcelulárních frakcí se substrátem 4-pyridinkarboxaldehydem. Redukce substrátu AKR1A1 je doprovázena oxidací NADPH, což je spektrofotometricky zaznamenáno jako pokles absorbance. Pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH lze kvantitativně vyjádřit aktivitu AKR1A1.

Použité zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr, pH 6,0 (připraven z roztoků 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
a 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

0,1 M 4-pyridinkarboxaldehyd (1,9 µl 4-pyridinkarboxaldehydu

v 138,12  $\mu\text{l}$  redestilované vody)  
2 mM NADPH (1,60 mg NADPH v 959,92  $\mu\text{l}$  redestilované vody)  
Na-fosfátový pufr, pH 7,4

Postup:

Do jamek GAMA destičky napipetovat 10  $\mu\text{l}$  subcelulárních frakcí nebo 10  $\mu\text{l}$  Na-fosfátového pufru o pH 7,4 v případě slepého vzorku. Dále do každé jamky napipetovat 190  $\mu\text{l}$  Master mixu multikanálovou pipetou. Master mix byl připraven z následujících roztoků v objemu potřebném na jednu destičku tak, aby do každé jamky přišlo 178  $\mu\text{l}$  K-fosfátového pufru, 2  $\mu\text{l}$  4-pyridinkarboxaldehydu a 10  $\mu\text{l}$  NADPH. Destičku vložit do TECANU, který byl předem nastaven na 37 °C. Spektrofotometricky byl zaznamenáván pokles absorbance při 340 nm po dobu 10 minut. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 8 paralelních vzorků od každé frakce.

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * V_i * 1000}{\epsilon * l * V_s}$$

$A_{vz}$  = absorbance vzorku

$A_{sl}$  = absorbance slepého vzorku

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

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,75 cm)

$V_i$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$V_s$  = objem biologické frakce (tj. 0,010 ml)

### 5.2.4.3 Stanovení aktivity aldoketoreduktasy AKR1C pomocí acenaftenolu

Princip metody:

Metoda je založena na inkubaci subcelulárních frakcí se substrátem acenaftenolem. Spektrofotometricky je zaznamenán vzrůst absorbance, který je způsoben redukcí  $\text{NADP}^+$  na NADPH za současné oxidace substrátu. Pomocí vzrůstu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH lze kvantitativně vyjádřit aktivitu AKR1C.

#### Použité zásobní roztoky:

0,1 M TRIS/HCl pufr, pH 8,9 (1,21 g TRIS v 70 ml redestilované vody, úprava pH na hodnotu 8,9 a doplnit na 100 ml)

0,1 M acenaftenol (17,02 mg acenaftenolu v 1 ml DMSO)

20 mM NADP<sup>+</sup> (23,6 mg NADP<sup>+</sup> v 1,5 ml redestilované vody)

Na-fosfátový pufr, pH 7,4

#### Postup:

Do jamek GAMA destičky napipetovat 10 µl subcelulárních frakcí nebo 10 µl Na-fosfátového pufru o pH 7,4 v případě slepého vzorku. Dále do každé jamky napipetovat 190 µl Master mixu multikanálovou pipetou. Master mix byl připraven z následujících roztoků v objemu potřebném na jednu destičku tak, aby do každé jamky přišlo 178 µl TRIS/HCl pufru, 2 µl acenaftenolu a 10 µl NADP<sup>+</sup>. Destičku vložit do TECANU, který byl předem nastaven na 37 °C. Spektrofotometricky byl zaznamenáván vzrůst absorbance při 340 nm po dobu 10 minut. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 8 paralelních vzorků od každé frakce.

#### Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) * V_i * 1000}{\epsilon * l * V_s}$$

$A_{vz}$  = absorbance vzorku

$A_{sl}$  = absorbance slepého vzorku

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

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,75 cm)

$V_i$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$V_s$  = objem biologické frakce (tj. 0,010 ml)

#### **5.2.4.4 Stanovení glutathionreduktasové aktivity**

#### Princip metody:

Metoda stanovení glutathionreduktasové aktivity enzymu TGR je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH)

za současné oxidace NADPH. Spektrofotometricky je zaznamenán pokles absorbance úměrný spotřebě NADPH, pomocí toho poklesu a molárního absorpčního koeficientu NADPH lze kvantitativně vyjádřit glutathionreduktasovou aktivitu TGR.

Použité zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7,0 (připraven z roztoků  $K_2HPO_4$  (17,42 mg/ml)

a  $KH_2PO_4$  (13,61 mg/ml) přibližně v poměru 5:2)

5 mM EDTA (1,86 mg EDTA v 1 ml redestilované vody)

2,5 mM NADPH (2,08 mg NADPH v 1 ml redestilované vody)

4 mM GSSG (2,45 mg GSSG v 1 ml redestilované vody)

Na-fosfátový pufr, pH 7,4

Postup:

Glutathionreduktasová aktivita byla stanovena dvěma způsoby, prvním za použití neředěné frakce a druhým, kdy frakce byla naředěna pětkrát Na-fosfátovým pufrem o pH 7,4. Do jamek GAMA destičky napipetovat 50  $\mu$ l frakce (ředěné či neředěné) nebo 50  $\mu$ l Na-fosfátového pufru v případě slepého vzorku. Dále do každé jamky napipetovat 150  $\mu$ l Master mixu multikanálovou pipetou. Master mix byl připraven z následujících roztoků v objemu potřebném na jednu destičku tak, aby do každé jamky přišlo 50  $\mu$ l K-fosfátového pufru, 40  $\mu$ l EDTA, 50  $\mu$ l GSSG a 10  $\mu$ l NADPH. Destičku vložit do TECANU, který byl předem nastaven na 37 °C. Spektrofotometricky byl zaznamenáván úbytek absorbance při 340 nm po dobu 6 minut. V rámci jednoho stanovení byly vždy změřeny 4 paralelní vzorky od každé ředěné frakce a 4 paralelní vzorky od každé neředěné frakce.

Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs} * zř$$

$Avz$  = absorbance vzorku

$Asl$  = absorbance slepého vzorku

$\epsilon_{NADPH}$  = 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,75 cm)

$Vi$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$Vs$  = objem biologické frakce (tj. 0,050 ml nebo 0,01 ml v závislosti na ředění frakce)

zř = zředění (tj. 5 v případě cytosolických frakcí, které byly před stanovením naředěny a 1 u všech zbylých frakcí)

#### 5.2.4.5 Stanovení aktivity katalasy pomocí molybdenanu amonného

##### Princip metody:

Metoda stanovení aktivity CAT je založena na tvorbě žlutého komplexu molybdenanu amonného s peroxidem vodíku. Spektrofotometricky je zaznamenána absorbance tohoto komplexu, aktivita CAT je stanovena pomocí změřené absorbance vzorku a tří různých slepých vzorků.

##### Použité zásobní roztoky:

60 mM Na-K fosfátový pufr, pH 7,4 (připraven smísením roztoků  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

10,74 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  v 500 ml redestilované vody

4,08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 500 ml redestilované vody

6,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (14,78  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  v 20 ml Na-K fosfátového pufru)

32,4 mM molybdenan amonný (0,8 g molybdenanu amonného ve 20 ml redestilované vody)

##### Postup:

Pro stanovení aktivity CAT byly využity tři různé slepé vzorky s označením blank 1 (BL1), blank 2 (BL2) a blank 3 (BL3). Jednotlivé subcelulární frakce byly naředěny desetkrát Na-K fosfátovým pufr. Postup pipetování do mikrotitrační destičky GAMA je uveden v **Tab. 1**.

**Tab. 1** Postup pipetování roztoků do mikrotitrační destičky při stanovení aktivity katalasy.

	BL1	vzorek	BL2	BL3
1.	100 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	100 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	100 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	100 $\mu\text{l}$ pufru
2.	100 $\mu\text{l}$ molybd.	20 $\mu\text{l}$ frakce	20 $\mu\text{l}$ pufru	20 $\mu\text{l}$ pufru
3.	/	100 $\mu\text{l}$ molybd.	100 $\mu\text{l}$ molybd.	100 $\mu\text{l}$ molybd.
4.	20 $\mu\text{l}$ frakce	/	/	/

Po napipetování roztoků dle druhého kroku byla destička 1 minutu inkubována při 37 °C. Dále byl do jamek přidán molybdenan amonný dle třetího kroku (viz **Tab. 1**) a poté se nechala destička 1 minutu stát. Následně byla napipetována frakce do BL1 a byla změřena absorbance při 405 nm na TECANU. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 8 paralelních vzorků od každé frakce, stejně tak 8 paralelních vzorků BL2 a BL3, od BL1 byly vždy změřeny 4 paralelní vzorky.

Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(A_{BL1} - A_{VZ})}{(A_{BL2} - A_{BL3})} * 32,5 * zř$$

$A_{BL1}$  = absorbance BL1

$A_{BL2}$  = absorbance BL2

$A_{BL3}$  = absorbance BL3

$A_{VZ}$  = absorbance vzorku

$zř$  = zředění (tj. 10)

#### 5.2.4.6 Stanovení aktivity superoxid dismutasy

Princip metody:

Metoda stanovení aktivity SOD je založena na redukci WST-1 (2-(4-jódfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazol sodný) na barevný produkt WST-1 formazan. Reakce probíhá v přítomnosti superoxidového anionu ( $O_2^-$ ) za vzniku molekuly kyslíku. Tato reakce je inhibována činností SOD, která katalyzuje přeměnu  $O_2^-$  a snižuje tak jeho dostupnost, potřebnou pro průběh reakce. Spektrofotometricky je zaznamenána absorbance vzorku a tří různých slepých vzorků a pomocí příslušného výpočtu je stanovena aktivita SOD.

Použité zásobní roztoky:

Ke stanovení aktivity SOD byl použit SOD Assay Kit s následujícími roztoky:

roztok WST

roztok enzymu

pufř

ředící pufř

#### Postup:

Pro stanovení aktivity SOD byly využity tři odlišné slepé vzorky s označením blank 1 (BL1), blank 2 (BL2) a blank 3 (BL3). Smícháním 450  $\mu$ l roztoku WST a 8550  $\mu$ l pufru vznikne pracovní roztok WST, který bude dále používán. Roztok enzymu byl po dobu 5 sekund centrifugován, následně promíchán pomocí pipety a poté zředěn ředícím pufrem (15  $\mu$ l roztoku enzymu a 2,5 ml ředícího pufru), vzniká tak pracovní roztok enzymu. Postup při pipetování do mikrotitrační destičky GAMA byl následující:

1. Napipetovat 20  $\mu$ l subcelulární frakce do jamek s BL2 a se vzorky.
2. Do jamek BL1 a BL3 20  $\mu$ l destilované vody.
3. Do všech jamek 200  $\mu$ l pracovního roztoku WST.
4. Do BL2 a BL3 20  $\mu$ l ředícího pufru.
5. Do BL1 a vzorků 20  $\mu$ l pracovního roztoku enzymu.

Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 20 minut při teplotě 37  $^{\circ}$ C a následně byla změřena absorbance při 450 nm na TECANU. V rámci jednoho stanovení byly vždy změřeny 3 paralelní vzorky od každé frakce a všech slepých vzorků.

#### Výpočet aktivity:

Následujícím výpočtem byla stanovena koncentrace formazanu, vyjádřena v jednotkách [M], které byla dále využita při výpočtu aktivity SOD.

$$c_{\text{formazan}} = \frac{[(A_{BL1} - A_{BL3}) - (A_{VZ} - A_{BL2})]}{(\epsilon * l)}$$

$A_{BL1}$  = absorbance BL1

$A_{BL2}$  = absorbance BL2

$A_{BL3}$  = absorbance BL3

$A_{VZ}$  = absorbance vzorku

$\epsilon$  = 37 000  $M^{-1}cm^{-1}$

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,9 cm)

$$aktivita = \frac{c_{formazan} * V * 50 * 10^9}{t}$$

$V$  = objem reakční směsi v jamce (tj. 0,00024 ml)

$t$  = doba, po kterou probíhala reakce (tj. 20 min)

#### 5.2.4.7 Stanovení aktivity peroxidasy pomocí anilinu a pyrokatecholu

##### Princip metody:

Metoda je založena na inkubaci subcelulárních frakcí s peroxidem vodíku a dvojicí pyrokatechol-anilin, která slouží jako vodíkový donor. Spektrofotometricky je zaznamenán přírůstek absorbance, který odpovídá přírůstku růžově zbarveného produktu (4-(fenylamino)benzen-1,2-diol). Aktivita Px je následně vypočítána pomocí naměřené absorbance a molárního absorpčního koeficientu produktu.

##### Použité zásobní roztoky:

0,2 M Na-fosfátový pufr, pH 7,0 (připraven smísením roztoků  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

35,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  do 500 ml redestilované vody

7,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do 250 ml redestilované vody

1,7 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3,8  $\mu\text{l}$  30% zásobního roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$  do 20 ml pufru)

substrát: 170 mM pyrokatechol (0,1872 g) + 2,5 mM anilin (2,28  $\mu\text{l}$ ) + 10 ml pufru

##### Postup:

Do jamek mikrotitrační destičky GAMA napipetovat 90  $\mu\text{l}$  substrátu a 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  a destičku inkubovat při 25 °C po dobu 4 minut. Poté odstartovat reakci napipetováním 10  $\mu\text{l}$  subcelulární frakce nebo 10  $\mu\text{l}$  Na-fosfátového pufru v případě slepého vzorku. Pipetování frakce či pufru probíhalo postupně, vždy pouze do dvou paralelních jamek od každého vzorku, těsně před vložením destičky do TECANU. Po dobu 7 minut při 510 nm byl následně zaznamenáván vzrůst absorbance. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 8 paralelních vzorků od každé frakce.



### Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * Vi}{\epsilon * l * Vs}$$

$Avz$  = absorbance vzorku

$Asl$  = absorbance slepého vzorku

$\epsilon$  produktu =  $5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,75 cm)

$Vi$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$Vs$  = objem biologické frakce (tj. 0,010 ml)

### **5.2.4.8 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy**

#### Princip metody:

Metoda stanovení aktivity GST je založena na tvorbě konjugátu redukováného glutathionu (GSH) s 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem (CDNB), tato reakce je katalyzována GST. Přírůstek konjugátu je zaznamenán spektrofotometricky jako vzrůstající absorbance. Aktivita GST je následně vyjádřena pomocí naměřené absorbance a molárního absorpčního koeficientu produktu.

#### Použité zásobní roztoky:

0,1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,5 (připravený smísením roztoků  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

1,79 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  v 50 ml redestilované vody

1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 100 ml redestilované vody

5,15 mM GSH (7,92 mg v 5 ml Na-fosfátového pufru)

51,5 mM CDNB (5,22 mg v 0,5 ml ethanolu)

#### Postup:

Aktivita GST cytosolické frakce byla stanovena v neředěné frakci i v ředěné frakci (naředěna desetkrát). U frakce mitochondriální a mikrosomální nebyly frakce ředěny.

Da jamek mikrotitrační destičky GREINER napipetovat 6  $\mu$ l frakce či 6  $\mu$ l Na-fosfátového pufru v případě slepého vzorku. Dále do každé jamky napipetovat 194  $\mu$ l Master mixu multikanálovou pipetou. Master mix byl připraven smícháním 4 ml GSH, 0,4 ml CDNB, 15,6 ml Na-fosfátového pufru, toto množství odpovídá objemu potřebnému na jednu destičku. Destičku vložit do TECANU, kde byl po dobu 10 minut zaznamenáván vzrůst absorbance při 340 nm. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 6 paralelních vzorků od každé frakce.

Výpočet aktivity:

$$aktivita = \frac{(\Delta Avz - \Delta Asl) * Vi * 1000}{\epsilon * l * Vs} * zř$$

$Avz$  = absorbance vzorku

$Asl$  = absorbance slepého vzorku

$\epsilon$  = molární absorpční koeficient (tj. 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,6 cm)

$Vi$  = objem reakční směsi (tj. 0,2 ml)

$Vs$  = objem biologické frakce (tj. 0,006 ml)

$zř$  = zředění (tj. 10 v případě cytosolických frakcí, které byly před stanovením naředěny a 1 u všech zbylých frakcí)

#### **5.2.4.9 Stanovení aktivit UDP-glykosyltransferas**

Princip metody:

Stanovení aktivity UGT a UGlcT bylo prováděno odděleně, ale metody jsou velice podobné, proto budou popsány společně. Stanovení je založeno na konjugaci substrátu p-nitrofenolu s UDP-GA v případě stanovení UGT či na konjugaci s UDP-Glc v případě stanovení UGlcT. Na základě spektrofotometricky zaznamenané absorbance lze vyjádřit koncentraci konjugovaného p-nitrofenolu a poté pomocí molárního absorpčního koeficientu aktivitu UGT či UGlcT.

### Použité zásobní roztoky:

2,5 mM p-nitrofenol (3,5 mg p-nitrofenolu v 10 ml redestilované vody)

10 mM UDP-GA (6,46 mg v 1 ml redestilované vody) pro stanovení UGT

10 mM UDP-Glc (5,66 mg v 1 ml redestilované vody) pro stanovení UGlcT

slovasol (50 mg v 1 ml redestilované vody)

TRIS/HCl pufr, pH 7,4 (0,5 g TRIS v 10 ml redestilované vody, pomocí 1 M HCl  
upravit pH, doplnit na 15 ml a v celkovém objemu rozpustit 24,4 mg MgCl<sub>2</sub>)

3% kyselina trichloroctová (TCA)

1 M NaOH

### Postup:

Nejprve byly připraveny roztoky subcelulární frakce s detergentem v poměru 2:1 (tj. například 180 µl frakce a 90 µl detergentu). Roztok po promíchání inkubovat v lednici po dobu 20 minut. Poté do jamek mikrotitrační destičky GAMA napipetovat 50 µl pufru při stanovení UGT nebo 40 µl pufru při stanovení UGlcT. Dále 20 µl UDP-GA či UDP-Glc nebo 20 µl destilované vody v případě slepých vzorků. Poté vždy 20 µl p-nitrofenolu a 10 µl roztoku frakce s detergentem při stanovení aktivity UGT či 20 µl roztoku frakce s detergentem při stanovení aktivity UGlcT. Destičku inkubovat při 37 °C po dobu 20 minut za mírného třepání. Po inkubaci do každé jamky přidat 50 µl TCA, destičku vložit do centrifugy a po dobu 5 minut při 5000 otáčkách za minutu stočit. Do nové GAMA destičky napipetovat 50 µl NaOH a do každé jamky s NaOH přenést 50 µl inkubační směsi z první destičky, poté změřit na TECANU absorbanci při 405 nm. V rámci jednoho stanovení bylo vždy změřeno 5 paralelních vzorků od každé frakce.

### Výpočet aktivity:

Prvním krokem pro výpočet aktivity UGT/UGlcT je stanovení koncentrace konjugovaného p-nitrofenolu, koncentrace je vyjádřena v jednotkách [mM].

$$c = \frac{\Delta A_{SL} - A_{VZ}}{\varepsilon * l}$$

$A_{VZ}$  = absorbance vzorku

$A_{SL}$  = absorbance slepého vzorku

$\epsilon$  = molární absorpční koeficient (tj.  $18,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$l$  = výška měřené vrstvy v jamce (tj. 0,5 cm)

Dalším krokem je vyjádření koncentrace vzniklého p-nitrofenolu za minutu ( $x$ ) v jednotkách [mmol/min].

$$x = \frac{c * 0,0001}{t}$$

$t$  = doba, po kterou probíhala reakce (tj. 20 min)

V posledním kroku je vyjádřena aktivita UGT/UGlcT v jednotkách [nmol/min/ml].

$$aktivita = \frac{x * 1000 * 10^6}{V * 3}$$

$V$  = objem frakce (tj. 10  $\mu\text{l}$  při stanovení UGT a 20  $\mu\text{l}$  při stanovení UGlcT)

### 5.2.5 Stanovení množství bílkoviny ve vzorku subcelulární frakce

#### Princip metody:

Stanovení množství proteinů ve vzorku bylo provedeno metodou BCA. Principem této metody je reakce proteinů s  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí. Měď přechází na  $\text{Cu}^{1+}$ , která vytváří stabilní modrofialový komplex s kyselinou bicinchoninovou (BCA) v prostředí kolem pH 10. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny, obsaženém v subcelulární frakci.

#### Použité zásobní roztoky:

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

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

zásobní 0,2% roztok hovězího sérového albuminu (BSA)

#### Postup:

Prvním krokem byla příprava pracovního roztoku C, který vznikl smícháním roztoku A a roztoku B v poměru 50:1. Jednotlivé subcelulární frakce byly dvacetkrát naředěny destilovanou vodou. Zásobní 0,2% roztok BSA byl naředěn destilovanou vodou

na koncentraci 0,1% a následně byl použit k přípravě 6 roztoků, jejichž přesná koncentrace je patrná z **Tab. 2**. BSA slouží jako standard bílkovin a pomocí hodnot absorbancí jednotlivých roztoků BSA byla následně stanovena kalibrační křivka.

**Tab. 2** Složení a koncentrace roztoků BSA.

	<b>koncentrace</b>	<b>0,1% roztok BSA</b>	<b>destilovaná voda</b>
<b>1</b>	0 µg/ml	0 µl	100 µl
<b>2</b>	200 µg/ml	20 µl	80 µl
<b>3</b>	400 µg/ml	40 µl	60 µl
<b>4</b>	600 µg/ml	60 µl	40 µl
<b>5</b>	800 µg/ml	80 µl	20 µl
<b>6</b>	1000 µg/ml	100 µl	0 µl

Do mikrotitrační destičky GAMA napipetovat 10 µl od každého ze 6 roztoků BSA, vždy 6 paralelních vzorků. Dále 10 µl jednotlivých naředěných subcelulárních frakcí, také vždy 6 paralelních vzorků. Poté do všech jamek 200 µl pracovního roztoku C a destičku inkubovat 30 min při 37 °C. Po inkubaci spektrofotometricky změřit absorbanci při 562 nm pomocí přístroje TECAN.

#### Vyhodnocení:

Pomocí naměřených hodnot absorbancí roztoků BSA byla sestrojena kalibrační křivka. Z absorbancí jednotlivých frakcí byla pomocí rovnice kalibrační křivky s ohledem na ředění vzorku, určena koncentrace proteinu ve vzorku [mg/ml]. Následně byla stanovena průměrná hodnota koncentrace proteinu ve vzorku a také její směrodatná odchylka.

Koncentrace proteinů ve vzorku byla dále použita pro určení specifické aktivity enzymů [nmol/min/mg], případně [µmol/min/mg] v případě CAT. Jedná se o vztažení aktivity enzymu [nmol/min/ml], stanovených podle výše uvedených postupů, na množství proteinu v příslušném vzorku.

$$\text{specifická aktivita} = \frac{\text{aktivita enzymu}}{C_{\text{proteinu ve vzorku}}}$$

### 5.3 Vyhodnocení a statistické zpracování dat

Zpracování dat bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel 2016. V případě stanovení aktivity enzymů, u kterých byl zaznamenáván vzrůst či pokles absorbance v průběhu několika minut, byla ze souborů vyřazena data, která neodpovídala lineárnímu přírůstku či poklesu absorbance.

Statistická analýza dat byla provedena v programu GraphPad Prism 7 za použití one-way ANOVA testu s Dunnettovým post-hoc testem. Tento test byl použit pro vyhodnocení statistické významnosti vlivu ABZ na aktivity vybraných enzymů a také pro porovnání aktivity enzymů ve dvou různých kontrolních skupinách. Data v grafech jsou prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (SD). Statisticky významný vliv ABZ na aktivitu enzymů či statisticky významná odlišnost v aktivitě kontrolních skupin je označena hvězdičkou (\*  $P < 0,05$ ).

## 6 VÝSLEDKY

Výsledky jsou numericky prezentovány v následujících tabulkách, jako průměry jednotlivých stanovení specifických aktivit enzymů příslušné subcelulární frakce. Současně je uvedeno grafické zpracování těchto dat, kde jsou hvězdičkou označeny statisticky významné hodnoty (\*  $P < 0,05$ ). Hodnoty specifických aktivit jsou uvedeny se směrodatnými odchylkami, které jsou znázorněny i v grafech. Specifické aktivity jsou v grafickém provedení vztaženy vždy ke kontrolní skupině (K), která byla inkubována v samotném inkubačním médiu.

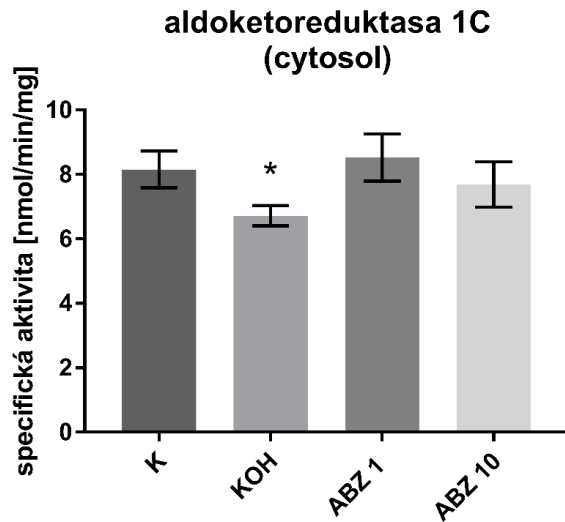
### 6.1 Aktivita aldoketoreduktasy 1C

Vliv ABZ na aktivitu AKR1C byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity AKR1C jsou uvedeny v **Tab. 3**. Grafické znázornění specifických aktivit AKR1C je uvedeno na **Obr. 8-10**, pro každou z frakcí odděleně.

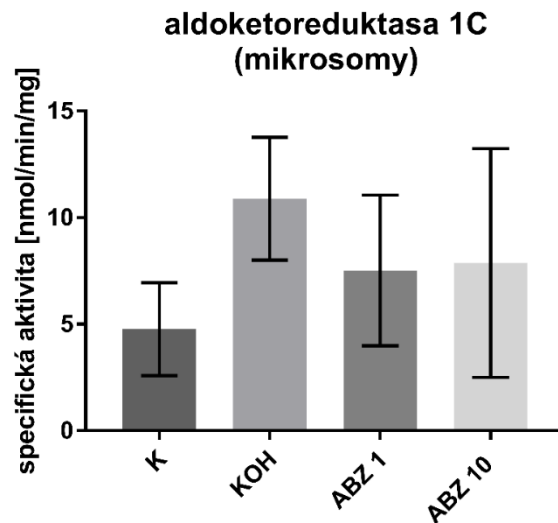
U enzymu AKR1C v mitochondriích bylo prokázáno statisticky významné snížení aktivity po inkubaci s 10  $\mu\text{M}$  ABZ (viz **Obr. 10**). Také byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v aktivitách mezi kontrolními vzorky KOH a K, kde došlo ke zvýšení aktivity v kontrolní skupině po 24h inkubaci (viz **Obr. 8 a 10**). U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo k významným změnám v aktivitě enzymu AKR1C.

**Tab. 3** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity AKR1C v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg]  $\pm$  směrodatná odchylka.

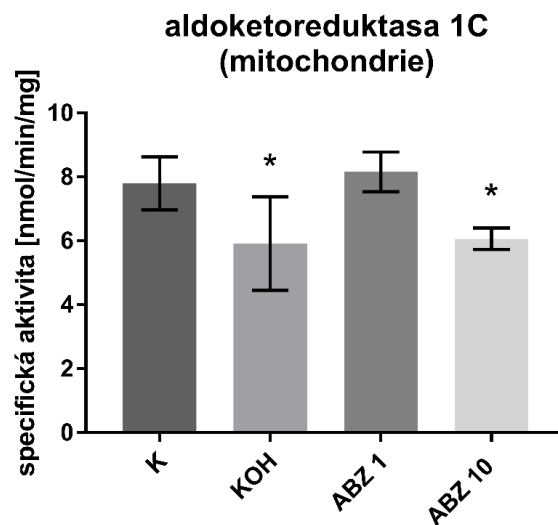
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	8,16 $\pm$ 0,465	4,77 $\pm$ 1,89	7,80 $\pm$ 0,720
<b>KOH</b>	6,72 $\pm$ 0,257	10,9 $\pm$ 2,50	5,88 $\pm$ 1,45
<b>ABZ 1</b>	8,53 $\pm$ 0,599	7,51 $\pm$ 3,06	8,16 $\pm$ 0,538
<b>ABZ 10</b>	7,69 $\pm$ 0,574	5,29 $\pm$ 4,79	6,24 $\pm$ 0,427



**Obr. 8** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1C v cytosolu.



**Obr. 9** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1C v mikrosomech.



**Obr. 10** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1C v mitochondriích.



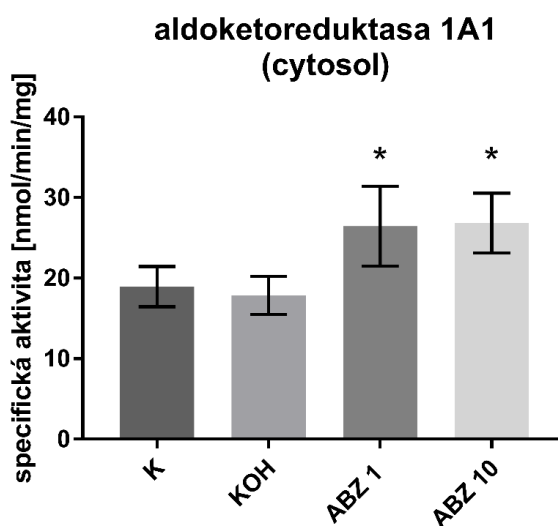
## 6.2 Aktivita aldoketoreduktasy 1A1

Vliv ABZ na aktivitu AKR1A1 byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 4**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 11-13**, pro každou z frakcí odděleně.

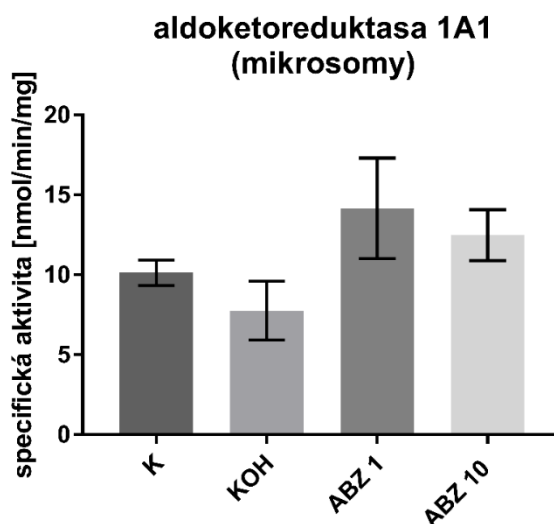
U enzymu AKR1A1 v cytosolu byl zaznamenán statisticky významný vzrůst aktivity po inkubaci s 1  $\mu$ M ABZ i s 10  $\mu$ M ABZ (viz **Obr. 11**). U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo ke statisticky významným změnám v aktivitě enzymu AKR1A1.

**Tab. 4** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity AKR1A1 v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg]  $\pm$  směrodatná odchylka.

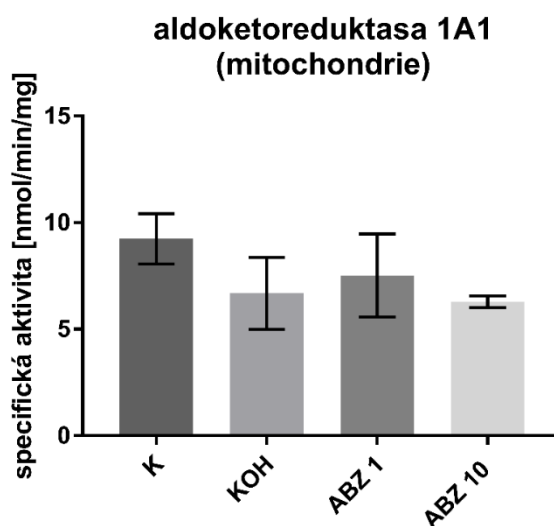
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	18,95 $\pm$ 2,16	10,14 $\pm$ 0,643	9,24 $\pm$ 0,966
<b>KOH</b>	17,85 $\pm$ 2,06	7,76 $\pm$ 1,50	6,68 $\pm$ 1,46
<b>ABZ 1</b>	25,13 $\pm$ 4,19	14,16 $\pm$ 2,56	7,52 $\pm$ 1,59
<b>ABZ 10</b>	25,28 $\pm$ 3,76	12,49 $\pm$ 1,12	6,28 $\pm$ 0,224



**Obr. 11** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1A1 v cytosolu.



**Obr. 12** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1A1 v mikrosomech.



**Obr. 13** Grafické porovnání specifických aktivit AKR1A1 v mitochondriích.

### 6.3 Aktivita karbonylreduktasy

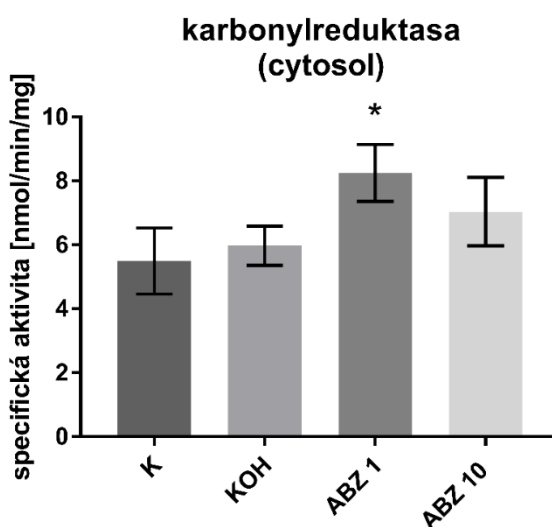
Vliv ABZ na aktivitu CBR byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 5**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 14-16**, pro každou z frakcí odděleně.

U enzymu CBR byl v cytosolu zaznamenán statisticky významný vzrůst aktivity po inkubaci s 1  $\mu$ M ABZ (viz **Obr. 14**). Dále byl prokázán statisticky významný pokles

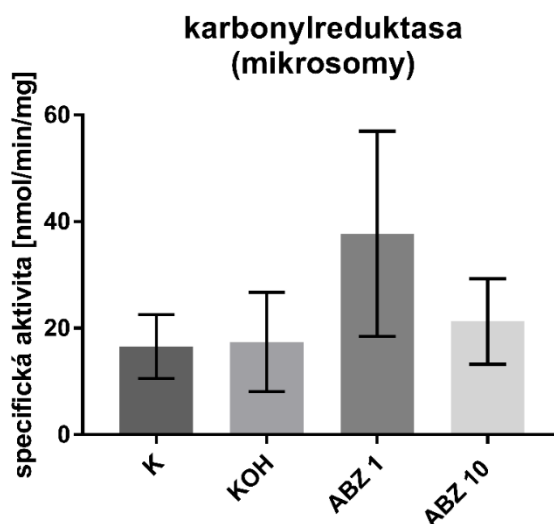
aktivity CBR v mitochondriích po inkubaci s ABZ v obou koncentracích (viz **Obr. 16**) a současně byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v aktivitách CBR v mitochondriích mezi skupinami K a KOH (viz **Obr. 16**). U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo k významným změnám v aktivitě enzymu CBR.

**Tab. 5** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity CBR v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka.

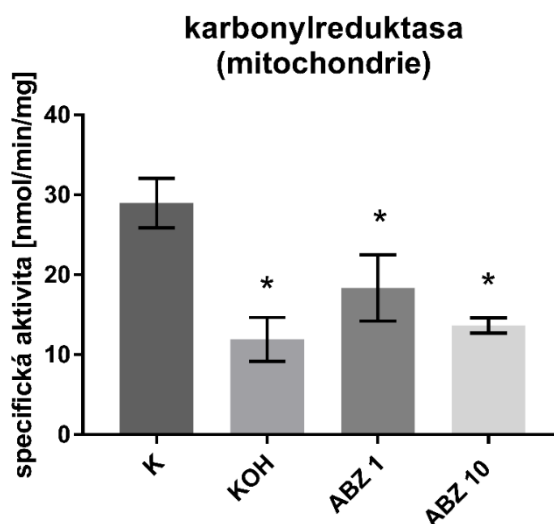
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	5,49 ± 0,894	14,80 ± 5,22	27,69 ± 3,52
<b>KOH</b>	5,98 ± 0,527	14,30 ± 8,53	11,91 ± 2,38
<b>ABZ 1</b>	8,25 ± 0,770	30,46 ± 18,52	18,36 ± 3,59
<b>ABZ 10</b>	7,04 ± 0,927	21,26 ± 6,54	13,66 ± 0,824



**Obr. 14** Grafické porovnání specifických aktivit CBR v cytosolu.



**Obr. 15** Grafické porovnání specifických aktivit CBR v mikrosomech.



**Obr. 16** Grafické porovnání specifických aktivit CBR v mitochondriích.

#### 6.4 Glutathionreduktasová aktivita

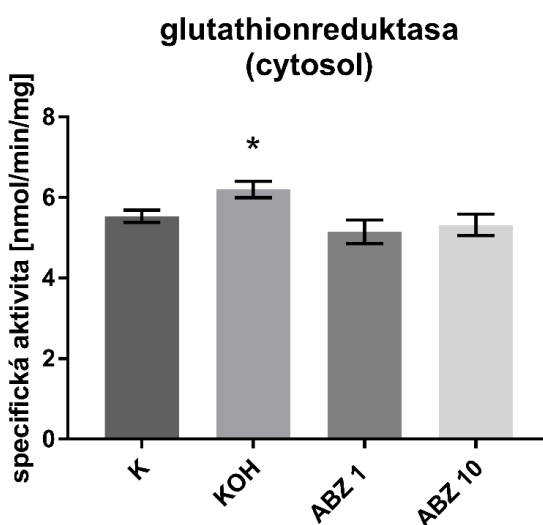
Vliv ABZ na glutathionreduktasovou aktivitu TGR byl stanoven pouze u cytosolické frakce. Stanovení probíhalo dvěma způsoby, a to za použití ředěného a neředěného vzorku frakce. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 6**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 17 a 18**.

Metodou stanovení s neředěným vzorkem frakce byla zaznamenána statisticky významně nižší glutathionreduktasová aktivita enzymu TGR v cytosolu po inkubaci

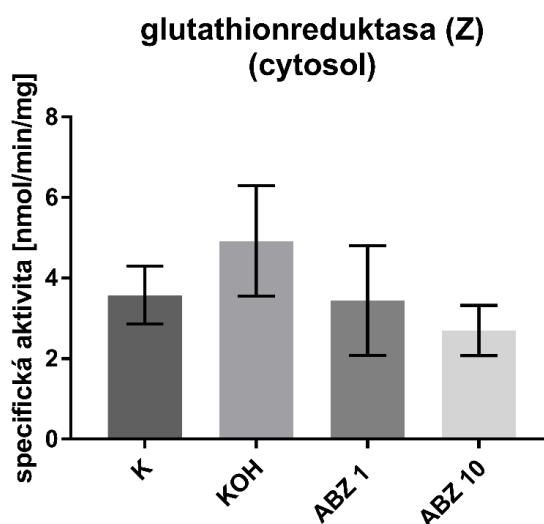
v samotném inkubačním médiu v porovnání s neinkubovaným vzorkem (viz **Obr. 17**). Metodou stanovení se zředěným vzorkem tato změna aktivity zaznamenána nebyla. U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo ke statisticky významným změnám v glutathionreduktasové aktivitě.

**Tab. 6** V tabulce jsou uvedeny glutathionreduktasové specifické aktivity enzymu TGR, naměřené v cytosolické frakci za použití metody s neřaděným vzorkem frakce a metodou s pětkrát řaděným vzorkem frakce (označeno písmenem Z). Hodnoty jsou uvedeny v jednotkách [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka.

Specifická aktivita	cytosol	cytosol (Z)
<b>K</b>	5,54 ± 0,123	3,58 ± 0,586
<b>KOH</b>	6,20 ± 0,175	4,92 ± 1,12
<b>ABZ 1</b>	5,15 ± 0,238	3,44 ± 1,11
<b>ABZ 10</b>	5,32 ± 0,217	2,70 ± 0,509



**Obr. 17** Grafické porovnání specifických glutathionreduktasových aktivit enzymu TGR v cytosolu, stanovené metodou za použití neřaděného vzorku frakce.



**Obr. 18** Grafické porovnání specifických glutathionreduktasových aktivit enzymu TGR v cytosolu, stanoveno metodou za použití zředěného vzorku frakce.

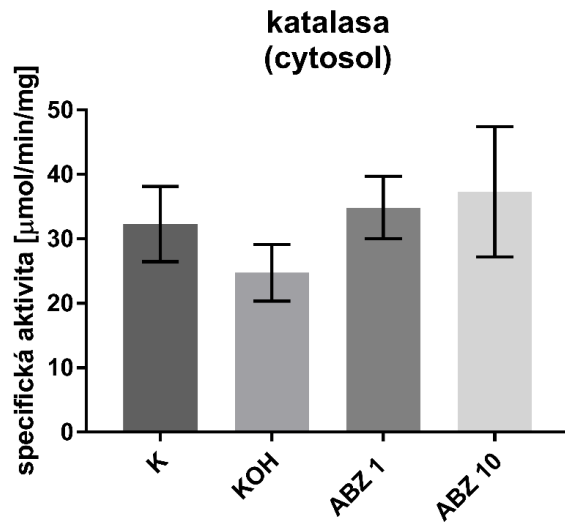
## 6.5 Aktivita katalasy

Vliv ABZ na aktivitu CAT byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí, z nichž u mitochondriální frakce nebyla aktivita enzymu zaznamenána. Výsledné specifické aktivity cytosolické a mikrosomální frakce jsou uvedeny v **Tab. 7**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 19 a 20**, pro každou z frakcí odděleně.

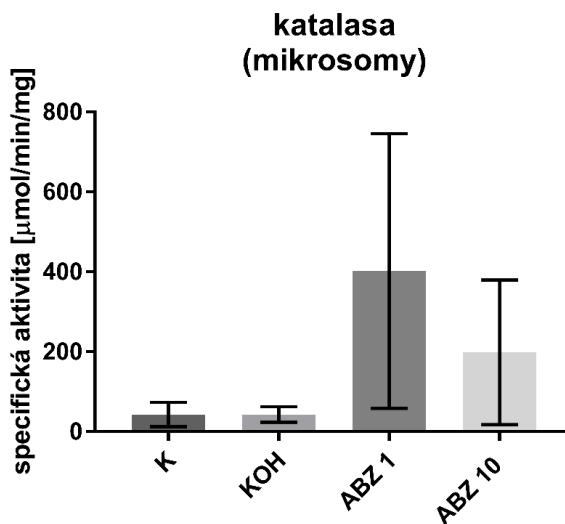
U enzymu CAT v cytosolu a mikrosomech nebyly prokázány žádné statisticky významné změny v aktivitě.

**Tab. 7** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity CAT v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ]  $\pm$  směrodatná odchylka.

Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	32,32 $\pm$ 5,06	43,17 $\pm$ 24,94	/
<b>KOH</b>	24,76 $\pm$ 3,82	42,79 $\pm$ 15,83	/
<b>ABZ 1</b>	34,87 $\pm$ 4,19	402,14 $\pm$ 280,57	/
<b>ABZ 10</b>	37,35 $\pm$ 8,75	198,72 $\pm$ 127,92	/



**Obr. 19** Grafické porovnání specifických aktivit CAT v cytosolu.



**Obr. 20** Grafické porovnání specifických aktivit CAT v mikrosomech.

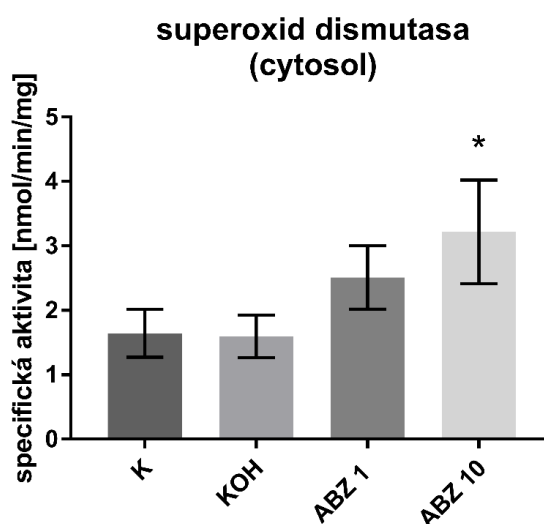
## 6.6 Aktivita superoxid dismutasy

Vliv ABZ na aktivitu SOD byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 8**. Grafické znázornění specifických aktivit se směrodatnými odchylkami je uvedeno na **Obr. 21-23**, pro každou z frakcí odděleně.

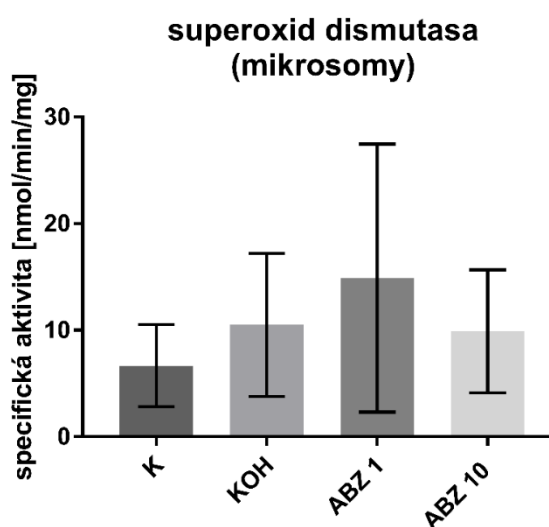
U enzymu SOD v cytosolu byl zaznamenán statisticky významný vzrůst aktivity po inkubaci s 10  $\mu$ M ABZ (viz **Obr. 21**). U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo k významným změnám v aktivitě enzymu SOD.

**Tab. 8** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity SOD v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg]  $\pm$  směrodatná odchylka.

Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	1,64 $\pm$ 0,303	6,67 $\pm$ 3,15	3,08 $\pm$ 2,41
<b>KOH</b>	1,60 $\pm$ 0,270	10,50 $\pm$ 5,47	2,18 $\pm$ 1,28
<b>ABZ 1</b>	2,51 $\pm$ 0,402	14,90 $\pm$ 10,27	2,31 $\pm$ 1,74
<b>ABZ 10</b>	3,22 $\pm$ 0,657	9,89 $\pm$ 4,72	2,09 $\pm$ 1,10

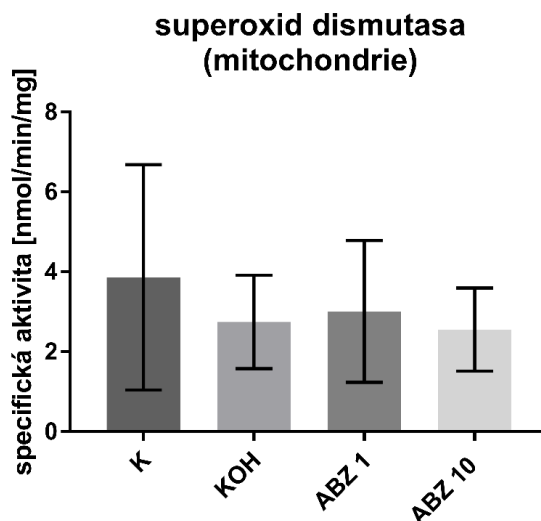


**Obr. 21** Grafické porovnání specifických aktivit SOD v cytosolu.



**Obr. 22** Grafické porovnání specifických aktivit SOD v mikrosomech.





**Obr. 23** Grafické porovnání specifických aktivit SOD v mitochondriích.

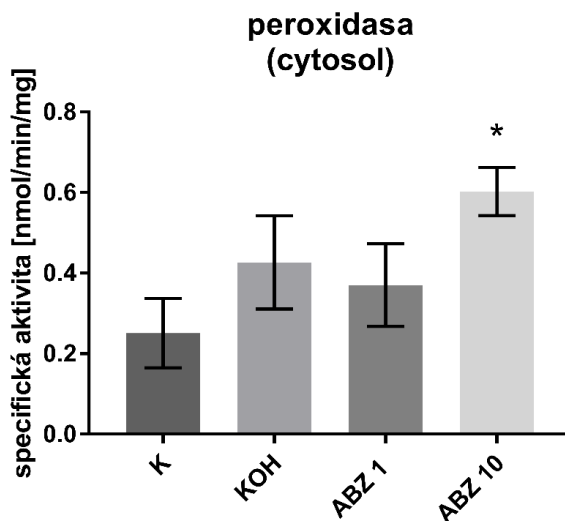
## 6.7 Aktivita peroxidasy

Vliv ABZ na aktivitu Px byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 9**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 24-26**, pro každou z frakcí odděleně.

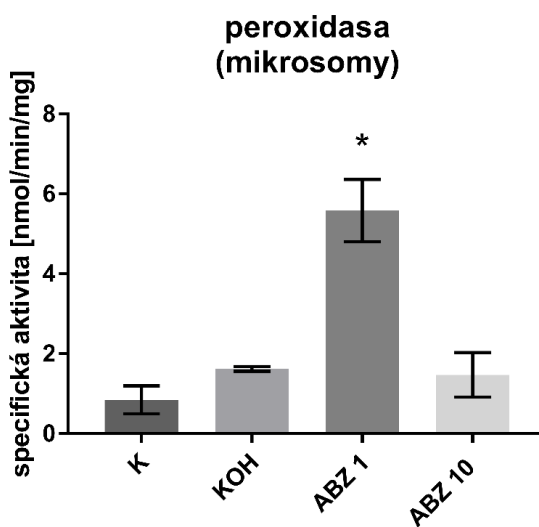
U Px v cytosolu byl zaznamenán statisticky významný vzrůst aktivity enzymu po inkubaci s 10  $\mu\text{M}$  ABZ (viz **Obr. 24**). V mikrosomech byl prokázán statistický významný vzrůst aktivity Px po inkubaci s 1  $\mu\text{M}$  ABZ (viz **Obr. 25**). V mitochondriích nebyla prokázána žádná aktivita Px v kontrolní skupině K. U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo k významným změnám v aktivitě enzymu Px.

**Tab. 9** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity Px v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg]  $\pm$  směrodatná odchylka.

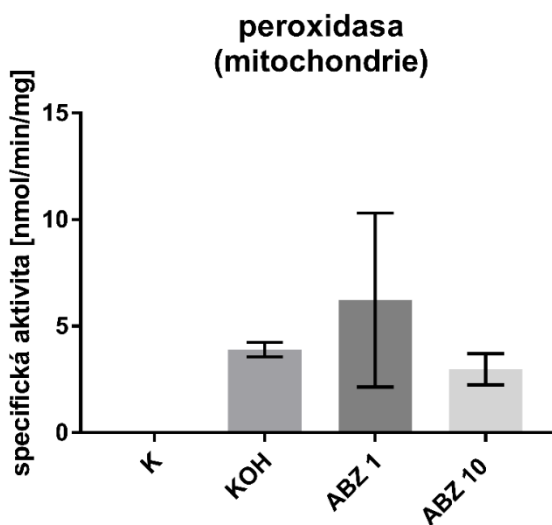
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	0,285 $\pm$ 0,0953	0,85 $\pm$ 0,25	/
<b>KOH</b>	0,427 $\pm$ 0,100	1,62 $\pm$ 0,04	3,90 $\pm$ 0,24
<b>ABZ 1</b>	0,370 $\pm$ 0,0889	5,58 $\pm$ 0,55	6,23 $\pm$ 2,89
<b>ABZ 10</b>	0,603 $\pm$ 0,0518	1,47 $\pm$ 0,39	2,97 $\pm$ 0,52



**Obr. 24** Grafické porovnání specifických aktivit Px v cytosolu.



**Obr. 25** Grafické porovnání specifických aktivit Px v mikrosomech.



**Obr. 26** Grafické porovnání specifických aktivit Px v mitochondriích.

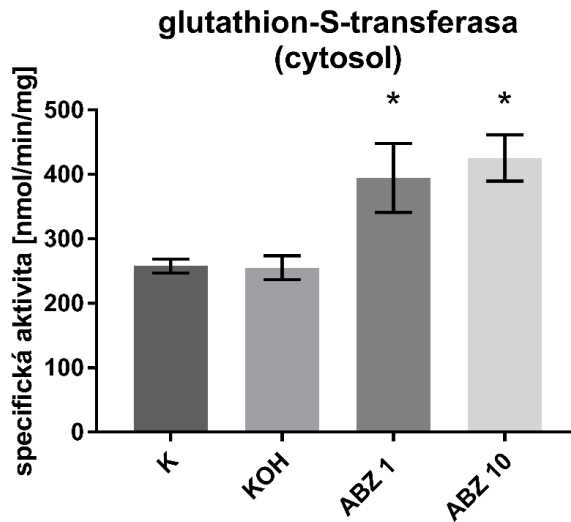
## 6.8 Aktivita glutathion-S-transferasy

Vliv ABZ na aktivitu GST byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. U cytosolické frakce byla aktivita GST stanovena dvěma způsoby, a to za využití neředěných a desetkrát zředěných vzorků (označených písmenem Z). Výsledné specifické aktivity stanovené s využitím neředěných vzorků frakcí jsou uvedeny v **Tab. 10**. V **Tab. 11** jsou uvedeny specifické aktivity cytosolické frakce, které byly stanoveny metodou za využití zředěného vzorku frakce. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 27-30**.

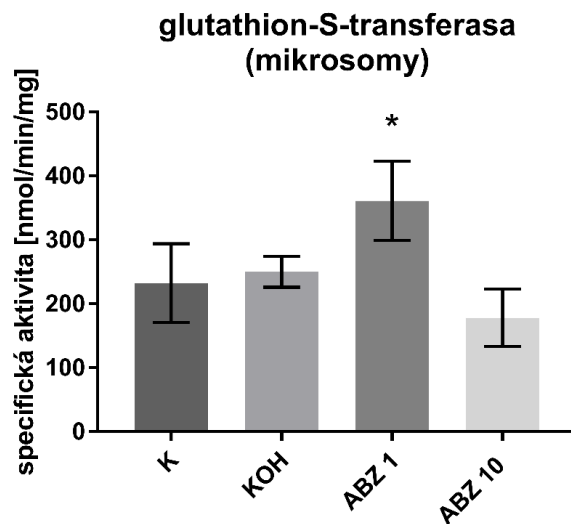
U enzymu GST v cytosolu byl zaznamenán statisticky významný vzrůst aktivity po inkubaci s ABZ v obou koncentracích, a to při stanovení aktivity metodou s neředěným vzorkem frakce (viz **Obr. 27**). Při stanovení aktivity metodou se zředěným vzorkem frakce nebyla v cytosolu zaznamenána žádná statisticky významná změna v aktivitě enzymu. V mikrosomech bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení aktivity GST po inkubaci s 1  $\mu\text{M}$  ABZ (viz **Obr. 28**), a v mitochondriích bylo prokázáno statisticky významné snížení aktivity po inkubaci s 10  $\mu\text{M}$  ABZ (viz **Obr. 29**). U zbylých sledovaných skupin vzorků nedošlo k významným změnám v aktivitě enzymu GST.

**Tab. 10** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity GST v příslušných subcelulárních frakcích stanovené metodou s neředěným vzorkem, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg]  $\pm$  směrodatná odchylka.

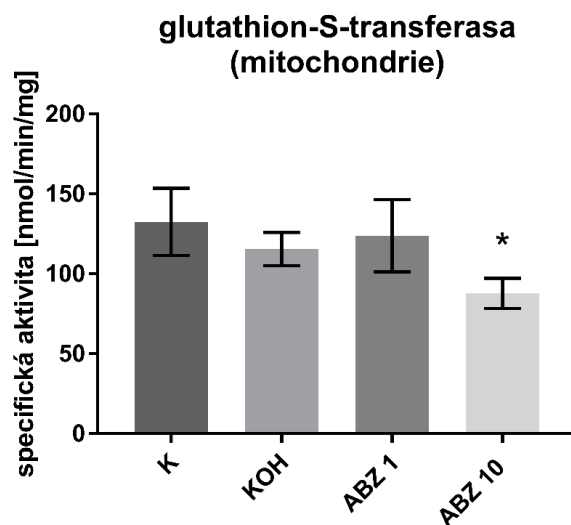
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	258,01 $\pm$ 8,68	232,37 $\pm$ 53,32	132,52 $\pm$ 18,18
<b>KOH</b>	255,40 $\pm$ 16,15	250,37 $\pm$ 19,76	115,55 $\pm$ 9,00
<b>ABZ 1</b>	394,74 $\pm$ 43,75	361,17 $\pm$ 50,42	123,85 $\pm$ 19,53
<b>ABZ 10</b>	425,62 $\pm$ 29,13	178,33 $\pm$ 36,67	87,76 $\pm$ 8,28



**Obr. 27** Grafické porovnání specifických aktivit GST v cytosolu.



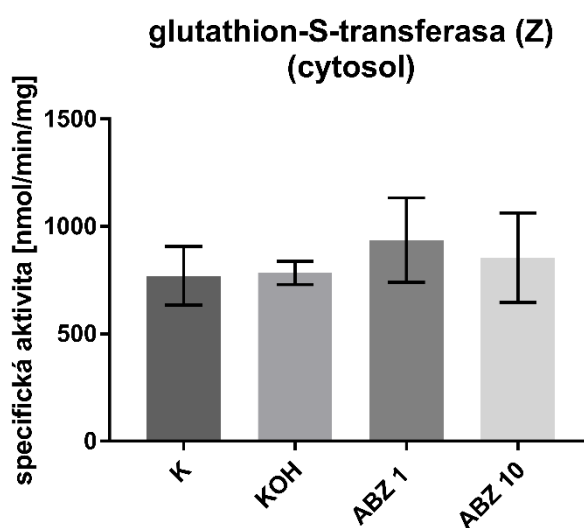
**Obr. 28** Grafické porovnání specifických aktivit GST v mikrosomech.



**Obr. 29** Grafické porovnání specifických aktivit GST v mitochondriích.

**Tab. 11** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity GST v cytosolické frakci stanovené metodou s řaděným vzorkem, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka.

Specifická aktivita	Cytosol (Z)
K	825,60 ± 153,74
KOH	783,99 ± 46,80
ABZ 1	1020,33 ± 226,34
ABZ 10	926,22 ± 215,55



**Obr. 30** Grafické porovnání specifických aktivit GST v cytosolu, stanovené metodou za použití zředěného vzorku frakce.

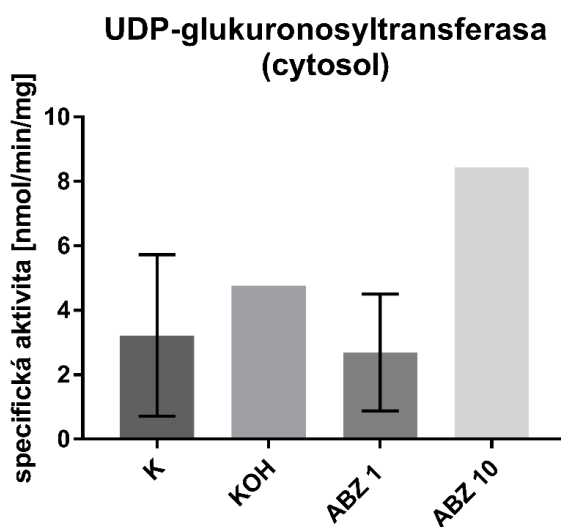
## 6.9 Aktivita UDP-glukuronosyltransferasy

Vliv ABZ na aktivitu UGT byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 12**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 31-33**, pro každou z frakcí odděleně. U některých frakcích UGT i UGlcT směrodatné odchylky nejsou uvedeny, jedná se o případy, kdy byla nenulová aktivita enzymu stanovena pouze u jednoho ze tří různých jednotlivých stanovení.

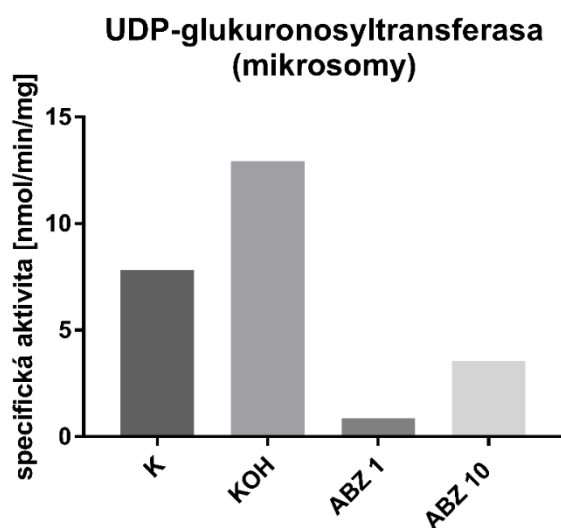
U enzymu UGT nebyla zaznamenána žádná statisticky významná změna v aktivitě.

**Tab. 12** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity UGT v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka.

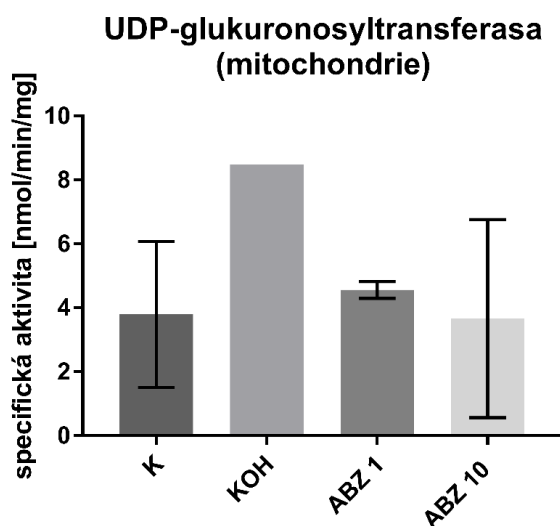
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	3,22 ± 1,77	7,80	3,80 ± 1,62
<b>KOH</b>	4,77	12,94	8,49
<b>ABZ 1</b>	2,69 ± 1,48	0,87	4,56 ± 0,19
<b>ABZ 10</b>	8,44	3,56	3,66 ± 2,53



**Obr. 31** Grafické porovnání specifických aktivit UGT v cytosolu.



**Obr. 32** Grafické porovnání specifických aktivit UGT v mikrosomech.



**Obr. 33** Grafické porovnání specifických aktivit UGT v mitochondriích.

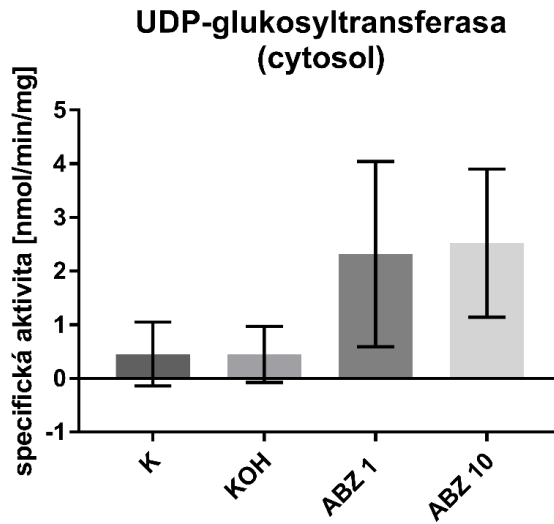
### 6.10 Aktivita UDP-glukosyltransferasy

Vliv ABZ na aktivitu UGlcT byl stanoven u všech tří subcelulárních frakcí. Výsledné specifické aktivity jsou uvedeny v **Tab. 13**. Grafické znázornění specifických aktivit je uvedeno na **Obr. 34-36**, pro každou z frakcí odděleně.

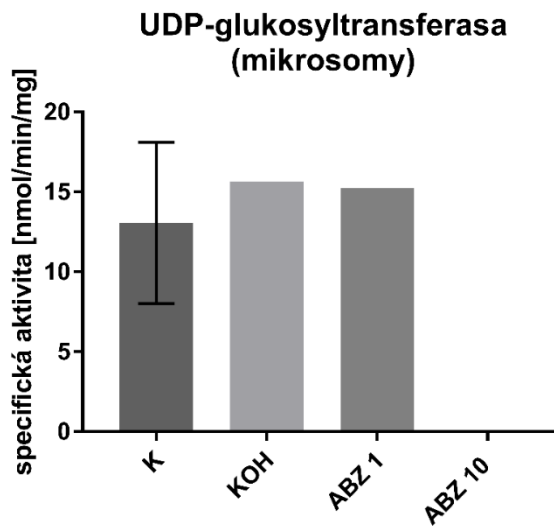
U enzymu UGlcT nebyla zaznamenána žádná statisticky významná změna v aktivitě.

**Tab. 13** V tabulce jsou uvedeny specifické aktivity UGlcT v příslušných subcelulárních frakcích, hodnoty jsou uvedené v jednotkách [nmol/min/mg] ± směrodatná odchylka.

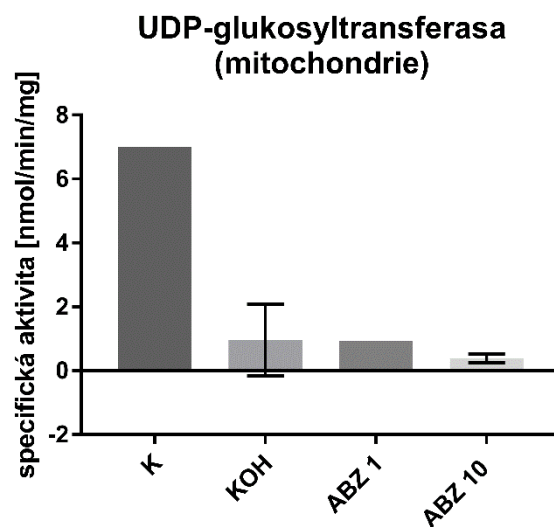
Specifická aktivita	cytosol	mikrosomy	mitochondrie
<b>K</b>	0,46 ± 0,42	13,06 ± 3,56	7,02
<b>KOH</b>	0,45 ± 0,37	15,64	0,96 ± 0,80
<b>ABZ 1</b>	2,32 ± 1,22	15,22	0,93
<b>ABZ 10</b>	2,52 ± 1,13	/	0,39 ± 0,11



**Obr. 34** Grafické porovnání specifických aktivit UGlcT v cytosolu.



**Obr. 35** Grafické porovnání specifických aktivit UGlcT v mikrosomech.



**Obr. 36** Grafické porovnání specifických aktivit UGlcT v mitochondriích



## 7 DISKUSE

Cílem této práce bylo stanovení vlivu ABZ na aktivitu vybraných enzymů tasemnice krysí. Důvodem pro tuto studii je nedostatek informací o aktivitách enzymů metabolizujících xenobiotika a zejména jejich roli v možném vzniku anthelmintické rezistence. Je známo, že nejen tasemnice, ale i ostatní helminti se dokáží toxickému vlivu anthelmintik bránit činností enzymů metabolizujících xenobiotika a činností transportních proteinů (Bártíková et al., 2012). A právě zvýšená aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika přispívá k dalšímu snížení účinnosti terapie a současně může být spojena se vznikem lékové rezistence u helmintů (Vokřál et al., 2013).

Zvýšení aktivity vybraných enzymů *H. diminuta* po inkubaci s ABZ bylo v této práci prokázáno, a to zejména v cytosolické a mikrosomální frakci. V mitochondriích byl naopak zaznamenán v aktivitě některých enzymů pokles.

Je známo, že u tasemnice krysí nevznikají žádné metabolity ABZ (Bártíková et al., 2012). Přes tuto skutečnost měla inkubace s ABZ vliv na aktivitu některých enzymů. Z enzymů první fáze biotransformace došlo k signifikantnímu zvýšení aktivity AKR1A1 v cytosolické frakci po inkubaci s ABZ v obou koncentracích (viz **Obr. 11**). Rovněž byla zaznamenána zvýšená aktivita u některých primárně antioxidačních enzymů, které se u helmintů pravděpodobně také podílejí na oxidačním metabolismu xenobiotik (Prchal et al., 2014).

Z konjugačních enzymů druhé fáze biotransformace bylo v cytosolu prokázáno signifikantní zvýšení aktivity GST po inkubaci s ABZ v obou koncentracích (viz **Obr. 27**), stejně tak v mikrosomech bylo zaznamenáno zvýšení aktivity po inkubaci s 1  $\mu$ M ABZ (viz **Obr. 28**). Dle dostupné literatury dosud nebyl u helmintů objeven žádný konjugovaný metabolit anthelmintika s glutationem, přesto byla aktivita GST po vystavení ABZ zvýšena. Ke zvýšení aktivity by mohlo docházet v souvislosti se známou schopností GST u helmintů nespecificky vázat anthelmintika a jiné lipofilní látky, což je považováno za pasivní detoxifikační mechanismus (Brophy and Barrett, 1990; Matoušková et al., 2016).

Výsledné specifické aktivity enzymů jsou v této práci uvedeny vždy jako průměry minimálně tří jednotlivých stanovení se směrodatnou odchylkou. Jedinou výjimkou jsou aktivity enzymů AKR1A1, UGT a UGlcT mikrosomální frakce u vzorků, které byly

inkubovány s 10  $\mu$ M ABZ. Zde byl průměr stanoven pouze ze dvou hodnot specifických aktivit z důvodu nedostatku vzorku. Tyto aktivity by bylo vhodné ověřit a doplnit dalším měřením, protože výsledek stanovený pouze ze dvou hodnot by mohl být zkreslený.

Některé výsledné specifické aktivity mají poměrně vysoké hodnoty směrodatných odchylek. Jedná se nejčastěji o enzymy mikrosomální frakce jako například AKR1C (viz **Obr. 9**), CBR (viz **Obr. 15**), CAT (viz **Obr. 20**), SOD (viz **Obr. 22**) a také o mitochondriální SOD (viz **Obr. 23**) a Px (viz **Obr. 26**). V těchto případech by bylo vhodné rovněž aktivity ověřit dalším měřením. Například u CAT v mikrosomech je z grafu (viz **Obr. 20**) patrné zvýšení aktivity enzymu po inkubaci s ABZ, které ale není statisticky významné, zřejmě právě z důvodu vysoké směrodatné odchylky. V případě mitochondriální Px nebyla při našich měřeních vůbec prokázána aktivita enzymu u kontrolní skupiny K (viz **Obr. 26**). Zde by bylo opět vhodné ověřit tento výsledek dalším měřením, protože aktivita kontrolní skupiny KOH a obou skupin vzorků ovlivněných ABZ u této frakce prokázána byla a v minulosti byla také prokázána (Bártíková et al. 2012).

Bártíková et al. (2012) stanovili aktivitu vybraných enzymů *H. diminuta*, mezi kterými byly také enzymy UGT a UGlcT, kde aktivita byla prokázána pouze v mitochondriální frakci u enzymu UGlcT. Tato dříve stanovená aktivita UGlcT v mitochondriích se shoduje s aktivitou stanovenou v této práci (aktivita kontrolní skupiny KOH). U zbylých subcelulárních frakcích byly v této práci u obou UDP-glykosyltransferas stanoveny jak aktivity nulové, která odpovídají předešlému výzkumu, tak aktivity nenulové. Proto by bylo vhodné dalším měřením ověřit a doplnit, zda je aktivita UGlcT u *H. diminuta* přítomna skutečně pouze v mitochondriích a zda opravdu není v žádné subcelulární frakci přítomna aktivita UGT.

Ve výzkumu Bártíková et al. (2012) byla také zkoumána u *H. diminuta* aktivita enzymu GST, která byla prokázána pouze v cytosolu. V této práci byla aktivita GST stanovena u všech subcelulárních frakcí. Specifická aktivita v cytosolu odpovídá dříve stanovené aktivitě a aktivita v mikrosomech dosahuje podobných hodnot (viz **Tab. 10**).

Zajímavostí jsou cytosolické aktivity GST (viz **Obr. 27 a 30**) a glutathionreduktasové aktivity enzymu TGR (viz **Obr. 17 a 18**), které byly v rámci této práce stanoveny dvěma způsoby, a to za použití ředěných a neředěných vzorků frakcí. U obou enzymů byla při stanovení s neředěným vzorkem frakce zaznamenána statisticky

významná změna v aktivitě, která ovšem nebyla stanovena metodou s ředěným vzorkem frakce.

Inkubační médium, doba inkubace, nebo stres spojený s izolací a inkubací mohli mít rovněž vliv na výslednou aktivitu vybraných enzymů. Porovnáním dvou kontrolních skupin bylo zjištěno zvýšení aktivity enzymů AKR1C (viz **Obr. 10**) a CBR (viz **Obr. 16**) v mitochondriích a enzymu AKR1C v cytosolu (viz **Obr. 8**) po inkubaci v samotném inkubačním médiu. Je tedy možné, že u těchto enzymů se ve stanovených hodnotách specifických aktivit promítl nejen vliv ABZ, ale také vliv samotné inkubace.

## 8 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjištění, zda má ABZ vliv na aktivitu vybraných enzymů u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Vliv ABZ na aktivitu enzymů byl stanoven u cytosolické, mikrosomální a mitochondriální frakce. Pro experiment byly použity dvě různé koncentrace ABZ, a to 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

Bylo prokázáno, že po inkubaci s ABZ v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci byla v cytosolu zvýšena aktivita enzymů AKR1A1, CBR a GST. Dále byla prokázána zvýšená aktivita u enzymů AKR1A1, SOD, Px a GST v cytosolu po inkubaci v přítomnosti 10  $\mu\text{M}$  ABZ. V mitochondriích bylo prokázáno snížení aktivity enzymu CBR po inkubaci s 1  $\mu\text{M}$  ABZ a snížení aktivity enzymů AKR1C, CBR a GST po inkubaci s 10  $\mu\text{M}$  ABZ. V mikrosomech bylo prokázáno zvýšení aktivity enzymů Px a GST po inkubaci s ABZ v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci. A současně nebylo zaznamenáno žádné ovlivnění aktivity enzymů v mikrosomech po inkubaci s ABZ v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci.

Dalším cílem této práce bylo porovnání aktivit enzymů dvou různých kontrolních skupin a na základě těchto informací určit, zda měla inkubace v samotném inkubačním médiu vliv na aktivitu enzymů *H. diminuta*. Bylo prokázáno, že 24 hodinová inkubace v samotném inkubačním médiu zvýšila aktivitu enzymů AKR1C a CBR v mitochondriích. Dále bylo prokázáno zvýšení aktivity enzymu AKR1C v cytosolu a současně snížení glutathionreduktasové aktivity enzymu TGR v cytosolu. V mikrosomech nebylo prokázáno žádné ovlivnění aktivity enzymů na základě inkubace v samotném inkubačním médiu.

Je známo, že *H. diminuta* není schopna ABZ metabolizovat (Bártíková et al., 2012). Ale současně bylo v této práci prokázáno, že přítomnost ABZ měla vliv na aktivitu některých enzymů *H. diminuta*. Tento fakt poukazuje na to, že ABZ je schopný ovlivnit aktivitu enzymů *H. diminuta*, přestože není jejich substrátem. Výsledky této práce podpořily hypotézu, že enzymy metabolizující xenobiotika jsou spojeny se vznikem lékové rezistence u tasemnic.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bártíková, H., Vokřál, I., Skálová, L., Kubíček, V., Fírbasová, J., Briestenský, D., Lamka, J., Szotáková, B., 2012. The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 139, 809–18.
- Becker, D., Dickman, M., Banerjee, R., 2007. *Redox biochemistry*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Bogitsh, B.J., Oeltmann, T.N., Carter, and C.E., 2005. *Human Parasitology*, 3rd ed. Elsevier Science.
- Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S. V., Turanov, A.A., Protasio, A., Izemendi, D., Gladyshev, V.N., Salinas, G., 2008. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J. Biol. Chem.* 283, 17898–907.
- Brophy, P.M., Barrett, J., 1990. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 100 Pt 2, 345–9.
- Canacopegd.com, 2006. Stavba těla dospělé tasemnice. [WWW Document]. Aktual. dne 13.12.2017. Citováno dne 19.1.2018.  
URL <http://canacopegd.com/keyword/platyhelminthes-tapeworm.html>
- Ceballos, L., Krolewiecki, A., Juárez, M., Moreno, L., Schaer, F., Alvarez, L.I., Cimino, R., Walson, J., Lanusse, C.E., 2018. Assessment of serum pharmacokinetics and urinary excretion of albendazole and its metabolites in human volunteers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0005945.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2017. Životní cyklus *Hymenolepis diminuta*. [WWW Document]. Aktual. dne 13.12.2017. Citováno dne 19.1.2018.  
URL <http://canacopegd.com/keyword/platyhelminthes-tapeworm.html>
- Dash, B., Phillips, T.D., 2012. Molecular characterization of a catalase from *Hydra vulgaris*. *Gene* 501, 144–52.
- Dong, Y., Li, C., Zhang, Y., He, Q., Daud, M.K., Chen, J., Zhu, S., 2016. Glutathione S-Transferase Gene Family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*:

- Comparative Genomic Study and their Expression under Salt Stress. *Front. Plant Sci.* 7, 139.
- Eklund, H., Ramaswamy, S., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Three-dimensional structures of MDR alcohol dehydrogenases. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3907–17.
- Ekman, E., Faniband, M.H., Littorin, M., Maxe, M., Jönsson, B.A.G., Lindh, C.H., 2014. Determination of 5-hydroxythiabendazole in human urine as a biomarker of exposure to thiabendazole using LC/MS/MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 973C, 61–67.
- Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L. V., Okoh, A.I., 2017. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* 6, 1–14.
- Fujiwara, R., Yoda, E., Tukey, R.H., 2018. Species differences in drug glucuronidation: Humanized UDP-glucuronosyltransferase 1 mice and their application for predicting drug glucuronidation and drug-induced toxicity in humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 33, 9–16.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583–606.
- Hartl, J., Doležal, M., Miletín, M., Opletalová, V., Zimčík, P., 2012. FARMACEUTICKÁ CHEMIE IV. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Hollman, A.L., Tchounwou, P.B., Huang, H.-C., 2016. The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 379.
- Hong, X., Zheng, Y., Qin, Z., Wu, B., Dai, Y., Gao, H., Yao, Z., Gonzalez, F.J., Yao, X., 2017. In Vitro Glucuronidation of Wushanicaritin by Liver Microsomes, Intestine Microsomes and Expressed Human UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1983.
- Huang, F.-F., Chai, C.-L., Zhang, Z., Liu, Z.-H., Dai, F.-Y., Lu, C., Xiang, Z.-H., 2008. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*. *BMC Genomics*

9, 563.

- Huang, H.-H., Rigouin, C., Williams, D.L., 2012. The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development. *Curr. Pharm. Des.* 18, 3595–611.
- Jaeger, L.H., Carvalho-Costa, F.A., 2017. Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review. *BMC Vet. Res.* 13, 358.
- Karuna, T., Khadanga, S., 2013. A case of *Hymenolepis diminuta* in a young male from Odisha. *Trop. Parasitol.* 3, 145–7.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., 2012. *Basic and clinical pharmacology*, 12th ed. ed.
- Khan, A.A., Rahmani, A.H., Aldebasi, Y.H., Aly, S.M., 2014. Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Glob. J. Health Sci.* 6, 87–98.
- Knights, K.M., Rowland, A., Miners, J.O., 2013. Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76, 587–602.
- Laing, R., Bartley, D.J., Morrison, A.A., Rezansoff, A., Martinelli, A., Laing, S.T., Gilleard, J.S., 2015. The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 45, 243–251.
- Lamka, J., Ducháček, L., 2014. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Charles University in Prague, Karolinum Press, Prague.
- Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J., 2009. *Biochemie pro studující medicíny (I. a II. díl)*. Karolinum.
- Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., Skálová, L., 2016. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends Parasitol.* 32, 481–491.
- Miloš Langmeier a kolektiv, 2009. *Základy lékařské fyziologie*. Grada Publishing, a.s.
- Mindnich, R.D., Penning, T.M., 2009. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum. Genomics* 3, 362–70.

- Mkupasi, E.M., Sikasunge, C.S., Ngowi, H.A., Johansen, M.V., 2013. Efficacy and safety of anthelmintics tested against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2200.
- Neal, M.J., 2015. *Medical Pharmacology at a Glance*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Okello, A.L., Thomas, L.F., 2017. Human taeniasis: current insights into prevention and management strategies in endemic countries. *Risk Manag. Healthc. Policy* 10, 107–116.
- Pal, S., Dey, S.K., Saha, C., 2014. Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: a biophysical approach. *PLoS One* 9, e102460.
- Pan, J.-X., Ding, K., Wang, C.-Y., 2012. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells. *Chin. J. Cancer* 31, 178–84.
- Prast-Nielsen, S., Huang, H.-H., Williams, D.L., 2011. Thioredoxin glutathione reductase: its role in redox biology and potential as a target for drugs against neglected diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 1262–71.
- Prchal, L., Bártíková, H., Bečanová, A., Jirásko, R., Vokřál, I., Stuchlíková, L., Skálová, L., Kubíček, V., Lamka, J., Trejtnar, F., Szotáková, B., 2014. Biotransformation of anthelmintics and the activity of drug-metabolizing enzymes in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Parasitology* 142, 648–659.
- Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2016. *Rang and Dale's pharmacology*, 8th editio. ed. Elsevier churchill livingstone.
- Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipská, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V., 2011. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum.
- Smrž, J., 2014. *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Sreedevi, C., Ravi Kumar, P., Jyothisree, C., 2015. Hymenolepiosis in a group of albino rats (*Rattus albus*): a study. *J. Parasit. Dis.* 39, 321–3.
- SÚKL, 2018. Státní ústav pro kontrolu léčiv [WWW Document]. Databáze Aktual. dne



- 17.4.2018. Citováno dne 20.4.2018. URL <http://www.sukl.cz>
- ŠÚKL, 2018. Štátny ústav pre kontrolu liečiv [WWW Document]. Databáze Aktual. dne 15.4.2018. Citováno dne 20.4.2018. URL <http://www.sukl.sk>
- ÚSKVBL, 2017. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv [WWW Document]. Databáze Aktual. dne 2.3.2017. Citováno dne 20.4.2018. URL <http://www.uskvbl.cz>
- Vokřál, I., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Skálová, L., 2013. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 196, 373–81.
- wikimedia.org, 2009. Strukturní vzorec thiabendazolu. [WWW Document]. Publikováno dne 18.3.2009. Citováno dne 25.2.2018. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiabendazole>
- wikipedia.org, 2007. Strukturní vzorec prazikvantelu. [WWW Document]. publikováno dne 10.10.2007. Citováno dne 25.2.2018. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/Praziquantel>
- wikipedia.org, 2008. Strukturní vzorec mebendazolu. [WWW Document]. Publikováno dne 3.4.2008. Citováno dne 25.2.2018. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/Mebendazole>
- wikipedia.org, 2011. Strukturní vzorec albendazolu. [WWW Document]. Publikováno dne 17.12.2011. Citováno dne 25.2.2018. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/Albendazole>
- Yang, D., Zhao, W., Zhang, Y., Liu, A., 2017. Prevalence of *Hymenolepis nana* and *H. diminuta* from brown rats (*Rattus norvegicus*) in Heilongjiang Province, China. *Korean J. Parasitol.* 55, 351–355.