

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

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

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Karolína Lukačiková

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

Ráda bych chtěla poděkovat PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a cenné rady, prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. bych chtěla poděkovat za pomoc v experimentální části práce a Andree Krejzové za příjemnou spolupráci a konzultace.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Karolína Lukačiková

Školitel: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

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

Helmintorezistence je stále se rozšiřující celosvětový fenomén a znepokojující problém. Enzymy metabolizující xenobiotika hrají významnou roli v rozvoji rezistence, jelikož mohou snížit koncentraci anthelmintika v těle parazita a tak parazita ochránit před anthelmintickým účinkem. Role enzymů metabolizujících xenobiotika v rozvoji lékové rezistence byla již studována a popsána u hlístic a motolic. U tasemnic je však k dispozici o této problematice pouze omezené množství informací. V naší studii jsme se proto rozhodli ověřit, zda anthelmintikum mebendazol může ovlivnit u modelové tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika a tím pádem ovlivnit i rozvoj lékové rezistence.

Naším prvním cílem byla izolace jedinců tasemnice krysí z definitivního hostitele (potkan, *Rattus norvegicus*). Jako mezihostitele jsme použili potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Po úspěšné izolaci byly tasemnice po dobu 24 hodin inkubovány s mebendazolem (1 a 10 μ M) v médiu RPMI-1640 (5 % CO₂, 37 °C). Následně byly připraveny cytosolická, mikrosomální a mitochondriální frakce a stanoveny aktivity vybraných enzymů metabolizujících xenobiotika.

Výsledky naší studie naznačují, že tasemnice *H. diminuta* je schopna v reakci na přítomnost mebendazolu zvýšit aktivitu enzymů metabolizujících xenobiotika. V cytosolické frakci jsme pozorovali zvýšení aktivity katalasy, peroxidasy, aldo-ketoreduktasy 1A1, glutathion-S-transferasy. V mitochondriální frakci jsme pozorovali zvýšení aktivity aldo-ketoreduktasy 1C. Dále jsme pozorovali snížení aktivity glutathionreduktasy v cytosolické frakci, aldo-ketoreduktasy 1A1 a karbonylreduktasy v mitochondriální frakci.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Karolína Lukačiková

Supervisor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

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

The resistance of parasitic helminths to anthelmintic drugs is a growing worldwide phenomenon and a concerning issue. Xenobiotic metabolizing enzymes play an important role in drug resistance development as they can lower the concentration of the anthelmintics in the parasite's body and therefore protect the parasite from the anthelmintic effect. The role of drug metabolizing enzymes in drug resistance development has been already described in the group of roundworms and flukes. Limited information is available about this topic in tapeworms. In our study we decided to test the possibility of the anthelmintic mebendazole to affect the activity of these enzymes and possibly to influence the drug resistance development in rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*).

Our first goal was the isolation of adult tapeworms from the definitive host (rat, *Rattus norvegicus*). We used mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) as an intermediate host. After the successful isolation, adult tapeworms were incubated with the mebendazole (1 and 10 μ M) in RPMI-1640 medium (5 % CO₂, 37 °C) for 24 hours. Following the incubation cytosol-like, microsomes-like and mitochondria-like subcellular fractions were prepared and the activities of selected xenobiotic metabolizing enzymes were measured.

The results of our study indicate that the activity of certain xenobiotic metabolizing enzymes of rat tapeworm can be increased in reaction to mebendazole exposition. In the cytosol-like fraction we observed increased activity of catalase, peroxidase, superoxide dismutase, aldo-keto reductase 1A1, glutathione-S-transferase. In mitochondria-like fraction we observed increased activity of aldo-keto reductase 1C. Furthermore we observed decreased activity of glutathione reductase in cytosol-like fraction, aldo-keto reductase 1A1 and carbonyl reductase in mitochondria-like fraction.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Obecná charakteristika tasemnic	12
2.1.1	<i>Hymenolepis diminuta</i>	14
2.2	Benzimidazolová anthelmintika	17
2.2.1	Mebendazol	18
2.3	Rezistence helmintů na anthelmintika	20
2.4	Metabolismus xenobiotik u helmintů	22
2.4.1	Fáze I	22
2.4.2	Fáze II	25
2.4.3	Fáze III	27
3	CÍL PRÁCE	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	Materiál	30
4.1.1	Biologický materiál	30
4.1.2	Chemikálie	30
4.1.3	Pomůcky a přístroje	31
4.1.4	Spotřební materiál	31
4.2	Izolace jedinců tasemnice krysí z laboratorního potkana	32
4.3	Inkubace jedinců tasemnice krysí s mebendazolem	32
4.4	Příprava subcelulárních frakcí	33
4.5	BCA Stanovení bílkoviny	35
4.6	Stanovení aktivit enzymů	36
4.6.1	Stanovení aktivity karbonylreduktasy (CBR)	36
4.6.2	Stanovení aktivity aldo-ketoreduktasy 1A1 (AKR1A1)	37
4.6.3	Stanovení aktivity aldo-ketoreduktasy 1C (AKR1C)	38

4.6.4	Stanovení aktivity glutathionreduktasy (GR)	39
4.6.5	Stanovení aktivity katalasy	40
4.6.6	Stanovení aktivity peroxidasy	41
4.6.7	Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD).....	42
4.6.8	Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST).....	43
4.6.9	Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT).....	44
4.6.10	Stanovení aktivity UDP-glukosyltransferasy (UGlcT).....	45
4.7	Zpracování dat a statistická analýza	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Vliv na aktivitu enzymů v cytosolické frakci.....	47
5.1.1	Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v cytosolické frakci.....	47
5.1.2	Vliv na aktivitu redukčních enzymů v cytosolické frakci.....	48
5.1.3	Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v cytosolické frakci.....	49
5.2	Vliv na aktivitu enzymů v mikrosomální frakci.....	50
5.2.1	Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v mikrosomální frakci.....	50
5.2.2	Vliv na aktivitu redukčních enzymů v mikrosomální frakci.....	51
5.2.3	Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v mikrosomální frakci.....	52
5.3	Vliv na aktivitu enzymů v mitochondriální frakci	53
5.3.1	Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v mitochondriální frakci	53
5.3.2	Vliv na aktivitu redukčních enzymů v mitochondriální frakci	54
5.3.3	Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v mitochondriální frakci	55
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR.....	59
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
ABZ	albendazol
AKR	aldo-ketoreduktasa
BCA	bicinchoninová kyselina
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovinní sérový albumin
BSEP	bile salt export pump
CBR	karbonylreduktasa
CDNB	1-chlor-2,4-dinitrobenzen
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FBS	fetální bovinní sérum
FLU	flubendazol
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HEPES	hydroxyethylpiperazinethansulfonová kyselina
K	kontrolní skupina inkubovaná 24 hodin
KOH	kontrolní skupina v čase 0 hodin
MAPEG	membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
MATE	multidrug and toxic compound extrusion

MBZ	mebendazol
MBZ 1	skupina inkubovaná 24 hodin s 1mM mebendazolem
MBZ 10	skupina inkubovaná 24 hodin s 10mM mebendazolem
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance associated protein
MFS	major facilitator superfamily
MOP	monepantel
PBS	phosphate buffer saline (fosfátový pufr)
PEN	penicilin
RND	resistence nodulation division
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDR	reduktasy s krátkým řetězcem
SMR	small multidrug resistance
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SOD	superoxiddismutasa
STREP	streptomycin
TCA	trichloroctová kyselina
TCBZ	triklabendazol
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UDP-Glc	UDP-glukosa
UGlcT	UDP-glukosyltransferasa
UGT	UDP-glukuronyltransferasa
WST-1	sůl tetrazolinu

1 ÚVOD

Tasemnice (Cestoda) jsou obligatorní parazité a významní původci střevních i tkáňových helmintóz u lidí i zvířat. Pro léčbu těchto parazitických onemocnění byla vyvinuta účinná léčiva – anthelmintika. Nicméně díky dlouholetému používání těchto léčiv dochází u helmintů k rozvoji rezistence – helmintorezistence. Významnou roli v rozvoji helmintorezistence hrají enzymy metabolizující xenobiotika. Tyto enzymy představují obranu organismu před cizími látkami nevyužitelnými jako zdroj energie či stavební molekuly, které pro organismus mohou představovat potenciální riziko. Jelikož takovými látkami jsou i anthelmintika, enzymy metabolizující xenobiotika je mohou deaktivovat a bránit tak efektu léčby (Cvilink et al., 2009; James et al., 2009; Matoušková et al., 2016).

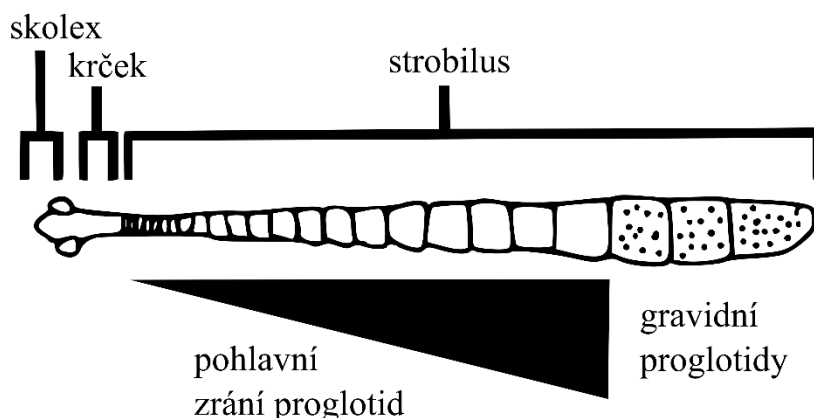
Mebendazol představuje hojně užívané širokospektré anthelmintikum, které je u helmintů deaktivováno působením reduktas (Bártíková et al., 2012; Matoušková et al., 2016). Metabolismus anthelmintik a aktivita xenobiotik metabolizujících enzymů již byly studovány, nicméně možnost ovlivnění aktivity těchto enzymů mebendazolem studována nebyla. My jsme se tuto možnost rozhodli ověřit u modelové tasemnice *Hymenolepis diminuta* a navázat tak na studii (Bártíková et al. 2012), ve které byl studován metabolismus flubendazolu a mebendazolu a aktivita vybraných biotransformačních enzymů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obecná charakteristika tasemnic

Tasemnice (*Cestoda*) jsou třídou červů náležící do kmene ploštěnců (*Platyhelminthes*). Jsou to obligatorní parazité, jejichž dospělé stádium žije výhradně v trávicím traktu obratlovců, včetně žlučového, žlučníku či vývodů pankreatu (Tanowitz et al., 2011).

Tělo tasemnic je charakteristicky protáhlé a dorsoventrálně zploštělé. Základní anatomické části tvoří hlavička (skolex), krček a tělo (strobilus), tvořené různým počtem článků (proglotidy) (Obr. 1).



Obr. 1 Schéma těla tasemnic. Upraveno dle (Rozario a Newmark, 2015)

Podle počtu článků se tasemnice mohou dělit na monozoické (tělo je tvořeno jedním článkem) či polyzoické (tělo je tvořeno několika či mnoha články). Řazení článků může být akraspedotní (jednoduché) nebo kraspedotní, kdy předcházející článek překrývá článek následující. Každý článek představuje samostatnou reprodukční jednotku obsahující samčí i samičí pohlavní orgány. Proglotidy mohou být pohlavně nezralé, zralé a gravidní. Nezralé proglotidy se nacházejí na frontálním konci těla, gravidní pak na konci distálním. Formováním nových proglotid u krčku dochází k posouvání maturujících proglotid. K oplodnění může dojít mezi dvěma jedinci nebo mezi dvěma články jedné tasemnice. Proglotida naplněná oplodněnými vajíčky je od zbytku těla uvolňována a odnášena se střevním obsahem (New World Encyclopedia contributors, 2009; Volf a Horák, 2007).

Hlavička tasemnice je uzpůsobena přichycení na střevní mukózu hostitele přítomností nejrůznějších přichycovacích orgánů. Těmi mohou být kruhové přísavky,

přísavné rýhy (botrie), zasunovací chobotek (rostellum), který může být navíc opatřený přichytnými háčky (Volf a Horák, 2007).

Vzhledem k vrcholné adaptaci tasemnic k parazitismu je u nich zcela redukován trávicí systém. Nutrienty z lumen trávicího traktu hostitele přijímají celým povrchem těla. Ten je tvořen syncytiálním tegumentem, jehož buňky s jádry se zanořují hluboko mezi další tělní vrstvy, především podpovrchovou svalovinu. Ta je tvořena svrchní cirkulární a vnitřní longitudinální vrstvou. Absorpční povrch tegumentu je znásoben přítomností cytoplazmatických vychlípenin - mikrotrichů, které lze přirovnat k mikroklkům enterocytů. Mikrotrichy jsou kryty glykokalyxem, který poskytuje tasemnici ochranu proti trávicím enzymům hostitele. Mohou mít také přichycovací funkci (Bogitsh et al., 2005; Smrž, 2014).

Exkreční a osmoregulační systém je u tasemnic tvořen plaménkovými buňkami a systémem odvodných kanálků. Odvodné kanály, dva ventrální a dva dorsální, prostupují celou délkou strobily. Ventrální kanálky vedou tekutinu směrem od skolexu, dorsální směrem ke skolexu. Ventrální kanálky na posteriorním konci každé proglotidy spojují transversální kanálek. V oblasti hlavičky jsou u některých tasemnic ventrální a dorsální kanálky propojeny. Popsána byla spojení formou složitých plexů, kruhového kanálku či jednoduchého spojení dorsálního a ventrálního kanálku na každé straně (Bogitsh et al., 2005).

Nervová soustava je tvořena centrálními ganglii ve skolexu, která představují tasemničí mozek. Z ganglií vybíhá systém krátkých anteriorních a posteriorních nervů bohatě inervujících různé části skolexu. Z centrálních ganglií dále vybíhá několik párů longitudinálních nervových vláken prostupujících celou délkou strobilu. Tato vlákna jsou v každé proglotidě propojena, což dává nervové soustavě žebříčkovitý charakter. Z longitudinálních nervových vláken a jejich spojů vybíhá systém krátkých nervů, které inervují svalovinu a reprodukční orgány. Z tegumentu se na longitudinální vlákna napojují senzorická vlákna (Bogitsh et al., 2005).

Tasemnice mají komplexní, zpravidla dvouhostitelské, životní cykly. Člověk může být nakažen jako definitivní hostitel u některých druhů tasemnic a u jiných druhů jako mezihostitel. Vzácně může být mezihostitelem i definitivním hostitelem u stejného druhu tasemnice. Z hlediska humánní a veterinární medicíny jsou nejvýznamnější dva řády tasemnic, a to řád šterbinovky (*Pseudophyllidea*) a řád kruhovky (*Cyclophyllidea*).

Infekce dospělými tasemnicemi mohou trvat několik let i po celý život hostitele. Mohou být dobře tolerované, relativně asymptomatické nebo mohou být doprovázeny perzistujícími symptomy a obírat hostitele o důležité nutrienty. Infekce larválním stádiem bývají závažného až fatálního charakteru (Bednář et al., 1996; Tanowitz et al., 2011).

Taenia saginata, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana* a *Diphyllobothrium latum* představují hlavní čtyři původce intestinálních cestodóz u člověka. Původci larválních cestodóz u člověka jsou především *Taenia solium*, způsobující cysticerkózu, a *Echinococcus granulosus*, způsobující echinokokózu (Bednář et al., 1996; Webb a Cabada, 2017).

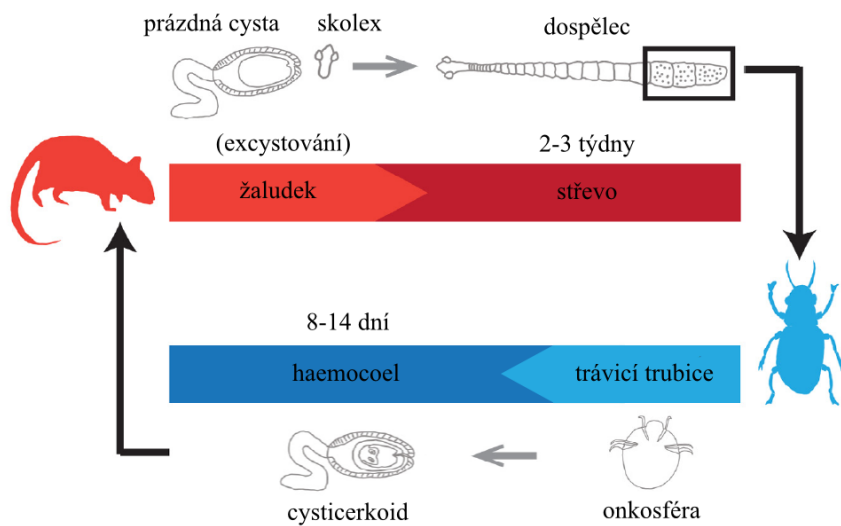
2.1.1 *Hymenolepis diminuta*

Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) je zástupce řádu kruhovek (*Cyclophillidea*), čeledi *Hymenolepidae*.

Délka dospělé se pohybuje v rozsahu 20-60 cm. Má protáhlé tělo válcovitého tvaru, které je proti ostatním tasemnicím nápadně absencí rostellárních háček na skolexu (Volf a Horák, 2007).

Životní cyklus *H. diminuta* je obligatorně dvouhostitelský. Jako mezihostitel se uplatňuje hmyz, nejčastěji brouci rodu *Tribolium* a *Tenebrio*. Definitivním hostitelem jsou hlodavci, a to primárně krysy. Vajíčka tasemnice jsou vylučována z těla definitivního hostitele trusem a pozřena mezihostitelem. Pozorován byl také přenos z brouka na brouka, kdy pozřením trusu infikovaného jedince byl infikován jedinec dosud neosídlený (Pappas a Barley, 1999). V trávicím traktu mezihostitele jsou z vajíček uvolňovány onkosféry - larvy, které migrují do tělní dutiny hmyzu (haemocoel), kde se diferencují do enkapsulovaného stádia (cysticerkoid). V tomto dormantním stádiu larva přetrvává, dokud není mezihostitel pozřen definitivním hostitelem. V žaludku a tenkém střevě potkana se tělo mezihostitele rozkládá a cysticerkoid je uvolněn do trávicího traktu. V reakci na chemické prostředí trávicího traktu dochází k excystování a uvolnění skolexu. Pomocí přísavek se tasemnice přichycuje k intestinální stěně a během 20 dnů dospívá. Dospělý jedinec je schopen vyprodukovat až 250 000 vajíček denně. Vajíčka

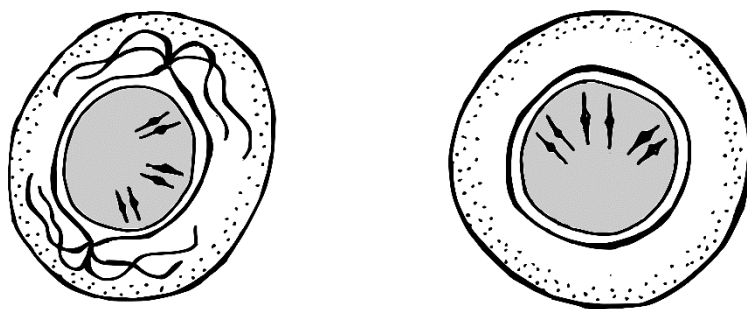
jsou ve střevním lumen uvolňována oddělením a rozložením zralých proglotid (CDC - DPDx, 2017; Dewey, 2001). Životní cyklus je znázorněn na schématu (Obr. 2).



Obr. 2 Životní cyklus tasemnice *Hymenolepis diminuta*. Upraveno podle (Rozario a Newmark, 2015)

Člověk, ačkoliv není primárním hostitelem, může být infikován požitím mezihostitele obsahujícího cysticerkoid přímo z prostředí či v potravě, jako je sušené ovoce či cereálie. Infekce tasemnicí *H. diminuta* se manifestuje jako hymenolepióza. Původcem hymenolepiózy může být i příbuzná tasemnice dětská (*Hymenolepis nana*). Infekce zpravidla probíhá asymptomaticky, ale mohou se objevit symptomy jako bolest břicha, průjem, bolest hlavy, pruritus či dokonce anorexie. Ačkoliv jsou případy nakažení člověka vzácné i v zemích třetího světa, byly dokumentovány případy infikovaných dětí i ve vyspělých zemích (Kołodziej et al., 2014; Patamia et al., 2010; Tena et al., 1998).

Diagnóza se opírá o nalezení a identifikaci vajíček *H. diminuta* ve stolici nakaženého jedince. Vajíčka *H. diminuta* jsou kruhovitě až mírně oválného tvaru a měří 60-79 μm . Obsahují onkosféru se šesti háčky a prázdný prostor vyplněný želatinózní matrix mezi onkosférou a vnějším obalem. Vajíčka *H. diminuta* jsou velmi podobná vajíčkům *H. nana*. Zásadní rozdíl pro diferenciální diagnostiku proti *H. nana* tkví v nepřítomnosti polárních filament v matrix. Rozdíl je patrný z následujícího nákresu (Obr. 3) (Garcia, 2006).



Obr. 3 Vajíčko *Hymenolepis nana* (vlevo) a *Hymenolepis diminuta* (vpravo). Překresleno dle (Garcia, 2006)

Lékem volby je prazikvantel v jednorázové perorální dávce 25 mg/kg. Alternativu představuje nitazoxanid či niklosamid (Pearson, 2016).

Význam *H. diminuta* spočívá především v jejím využití jako laboratorního modelu. Díky svému životnímu cyklu, který je zcela reprodukovatelný v laboratorních podmínkách, je vhodným modelem pro studium biologie tasemnic (Rozario a Newmark, 2015). Zkoumána je také možnost využití *H. diminuta* jako součást helmintoterapie, která spočívá v cíleném infikování jedince helmintem za účelem prevence či kontroly nejen zánětlivých onemocnění střev, ale i jiných onemocnění s imunologickým podkladem jako jsou alergie, astma či závažné choroby autoimunitního charakteru (Melon et al., 2010).

2.2 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazolová anthelmintika jsou jednou z nejběžněji používaných skupin anthelmintik. Jsou aktivní proti širokému spektru helmintů a jsou využívána jak ve veterinární, tak v humánní medicíně. Některé benzimidazolové sloučeniny jsou používány dokonce i v zemědělství pro kontrolu parazitických helmintů rostlin či jako fungicidy (Junquera, 2017).

Prvním benzimidazolovým anthelmintikem byl thiabendazol. Syntetizován byl v šedesátých letech dvacátého století. Jeho chemickou modifikací byli v zápětí vyvinuti další zástupci, a to fenbendazol, oxfenbendazol a oxibendazol. Nejznámějšími zástupci skupiny jsou dnes albendazol a mebendazol. Proti prvním benzimidazolovým anthelmintikům, která jsou účinná především proti gastrointestinálním hlísticím, mají spektrum účinku rozšířené o tasemnice a respirační hlístice. Albendazol je navíc účinný také proti ostatním non-gastrointestinálním hlísticím a dospělým motolice jaterní (*Fasciola hepatica*). V tomto ohledu je zajímavý triklabendazol, který není účinný proti hlísticím či tasemnicím, ale je účinný proti larválním i dospělým stádiím trematod. Pro-benzimidazoly jsou proléčiva benzimidazolových anthelmintik. Patří sem febantel, netobimin a thiofamát. V hostitelském organismu jsou přeměňovány na aktivní sloučeniny, febantel je proléčivem fenbendazolu, netobimin je proléčivem albendazolu. Proti aktivním sloučeninám jsou více rozpustné ve vodě (Furtado et al., 2016; Junquera, 2017).

Benzimidazolová anthelmintika mají společnou chemickou strukturu lišící se pouze ve vedlejších skupinách. Vedlejší skupiny přímo souvisí s jejich toxicitou. Používání thiabendazolu, který má v poloze 2 navázaný thiazolový kruh, bylo pro jeho značnou toxicitu omezeno (Furtado et al., 2016; Junquera, 2017).

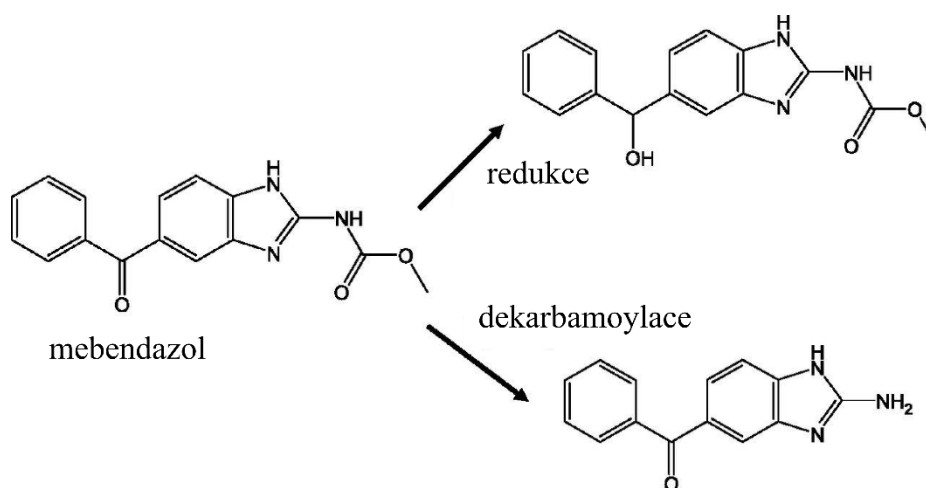
Mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik spočívá v inhibici formování mikrotubulů. Mikrotubuly jsou buněčné organely mající důležitou funkci v procesech, jako je mitóza, buněčná motilita, intracelulární transport či buněčná sekrece. Jsou kontinuálně formovány polymerizací heterodimerické bílkoviny tubulinu na jednom konci, zatímco na konci druhém dochází k depolymerizaci. Dimer tubulinu se skládá ze dvou příbuzných bílkovinných podjednotek, a to α -tubulinu a β -tubulinu. Právě β -tubulin je cílem benzimidazolových anthelmintik. Molekula benzimidazolu se na β -tubulin váže ve chvíli, kdy je heterodimer tubulinu při depolymerizaci oddělován

od mikrotubulu, což vede ke zkracování a úplnému vymizení mikrotubulu. Výsledkem ztráty mikrotubulů je neschopnost buněk tegumentu tasemnic a intestinálních buněk hlístic přijímat glukózu, což vede k vyčerpání zásob glykogenu, paralýze až smrti červa. Jelikož jsou mikrotubuly nepostradatelné pro buněčnou homeostázu, jejich ztráta způsobí smrt u všech forem parazitárního červa. Benzimidazolová anthelmintika tak můžeme označit za ovicidní, larvicidní i adulticidní (Martin, 1997).

2.2.1 Mebendazol

Mebendazol (MBZ), chemicky methyl-[5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát, je širokospektré benzimidazolové anthelmintikum, které je v humánní i veterinární medicíně používané přes 20 let.

Biologická dostupnost MBZ je nízká (max. 22 %), ale potrava bohatá na tuky může jeho absorpci zvyšovat. Látka je špatně rozpustná ve vodě a podléhá extenzivnímu first pass metabolismu ve střevní stěně a játrech. Až z 95 % se váže na plasmatické bílkoviny. Hlavní produkty metabolismu vznikají v první fázi redukcí ketoskupiny na hydroxylovou a dekarbamoylací na imidazolovém kruhu (Obr. 4). Ve druhé fázi tyto metabolity podléhají konjugaci. Žádný ze vznikajících metabolitů není farmakologicky aktivní. Metabolity jsou vylučovány žlučí i močí (Dayan, 2003).



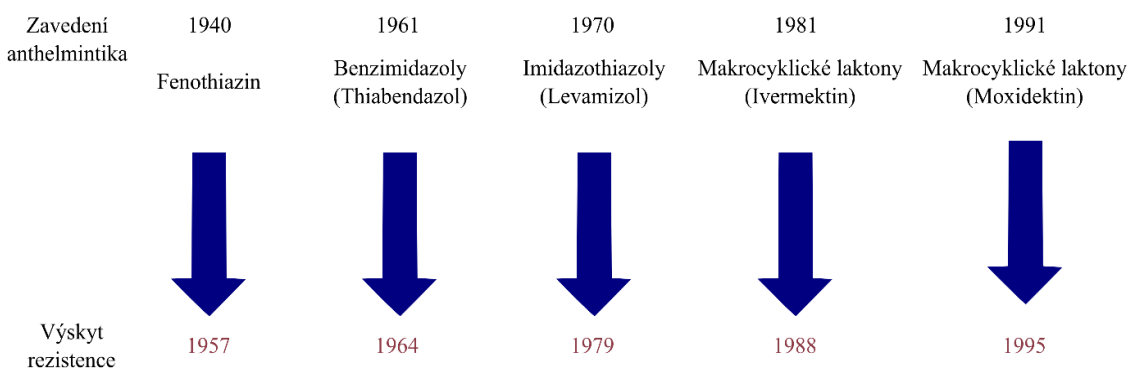
Obr. 4 Metabolismus 1. fáze mebendazolu. Upraveno dle (Nishimuta et al., 2013)

Ve veterinární medicíně je MBZ indikován u koní v dávce 8,8 mg/kg a v dávce 15 mg/kg u ovcí a koz. V humánní medicíně se používá především k léčbě intestinálních nematodóz a echinokokózy. Doporučené dávkování u člověka je 100 mg v jednorázové orální dávce, která může být po 2 až 3 týdnech zopakována. U některých tropických

onemocnění může být podáváno 100 mg dvakrát denně po dobu 3 dnů, nebo může být podáno 500-600 mg jednorázově. Nežádoucí účinky mohou být průjemy, mírné abdominální bolesti až poškození jater a útlum kostní dřeně u dlouhodobých vysokodávkových režimů. Kvůli riziku teratogenity je kontraindikován v těhotenství (EMA-European Medicines Evaluation Agency, 2001).

2.3 Rezistence helmintů na anthelmintika

Rezistence parazitických helmintů k anthelmintikům je stále se rozšiřující fenomén a představuje vzrůstající problém, který snižuje produktivitu živočišné výroby a také ohrožuje úspěšnost léčby u lidí. Intenzivní používání anthelmintik u hospodářských zvířat vyústilo k rozšířené rezistenci na všechna známá anthelmintika. Jak je vidět z obrázku (Obr. 5), první výskyty rezistence jsou dokumentovány jen několik let po zavedení anthelmintika.



Obr. 5 Vývoj rezistence k anthelmintikům. Upraveno dle (James et al., 2009)

Jako rezistenci označujeme situaci, kdy citlivá populace vykazuje jakékoli snížení odpovědi na léčbu a je kompletní, když maximální dávka léčiva tolerovatelná hostitelem nemá žádný efekt. Snížení odpovědi na léčbu se nicméně může manifestovat různými způsoby, a to jako dědičné snížení efektivity anthelmintika proti populaci parazita, který na léčbu anthelmintikem obecně odpovídá, nebo jako snížení doby, po kterou léčba anthelmintikem vykazuje efekt, tedy když je u rezistentních populací vyžadována častější léčba než dříve. Rezistenci lze také charakterizovat jako zvýšení počtu organismů nesoucích gen spojovaný s rezistencí v populaci. Rezistence může vznikat selekcí primárně rezistentních organismů nebo dědičnými změnami odpovědi na léčivo a následnou selekcí pod tlakem léčiva. Tyto změny mohou být charakteru genetického či epigenetického (James et al., 2009).

Rezistence může vznikat mnoha mechanismy. Jednou z možných příčin mohou být změny v cílových strukturách léčiva zapříčiněné změnami v genové sekvenci. Mnohdy se mluví o jednonukleotidových polymorfismech (single-nucleotide polymorphism, SNP), které mohou vést k substituci aminokyseliny v cílové struktuře léčiva a tedy změně afinity léčiva k této struktuře (James et al., 2009). SNP byly popsány u nematod rezistentních na benzimidazolová anthelmintika. Změny v kodonech 167, 198 a 200 genu

kódujícího β -tubulin jsou zodpovědné za konformační změny tohoto proteinu a brání interakci benzimidazolu s vazebným místem. Změny kodonů v pozicích 167 a 200 vedou k substituci fenylalaninu tyrosinem, kdežto změna kodonu v pozici 198 vede k substituci glutamové kyseliny alaninem (Furtado et al., 2016).

Dalšími prostředky podílejícími se na rozvoji resistance mohou být efluxní transportéry a enzymy metabolizující xenobiotika (James et al., 2009).

2.4 Metabolismus xenobiotik u helmintů

Xenobiotika jsou organismu cizí látky syntetického i přírodního původu, které nemohou sloužit jako zdroj energie či jako prekurzor endogenních molekul. Často se jedná o polutanty, aditiva či právě o léčivé látky. Xenobiotika představují pro organismus potenciální nebezpečí, proto se vyvinul systém jejich detoxifikace - enzymy metabolizující xenobiotika. Jelikož jsou xenobiotika především lipofilní sloučeniny, které se snadno vstřebávají a těžko vylučují, je cílem enzymů metabolizujících xenobiotika jejich přeměna na hydrofilnější sloučeniny, které hůře pronikají do dalších tkání, omezeněji interagují s biomakromolekulami, a které lze z organismu snadněji vyloučit (Skálová a Boušová, 2013).

Metabolismus xenobiotik dělíme do tří fází. První fázi představuje oxidace, redukce či hydrolýza, jejichž cílem je odkrytí či inserce hydrofilních funkčních skupin do struktury xenobiotika. Ve druhé fázi podléhají xenobiotika či jejich metabolity konjugaci s endogenními sloučeninami, jako je glutathion (GSH), glukuronová kyselina či aminokyseliny. Za třetí fázi metabolismu xenobiotik je považován aktivní transport přes membránu pomocí proteinových transportérů (Matoušková et al., 2016).

2.4.1 Fáze I

Nejdůležitější enzymy první fáze jsou cytochromy P450 (CYP). Jedná se o nadrodinu hemoproteinů, která je dále klasifikována do rodin a podrodin. U bakterií, hub, hmyzu, rostlin i obratlovců katalyzují většinu oxidačních reakcí. Typicky fungují jako monooxygenasy, tedy katalyzují hydroxylace, dealkylace, epoxidace, dekarboxylace, izomerizace, ale mohou zastávat i funkci peroxidas či reductas. Důležitou roli hrají také v endogenním metabolismu steroidů, mastných kyselin a prostaglandinů (Cvilink et al., 2009; Matoušková et al., 2016).

Na subcelulární úrovni se CYP nacházejí zejména v mikrosomech – buněčných organelách, které jsou formovány po porušení endoplasmatického retikula. Nacházejí se také na buněčných membránách a membránách mitochondrií (Anzenbacher a Zanger, 2012).

Detekce monooxygenasové aktivity CYP byly u helmintů dlouho neúspěšné a helminti byly tak považováni za výjimečné organismy bez CYP. Změna nastala s pokrokem v genetické analýze, která prokázala existenci genů kódujících CYP v genomu háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*), nepatogenní hlístice hojně

využívané jako modelový organismus. U háďátka bylo identifikováno okolo 80 genů kódujících CYP (Cvilink et al., 2009). U jiných helmintů jako je krevnička střešní (*Schistosoma mansoni*), krevnička močová (*Schistosoma haematobium*), motolice játerní (*Fasciola hepatica*) či motolice psí (*Opistorchis felineus*) byly nalezeny pouze 1 či 2 geny (Matoušková et al., 2016). Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) má mnoho genů kódujících CYP a jejich exprese závisí na stádiu hlístice (Laing et al., 2015).

Pokrok nastal také v detekci typické monooxygenasové aktivity CYP. Pomocí modelových substrátů aldrinu, který podléhá epoxidaci, a ethoxykumarinu, který podléhá deethylaci, byla monooxygenasová aktivita detekována u *H. contortus* (Kotze, 2000, 1997). U *S. mansoni* byla oxidasová aktivita cytochromu prokázána pomocí variety modelových substrátů (aminopyrin, ethylmorfin, benzfetamin, N-nitrosyldimethylamin, anilin, pentoxyresorufin). V případě *S. haematobium* byla prokázána aktivita pouze u substrátu aminopyrinu (Saeed et al., 2002).

I přes nízký počet CYP genů byly u helmintů pozorovány oxidace některých anthelmintik, které jsou spojovány s rezistencí helmintů na tyto léčiva. Albendazol (ABZ) byl oxidován na ABZ-sulfoxid u nematod *C. elegans* (Laing et al., 2010) a *H. contortus* (Cvilink et al., 2008), u motolic motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) (Cvilink et al., 2009) a motolice obrovské (*Fascioloides magna*) (Prchal et al., 2016) a u tasemnic tasemnice ovčí (*Monezia expanza*) (Prchal et al. 2015) a *Mesocestoides vogae* (Munguía et al., 2015). Zajímavé je, že u tasemnice *H. diminuta* tato biotransformace pozorována nebyla (Bártíková et al. 2012). U *F. hepatica* byl triklabendazol (TCBZ) metabolizován na TCBZ-sulfoxid a TCBZ-sulfon, tyto reakce byly navíc indukovány u rezistentních kmenů (Brennan et al., 2007). Inkubací s ketokonazolem, jakožto inhibitorem cytochromu, byla zvýšena odpověď rezistentní *F. hepatica* na léčbu TCBZ. (Devine et al., 2012) Podobně byla pozorována oxidace monepantelu (MOP) na MOP-sulfoxid a MOP-sulfon a sulfoxidace fenbendazolu u *H. contortus* (Stuchlikova et al., 2014).

Na biotransformaci xenobiotik u helmintů se, stejně jako u savců, podílí také peroxidasy. Peroxidasy jsou primárně antioxidační enzymy, které chrání helminta před oxidačním stresem. Přítomnost helminta v hostitelském organismu vede k aktivaci imunitního systému hostitele a zvýšení produkce volných radikálů. Před hostitelskými oxidanty helminta chrání také další enzymy – superoxiddismutasa (SOD), katalasa,

glutathionperoxidasa, xantinoxidasa, cytochrom c peroxidasa a peroxiredoxiny (Cvilink et al., 2009). Aktivita peroxidasy, SOD, katalasy a glutathionreduktasy (GR) byla dokázána u *D. dendriticum*, *M. expansa* (Bártíková et al., 2010; Prchal et al., 2014). U *H. contortus* i *H. diminuta* byla pozorována aktivita peroxidasy, katalasy a SOD (Bártíková et al. 2012; Vokřál et al. 2013).

Reduktasy a hydrolasy byly proti oxidasám považovány za důležité biotransformační enzymy helmintů již po mnoho let. Redukční metabolismus je důležitý zejména u sloučenin s karbonylovou funkční skupinou, jelikož představují kvůli své toxicitě a reaktivitě riziko pro organismus. Aldehydy a ketony jsou metabolizovány reduktasami, které klasifikujeme do několika tříd včetně reduktas s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-ketoreduktas (AKR). Jejich význam do určité míry potvrzují i počty genů kódujících AKR a SDR nalezených u helmintů, které převyšují počty nalezených genů kódujících CYP (Matoušková et al., 2016).

AKR jsou rozpustné enzymy využívající NAD(P)H jako kofaktor pro redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Jsou to oxidoreduktasy, reakce tedy mohou probíhat v obou směrech, nicméně AKR preferenčně katalyzují redukci. SDR jsou početnou nadrodinou enzymů strukturně velmi odlišných od AKR. Významnými zástupci SDR jsou karbonylreduktasy (CBR) (Anzenbacher a Zanger 2012; Skálová a Boušová. 2013).

Redukce karbonylových skupin byla studována u *H. contortus*. Bylo použito několik modelových substrátů: D,L-glyceraldehyd a daunorubicin jako modelové substráty AKR1A a CBR, acenaftenol jako substrát AKR1C, metyrapon jako substrát pro cytosolické AKR1A, AKR1C a CBR a mikrosomální 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasu a oracin jako univerzální modelový substrát. Všechny modelové substráty byly metabolizovány (Cvilink et al. 2008). Homogenáty *H. diminuta* také redukují modelové aldehydy, a to acetaldehyd, glyceraldehyd a *p*-nitrobenzaldehyd (Munir a Barrett, 1985). V novější studii byla prokázána redukce i dalších modelových substrátů (4-pyridinkarboxaldehydu, acenaftenolu a oracinu). Navíc byla u *H. diminuta* prokázána redukce karbonylové skupiny u anthelmintik MBZ a flubendazolu (FLU) (Bártíková et al. 2012). Totéž bylo dokázáno i u dalších parazitických helmintů – *H. contortus* (Vokřál et al., 2010), *M. expansa* (Prchal et al. 2014). Redukce MBZ byla potvrzena i u *F. magna* (Prchal et al. 2015).

2.4.2 Fáze II

Mezi známé reakce druhé fáze metabolismu xenobiotik patří glukuronidace, sulfonace, acetylace, metylace, glukosidace, konjugace s GSH a konjugace s aminokyselinami. U helmintů jsou z konjugačních enzymů dobře prozkoumány zejména glutathion-S-transferasy (GST). Ostatní enzymy jsou v porovnání opomíjeny (Cvilink et al. 2009).

Enzymy nadrodiny GST jsou cytosolické, mikrosomální i mitochondriální. U savců se cytosolické (rozpuštěné) GST klasifikují do osmi tříd (alfa, mí, pí, kappa, omega, sigma, théta, zéta). Mikrosomální GST jsou také označovány jako MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism). Hlavní aktivitou GST je konjugace elektrofilních substancí s tripeptidem GSH, ale jsou spojovány i s jinými aktivitami, jako je biosyntéza sterolů a leukotrienů, degradace peroxidů či izomerizace (Anzenbacher a Zanger, 2012).

U helmintů se GST účastní detoxifikace lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin vzniklých oxidačním stresem. Bylo izolováno několik isoform enzymu, i několik genů kódujících tento enzym u cestod *Echinococcus granulosus* a *T. solium*, u nematod *Setaria digitate* a *Necator americanus* a u trematoda *Fasciola gigantica*. Všechny GST měly vysokou aktivitu vůči modelovému substrátu 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB). Nicméně dosud nebyly u helmintů identifikovány žádné konjugáty GSH s anthelmintikem. Díky tomu se můžeme domnívat, že GST helmintům slouží spíše jako protein nespecificky vyvazující xenobiotika než jako konjugační enzym (Matoušková et al., 2016).

Vysoká aktivita GST byla pozorována u *M. expansa* (Prchal et al., 2014).

U *H. diminuta* byly izolovány 4 isoformy GST. Více než 95 % GST aktivity s modelovým substrátem CDBN bylo detekováno v cytosolické frakci proti frakci mikrosomální. Nebyla detekována žádná aktivita s kumenhydroperoxidem, který je modelovým substrátem alfa třídy savčích GST, ani s etakrynovou kyselinou, modelovým substrátem alfa a pí třídy (Brophy a Barrett, 1990). V novější studii byla potvrzena vysoká aktivita GST v cytosolické frakci. Zároveň, podobně jako v předchozích studiích, ale nebyly nalezeny žádné konjugáty zkoušených léčiv (ABZ, FLU, MBZ) s GSH (Bártíková et al. 2012).

I jiné transferasy (N-acetyltransferasa, methyltransferasa, sulfotranseferasa) kazalyzují konjugační reakce xenobiotik i eobiotik u savců. Jejich přítomnost u helmintů byla předpověděna sekvenováním genomu *C. elegans*, nicméně výskyt těchto enzymů je u helmintů dokumentován sporadicky. N-acetyltransferasová aktivita byla detekována u *Brugia pahangi*, *Ascaridia galli*, *Ascaris suum*, *Onchocerca volvulus*, *F. hepatica* a *C. elegans* (Cvilink et al. 2009). U *C. elegans* byla pozorována také sulfonace strukturních proteinů (Kim et al., 2005). Sulfotransferasová aktivita byla nalezena u *S. mansoni* (Pica-Mattoccia et al., 2006). Naopak žádná sulfotransferasová aktivita nebyla detekována u *H. diminuta* (Raines a Barrett, 1988).

Dalšími konjugačními enzymy jsou UDP-glykosyltransferasy. Katalyzují tvorbu glykosidické vazby mezi hexosovým zbytkem a lipofilní sloučeninou. Hlavními reakcemi katalyzovanými těmito enzymy jsou UDP-glukuronidace a UDP-glukosylace, které využívají UDP-glukuronové kyseliny a UDP-glukosy jako kofaktorů. Savci využívají také UDP-galaktosu, UDP-N-acetylglukosamin, UDP-N-acetylgalaktosamin a UDP-xylosu (Anzenbacher a Zanger, 2012). Glukuronidace je důležitá eliminační cesta mnoha lipofilních produktů metabolismu a xenobiotik u savců. Glukosidace je u obratlovců méně častá, nicméně je velmi významná u rostlin a bakterií (Matoušková et al., 2016). Glukosidace jako deaktivující reakce benzimidazolových anthelmintik ABZ a FLU byla detekována u *C. elegans* (Laing et al., 2010) a *H. contortus* (Vokřál et al., 2012). Význam UGT pro rezistenci helmintů na anthelmintika byl naznačen několika studiemi. Například rezistentní kmeny *H. contortus* produkovaly daleko větší množství konjugátů glukosy s ABZ a FLU než kmeny odpovídající na léčbu anthelmintiky (Vokřál et al., 2012). U *M. expansa* byla detekována UGT aktivita vůči modelovým substrátům, ale konjugáty glukosy či glukuronové kyseliny s ABZ, FLU ani MBZ nebyly dokázány (Prchal et al. 2015). Podobně byla aktivita pozorována u *H. diminuta*, ale žádné konjugáty s anthelmintiky nebyly detekovány (Bártíková et al. 2012).

U *H. contortus* bylo detekováno 34 genů kódujících UGT. Nicméně u tasemnic *Echinococcus multiocularis*, *E. granulosus*, *T. solium* a *H. microstoma* nebyly detekovány žádné geny kódující UGT (Matoušková et al., 2016).

2.4.3 Fáze III

Za třetí fázi biotransformace xenobiotik se nyní považuje jejich transport. Transportéry, membránově vázané proteiny přenášející sloučeniny přes membrány, můžeme dělit na influxní a efluxní. Zejména transportérům druhého typu je připisován velký význam v lékové rezistenci a jsou tak daleko více prozkoumány. Existuje pět rodin efluxních transportérů: ABC (ATP-binding cassette) transportéry, MATE (multidrug and toxic compound extrusion) transportéry, MFS (major facilitator superfamily) transportéry, RND (resistance nodulation division) transportéry a SMR (small multidrug resistance) transportéry (Matoušková et al., 2016).

Z pohledu lékové rezistence jsou nejvíce prozkoumány ABC transportéry, jako je ABCB1, známý též jako P-glykoprotein či MDR 1 (multidrug resistance protein 1), ABCC1 (multidrug resistance associated protein 1, MRP1) či ABCG2, spíše známý jako BCRP (breast cancer resistance protein) (Saier et al., 2014). ABC transportéry jsou všudypřítomné, nalezeny byly u všech typů buněk od mikrobů po člověka. Skládají se ze čtyř domén - dvě transmembránové a dvě domény vázající nukleotidy. Při transportu dochází ke konformačním změnám. Transport začíná interakcí se substrátem, následuje vazba ATP, která aktivuje konformační změny a vede k přesunutí substrátu. Po hydrolýze ATP je transportér regenerován do původního stavu (Higgins, 2001).

U helmintů byly ABC transportéry poprvé identifikovány u *C. elegans*, kde se jednalo o několik homologů P-glykoproteinu (Lincke et al., 1992). Dodnes bylo v genomu *C. elegans* identifikováno na 60 genů kódujících ABC transportéry (Matoušková et al., 2016). U nematod byly ABC transportéry nalezeny u celé řady helmintů. Navíc, byla prokázána jejich role v lékové rezistenci na makrocyclické laktony, zejména ivermektin (Godoy et al., 2015). U trematod rodu *Schistosoma* bylo nalezeno okolo 20 genů kódujících ABC transportéry. Prazikvantel se ukázal jako substrát i inhibitor P-glykoproteinu SMDR2 u *S. mansoni* (Kasinathan et al., 2010). Navíc byla exprese tohoto P-glykoproteinu vyšší u rezistentních kmenů (Messerli et al., 2010). U *F. gigantica* byly identifikovány 4 ABC transportéry, a to P-glykoprotein, MRP1, BCRP a BSEP (bile salt export pump, ABCB11). Exprese MRP1 a BSEP byla upregulována v přítomnosti TCBZ, což naznačuje jejich roli v exportu anthelmintik (Kumkate et al., 2008). Evidence aktivního efluxu byla pozorována také u *D. dendriticum*, která aktivně transportovala ABZ. U ABZ je známo, že není

substrátem P-glykoproteinu, jednalo se tak s nejvyšší pravděpodobností o jiný efluxní transportér (Bártíková et al., 2011).

U tasemnic není o efluxních transportérech k dispozici mnoho informací. Publikované genomy přítomnost genů kódujících transportéry naznačují. Například genom *H. microstoma* obsahuje 18 genů kódujících ABC transportéry a 4 geny kódující MATE transportéry (Matoušková et al., 2016). Důkaz, že ABC transportéry tasemnic mohou interagovat s modelovými substráty, přinesla studie (Nicolao et al., 2014), kde *E. granulosus* vykazoval schopnost efluxu modelového substrátu pro P-glykoprotein a MRP1, který byl také inhibován známými inhibitory P-glykoproteinu.

3 CÍL PRÁCE

Tato práce má za hlavní cíle:

- Ověřit možnost ovlivnění aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika mebendazolem u tasemnice krysí (*H. diminuta*)
- Přiblížit roli enzymů metabolizujících xenobiotika v rozvoji helmintorezistence u tohoto parazita

K dosažení hlavních cílů bylo nutné splnit následující dílčí cíle:

- Izolovat jedince tasemnice *H. diminuta* z definitivního hostitele potkana laboratorního (*Rattus norvegicus*) za využití mezihostitele potměníka moučného (*Tenebrio molitor*)
- Inkubovat izolované tasemnice s 1 μ M a 10 μ M mebendazolem po dobu 24 hodin a připravit subcelulární frakce
- Stanovit aktivity vybraných enzymů v připravených subcelulárních frakcích a získané výsledky podrobit statistické analýze

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

- Potkan laboratorní (*Rattus norvegicus*, kmen Wistar), 6 jedinců
- Potemník moučný (*Tenebrio molitor*)
- Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*)

4.1.2 Chemikálie

- 4-pyridinkarboxaldehyd (Sigma-Aldrich)
- Acenaftenol (Sigma-Aldrich)
- Anilin (Sigma-Aldrich)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- CDNB (Fluka)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- FBS (Sigma-Aldrich)
- GSH (Sigma-Aldrich)
- GSSG (Koch Light Laboratories)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Inkubační médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- Mebendazol (Fluka)
- Menadion (Sigma-Aldrich)
- Molybdenan amonný (Lachema)
- NADP⁺ (Serva)
- NADPH (Serva)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich)
- *p*-nitrofenol (Fluka)
- PEN/STREP (Sigma-Aldrich)
- Pyrokatechol (Lachema)
- SOD Assay Kit (Sigma)
- UDP-GA (Sigma)
- UDP-Glc (Sigma)
- Ostatní běžné chemikálie (Sigma-Aldrich, Penta)

4.1.3 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 22
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- Centrifugační kyvety
- Laboratorní nádobí (kádinky, petriho misky, lahve a další)
- Laboratorní váhy Kern KB
- Magnetická míchačka Colour Squid IKA
- Mikrocentrifuga PlateFuge BenchMark
- MS2 Minishaker IKA
- Nádoby na led
- pH Metr WTW InoLab Level 2
- Pipety Finnpiquette, Biohit MLine
- Potter S homogenizátor 30 ml s pístem - B. Braun Biotech International
- Spektrofotometr Tecan Infinite M 200
- Thermomixer comfort Eppendorf
- Ultracentrifuga AVANTI J-30I – Beckman Coulter
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Bandelin

4.1.4 Spotřební materiál

- Mikrotitrační destičky GAMA
- Mikrotitrační destičky GREINER
- Mikrozkuřavky Eppendorf Safe-Lock
- Špičky Sartorius Biohit, Neptune, Eppendorf

4.2 Izolace jedinců tasemnice krysí z laboratorního potkana

K experimentům bylo v prvním kroku nutné získat dospělé jedince tasemnice *H. diminuta*. Pro jejich izolaci bylo nutné infikovat laboratorní potkany (*R. norvegicus*, kmen Wistar), kteří jsou jakožto definitivní hostitelé tasemnice nutní k jejich dospívání. V experimentu bylo použito 6 potkanů. Po uspání etherovou anestezií bylo zvířatům pomocí gastrointestinální sondy aplikováno 12 cysticerkoidů v 0,5 ml fyziologického roztoku. Tyto cysticerkoidy byly získány z infikovaného mezihostitele, potemníka moučného (*T. molitor*), kdy ve fyziologickém roztoku byly za použití optického mikroskopu vypitvány vnitřnosti a z nich izolovány cysticerkoidy. Potkani byli po dobu 3 týdnů za standardních podmínek chování ve viváriu nejprve ve společném kotci, poté musel být jeden jedinec od skupinky oddělen pro agresivní chování zbytku skupiny.

Po třech týdnech byl odebrán trus skupiny 5 potkanů a odděleného jednotlivce. Odebraný trus byl po rozmělnění v redestilované vodě na Petriho misce opticky kontrolován na přítomnost vajíček. U všech vzorků byla přítomnost vajíček potvrzena. Pro kontrolu byli potkani následně umístěni po jednom do samostatných klecí a po dalším týdnu byly opět odebrány vzorky trusu a následně kontrolovány na přítomnost vajíček. Nalezením vajíček v trusu každého z 6 potkanů byla potvrzena přítomnost dospělých tasemnic ve střevech všech infikovaných potkanů a mohlo se přistoupit k izolaci tasemnic.

4.3 Inkubace jedinců tasemnice krysí s mebendazolem

Potkani byli uspání pomocí etherové anestezie a usmrcení cervikální dislokací s následným vykrvácením. Byla otevřena břišní dutina a izolována střeva. Jejich propláchnutím nesterilním roztokem PBS (37 °C) byly získány živé tasemnice. Ty byly 3x propláchnuty v nesterilním PBS a 3x propláchnuty ve sterilním PBS s ATB. Každá tasemnice byla přenesena do inkubační láhve (25 ml). 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 (1M). Tasemnice byly inkubovány v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Celkem bylo takto získáno 53 tasemnic, z nich 8 bylo z experimentu vyřazeno pro nestandardní velikost.

Po usmrcení všech potkanů a získání všech tasemnic byl započat experiment. Celkem bylo pro další část experimentu použito 45 tasemnic. 10 tasemnic bylo jako kontrolní skupina zamraženo při -80°C před inkubací. Zbytek tasemnic byl náhodně rozdělen

a po přidání 20 μ l DMSO (10 tasemnic), 20 μ l 1mM roztoku MBZ v DMSO (6 tasemnic) nebo 20 μ l 10mM roztoku MBZ v DMSO (6 tasemnic) inkubován po dobu 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly tasemnice propláchnuty v PBS a po skupinách vloženy do předem zvážených falkonek. Z kontrolní skupiny byly vyřazeny další dvě tasemnice, které po inkubaci nejevily známky života. Vzorky byly zamrazeny na -80°C .

4.4 Příprava subcelulárních frakcí

Tasemnice byly po skupinách vloženy do mechanického homogenizátoru s 15 ml Na-fosfátového pufru o pH 7,4, získaným smísením 0,1M roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) a 0,1M roztoku dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) v poměru 4:1 za stálé kontroly pH, a homogenizovány. Získané homogenáty byly přelity do centrifugačních kyvet. Píst i homogenizátor byly poté opláchnuty 15 ml Na-fosfátového pufru, který byl přidán do centrifugačních kyvet.

Kyvety byly centrifugovány po dobu 20 minut při 4°C při 5000 g (1. točení) v centrifuze Heraeus (rotor #3335). Peleta s obsahem potřaných buněčných membrán, cév, vaziva a jader byla odstraněna. Supernatant byl přelit do čistých centrifugačních kyvet a centrifugován po dobu 60 minut při 4°C při 20 000 g (2. točení). Takto získaný supernatant byl opatrně přelit do kyvet pro ultracentrifugu Beckman. Kyvety byly plněny do tří čtvrtin, vyváženy, vloženy do rotoru proti sobě a centrifugovány po dobu 60 minut při 4°C při 105 000 g (3. točení).

Peleta z 2. točení obsahovala mitochondrie. Pro jejich získání byly odstraněny kaly a peleta byla resuspendována v 5ml Na-fosfátového pufru o pH 7,4 a stejným puftrem doplněna 2 cm pod horní okraj kyvety. Následovala centrifugace po dobu 60 minut při 4°C při 20 000 g (4. točení). Supernatant, obsahující ostatní buněčné elementy, byl odstraněn a peleta byla resuspendována v pufru s 20 % glycerolu, získaném smísením glycerolu a 0,1M Na-fosfátového pufru v poměru 1:4, v množství odpovídajícím hmotnosti původního vzorku. Takto získaná mitochondriální frakce byla za stálého míchání rozpipetována po 330 μ l do eppendorf mikrozkuvek o objemu 0,5 ml.

Supernatant získaný při 3. točení je frakcí cytosolu. Za stálého míchání byl rozpipetován po 1100 μ l do eppendorf mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Peleta z 3. točení byla resuspendována v 5 ml pufru, přelita do kyvet a centrifugována v ultracentrifuze po dobu 60 minut při 4°C při 105 000 g (5. točení). Supernatant byl

odstraněn a k peletě byl přidán pufr s obsahem 20 % glycerolu v množství odpovídajícímu původní hmotnosti tasemnic. Získaná mikrosomální frakce byla zhomogenizována a za stálého míchání rozpipetována po 330 μ l do eppendorf mikrozkušavek o objemu 0,5 ml.

Po rozpipetování byly všechny frakce ihned uloženy do hlubokomrazícího boxu a zde uchovávány při -80 °C.

4.5 BCA Stanovení bílkoviny

Principem stanovení je reakce proteinů s měďnatými ionty v alkalickém prostředí. Ty přechází na ionty měďné, které v prostředí o přibližném pH 10 vytváří s bicinchoninovou kyselinou (BCA) stabilní modrofialové komplexy. Intenzita zabarvení způsobená těmito komplexy je přímo úměrná množství bílkoviny.

Použité roztoky:

- Roztok A → NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B → 4% CuSO₄ · H₂O
- Roztok C připravený smísením roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

V prvé řadě byla připravena kalibrační přímka. Nejprve byl připraven 0,1% roztok bovinního sérového albuminu (BSA) naředěním zásobního 0,2% roztoku BSA v poměru 1:1 s redestilovanou vodou. Dále byly do 6 mikrozkušavek připraveny jednotlivé roztoky kalibrační přímky dle následujícího schématu (**Tab. 1**):

Tab. 1 Schéma pipetovaného množství pro roztoky kalibrační přímky

	<i>Koncentrace BSA</i>	<i>Množství 0,1% roztoku BSA</i>	<i>Množství redestilované vody</i>
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	200 µg/ml	20 µl	80 µl
3	400 µg/ml	40 µl	60 µl
4	600 µg/ml	60 µl	40 µl
5	800 µg/ml	80 µl	20 µl
6	1000 µg/ml	100 µl	0 µl

Roztoky vzorků byly připraveny do mikrozkušavek naředěním jednotlivých frakcí 20x destilovanou vodou.

Do mikrotitrační destičky byly napipetovány roztoky kalibrační přímky. Od každé koncentrace bylo napipetováno 10 µl do 6 paralelních jamek. Do 6 paralelních jamek bylo napipetováno také 10 µl roztoků vzorků. Multikanálovou pipetou bylo do každé jamky přidáno 200 µl roztoku C a destička byla po dobu 30 minut míchána a inkubována při 37 °C. Po inkubaci destičky byla změřena absorbance při 562 nm. Z naměřených hodnot byla pomocí kalibrační přímky vypočtena koncentrace proteinu [µg/ml] ve vzorku

4.6 Stanovení aktivit enzymů

4.6.1 Stanovení aktivity karbonylreduktasy (CBR)

Aktivita CBR byla měřena spektrofotometricky za přítomnosti substrátu menadionu. Menadion je za přítomnosti enzymu a kofaktoru NADPH redukován. Při této reakci je NADPH zároveň oxidován na NADP⁺, což se při měření projevuje poklesem absorbance.

Použité roztoky:

- 0,1M K-fosfátový pufr o pH 7,4
- 50mM menadion
- 5mM NADPH

Do 8 (v případě cytosolické frakce) nebo 4 (v případě mikrosomální a mitochondriální frakce) paralelních jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 10 μ l frakce nebo 10 μ l 0,1M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 v případě slepého vzorku. Takto připravená destička byla následně preinkubována 5 minut při 37 °C. Po preinkubaci bylo do každé jamky napipetováno 190 μ l mastermixu, získaného smísením 178 μ l pufru, 2 μ l menadionu a 10 μ l NADPH na každou jamku, a vložení destičky do Tecanu bylo započato měření. Po dobu 10 minut byla v intervalu 1 minuty zaznamenávána absorbance při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C.

Z oblasti lineárního poklesu byl zjištěn pokles absorbance za minutu a aktivita enzymu byla vypočítána dle následujícího vzorce:

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

ΔA_{vz} ... pokles absorbance vzorku

ΔA_{sl} ...pokles absorbance slepého vzorku

V_i ... objem reakční směsi

V_s ...objem biologické frakce

ϵ ... molární extinkční koeficient NADPH (6,22 mM⁻¹cm⁻¹)

l ... výška jamky

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.2 Stanovení aktivity aldo-ketoreduktasy 1A1 (AKR1A1)

Aktivita AKR1A1 byla stanovena za přítomnosti substrátu 4-pyridinkarboxaldehydu. Ten je enzymem redukován za přítomnosti kofaktoru NADPH, který se zároveň oxiduje. Úbytek NADPH je pak pozorován jako pokles absorbance.

Použité roztoky:

- 0,1M K-fosfátový pufr o pH 6,0
- 0,1M roztok 4-pyridinkarboxaldehydu
- 2mM roztok NADPH

Do 8 (v případě cytosolické frakce) nebo 4 (v případě mikrosomální a mitochondriální frakce) paralelních jamek mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 10 μ l frakce nebo 10 μ l 0,1M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 v případě slepého vzorku. Posléze bylo do každé jamky napipetováno 190 μ l mastermixu získaného smísením 178 μ l pufru, 2 μ l 4-pyridinkarboxaldehydu a 10 μ l NADPH. Přidáním mastermixu byla odstartována reakce a ihned započato měření. Po dobu 10 minut byla v intervalu 1 minuty zaznamenávána absorbance při vlnové délce 340 nm a teplotě 37 °C.

Výpočet aktivity byl proveden obdobně jako u CBR (viz 4.6.1).

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.3 Stanovení aktivity aldo-ketoreduktas 1C (AKR1C)

Aktivita redukčních enzymů podrodiny AKR1C byla stanovena za použití acenaftenolu jako substrátu. Acenaftenol je oxidován na acenaftenon, což je doprovázeno redukcí kofaktoru NADP⁺ na NADPH což je spektrofotometricky měřitelné jako vzrůst absorbance.

Použité roztoky:

- 0,1M TRIS/HCl pufr o pH 8,9
- 0,1M roztok acenaftenolu v DMSO
- 20mM roztok NADP⁺

Stanovení bylo provedeno v 8 paralelních jamkách pro cytosolickou frakci a 4 paralelních jamkách pro mikrosomální i mitochondriální frakci. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo nejprve napipetováno 10 μ l frakce nebo 10 μ l Na-fosfátového pufru v případě slepého vzorku. Následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 190 μ l mastermixu získaného smísením 178 μ l pufru, 10 μ l NADP⁺ a 2 μ l acenaftenolu pro každou jamku. Takto připravená mikrotitrační destička byla ihned vložena do Tecanu vytemperovaného na 37 °C a po dobu 10 minut byla v intervalu 1 minuty měřena absorbance při 340 nm.

Z oblasti lineárního vzrůstu byl zjištěn vzrůst absorbance za minutu a aktivita enzymu byla vypočítána dle vzorce obdobného vzorci použitého k výpočtu aktivity CBR (viz 4.6.1).

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.4 Stanovení aktivity glutathionreduktasy (GR)

Metoda je založena na přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na glutathion redukovaný (GSH) za současné oxidace kofaktoru NADPH, jehož spotřeba je spektrofotometricky zaznamenávána jako úbytek absorbance.

Použité roztoky:

- 0,1M K-fosfátový pufr o pH 7,0
- 5mM EDTA
- 2,5mM NADPH
- 4mM GSSG

Stanovení bylo prováděno s frakcí neředěnou i ředěnou v poměru 1:4 Na-fosfátovým pufrům o pH 7,4. Obojí bylo vždy stanoveno ve 4 paralelních měřeních. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μ l frakce nebo 50 μ l Na-fosfátového pufru o pH 7,4 jako slepého vzorku. Multikanálovou pipetou bylo přidáno 150 μ l mastermixu tvořeného 50 μ l K-fosfátového pufru, 40 μ l EDTA a 10 μ l NADPH. Po přidání mastermixu byla ihned měřena absorbance v minutových intervalech po dobu 10 minut při 340 nm.

Aktivita byla vypočtena obdobně jako u stanovení aktivity CBR (viz. 4.6.1).

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.5 Stanovení aktivity katalasy

Principem stanovení aktivity katalasy je tvorba žlutého komplexu peroxidu vodíku s molybdenanem amonným. Katalasa, která peroxid vodíku odbourává na vodu a kyslík, tvorbě komplexu brání.

Použité roztoky:

- 60mM Na-K fosfátový pufr o pH 7,4
- 6,5mM H₂O₂
- 32,4mM molybdenan amonný

Biologický vzorek byl pro stanovení naředěn 10x pufrem. Pracovní roztoky byly dále pipetovány na mikrotitrační destičku dle následujícího schématu (Tab. 2):

Tab. 2 Schéma pipetování pracovních roztoků

Blank 1	Vzorek	Blank 2	Blank 3
100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl pufru
100 µl molyb.	20 µl frakce	20 µl pufru	20 µl pufru
Inkubace po dobu 1 minuty při 37 °C			
-	100 µl molyb.	100 µl molyb.	100 µl molyb.
1 minutu nechat stát			
20 µl frakce	-	-	-

Vzorek byl pipetován do 8 paralelních jamek. Po závěrečném pipetování byl vzorek ihned vložen do Tecanu a byla změřena absorbance při 405 nm.

Z naměřených absorbancí se dále vypočetla aktivita dle vzorce:

$$aktivita = \frac{Abl1 - Avz}{Abl2 - Abl3} * 32,5 * zř.$$

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [µmol/min/mg].

4.6.6 Stanovení aktivity peroxidasy

Pro stanovení je využívána dvojice pyrokatechol-anilin sloužící jako donor vodíku pro reakci katalyzovanou peroxidasou, během které je rozkládán peroxid vodíku. Pyrokatechol-anilin je přeměňován na produkt růžové barvy [4-(fenylamino)benzen-1,2-diol], jehož přírůstek je fotometricky zaznamenáván.

Použité roztoky:

- 0,2M Na-fosfátový pufr o pH 7,00
- 1,7mM H₂O₂
- Substrát vytvořený smísením 0,1872 g 170mM pyrokatecholu, 2,28 µl 2,5mM anilinu a 10 ml pufru

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo multikanálovou pipetou napipetováno 90 µl substrátu a 100 µl H₂O₂ a destička se nechala 4 minuty preinkubovat při 25 °C. Po preinkubaci bylo přidáno 10 µl frakce nebo 10 µl pufru jako slepého vzorku a ihned byla měřena absorbance v minutových intervalech po dobu 10 minut při 510 nm. Každý vzorek byl stanoven v 8 paralelních měřeních.

Aktivita byla dále vypočtena obdobně jako u stanovení CBR (viz 4.6.1).

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.7 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)

Pro stanovení aktivity SOD byl použit SOD Assay Kit – WST. Principem stanovení je redukce soli tetrazolinu (WST-1) na ve vodě rozpustné barvivo formazan, kterou katalyzuje superoxidový aniont. SOD superoxidový aniont odbourává na peroxid vodíku a molekulární kyslík. Tím inhibuje redukci WST-1 na barevný formazan, což se projeví odbarvováním reakční směsi a je měřitelné spektrofotometricky jako změna absorbance.

Použité pracovní roztoky:

- WST pracovní roztok
1 ml roztoku WST byl naředěn 19 ml roztoku pufru
- Pracovní roztok enzymu
Roztok enzymu byl 5 s podroben centrifugaci. Následně, po promíslení pipetováním, bylo 15 μ l naředěno 2,5 ml ředícího pufru.
- Ředící pufr
- Biologická frakce

Pracovní roztoky byly napipetovány do mikrotitrační destičky ve třech paralelních jamkách pro každý vzorek, blank 1, blank 2 i blank 3 u cytosolické, mikrosomální i mitochondriální frakce dle následujícího schématu (**Tab. 3**):

Tab. 3 Schéma reagenčních směsí pro stanovení aktivity SOD

	vzorek	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Biologická frakce	20 μ l	-	20 μ l	-
Redestilovaná voda	-	20 μ l	-	20 μ l
WST pracovní roztok	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Ředící pufr	-	-	20 μ l	20 μ l
Pracovní roztok enzymu	20 μ l	20 μ l	-	-

Po napipetování pracovních roztoků byla destička inkubována v thermomixeru po dobu 20 minut při 37 °C a po inkubaci byla přečtena absorbance při 450 nm.

Z naměřených absorbancí se dále vypočetla aktivita dle následujícího vzorce:

$$\text{aktivita} = \frac{[(A_{bl1} - A_{bl3}) - (A_{vz} - A_{bl2})] * V * 50 * 10^9}{\epsilon * l * t} \text{ [nmol/min/ml]}$$

V ... objem reakční směsi

ϵ ... molární extinkční koeficient formazanu ($37\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l ... výška jamky

t... doba reakce

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.8 Stanovení aktivity glutathion-S-transferasy (GST)

Princip stanovení je založen na reakci katalyzované GST, při které dochází ke vzniku konjugátu GSH a chlordinitrobenzenu (CDNB).

Použité roztoky:

- 0,1M Na-fosfátový pufr o pH 6,5
- 5,15mM roztok GSH
- 51,5mM roztok CDNB

Stanovení bylo prováděno s frakcí neředěnou i ředěnou v poměru 1:9 pufrům. Obojí bylo vždy stanoveno ve 4 paralelních měřeních. Do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo napipetováno 6 μl zkoušené frakce nebo 6 μl pufru jako slepého vzorku. Multikanálovou pipetou bylo přidáno 194 μl mastermixu tvořeného 38,8 μl GSH, 3,88 μl CDNB a 151,32 μl pufru. Ihned byla měřena absorbance v minutových intervalech po dobu 10 minut při 340 nm a 37 °C.

Aktivita byla vypočtena obdobně jako u stanovení aktivity CBR (viz 4.6.1).

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.9 Stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT)

Princip stanovení je založen reakci konjugačního činidla (UDP-glukuronové kyseliny) se substrátem (*p*-nitrofenol) za katalýzy enzymem UGT. Zbylý nekonjugovaný *p*-nitrofenol lze spektrofotometricky stanovit.

Použité roztoky:

- 2,5mM roztok *p*-nitrofenolu ve vodě
- 10mM roztok UDP-GA ve vodě
- Tris/HCl pufr o pH 7,4
- 3% trichloroctová kyselina (TCA)
- 1M roztok NaOH

V lednici byl 20 minut inkubován roztok frakce s detergentem v poměru 2:1. 10 µl této směsi bylo napipetováno do každé jamky mikrotitrační destičky. Poté bylo přidáno 90 µl mastermixu tvořeného 50 µl pufru, 20 µl *p*-nitrofenolu a 20 µl UDP-GA. Pro slepý vzorek obsahoval mastermix místo 20 µl UDP-GA 20 µl vody. Takto připravená destička byla po dobu 20 minut inkubována při 37 °C. Následně byla probíhající reakce zastavena přidáním 50 µl TCA a stočena na stolní centrifuze (2550 rpm, 5 minut). Do jiné destičky bylo napipetováno 50 µl NaOH, ke kterému bylo přidáno 50 µl inkubační směsi. Na závěr byla změřena absorbance při 405 nm.

Aktivita UGT byla z naměřených absorbancí vypočtena dle následujícího vzorce:

$$aktivita = \frac{(\Delta A_{sl} - \Delta A_{vz}) * 10^5}{V * \epsilon * l * t * 3} \text{ [nmol/min/ml]}$$

ΔA_{sl} ... absorbance slepého vzorku

ΔA_{vz} ... absorbance vzorku

V...objem frakce

ϵ ... molární extinkční koeficient *p*-nitrofenolu (18,3 mM⁻¹cm⁻¹)

l ... výška jamky

t... doba reakce

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.6.10 Stanovení aktivity UDP-glukosyltransferasy (UGlcT)

Princip stanovení je založen reakci konjugačního činidla (UDP-glukosy) se substrátem (*p*-nitrofenol) za katalýzy enzymem UGlcT. Zbylý nekonjugovaný *p*-nitrofenol lze spektrofotometricky stanovit.

Použité roztoky:

- 2,5mM roztok *p*-nitrofenolu ve vodě
- 10mM roztok UDP-Glc ve vodě
- Tris/HCl pufr o pH 7,4
- 3% trichloroctová kyselina (TCA)
- 1M roztok NaOH

V lednici byl 20 minut inkubován roztok frakce s detergentem v poměru 2:1. 20 μ l této směsi bylo napipetováno do každé jamky mikrotitrační destičky. Poté bylo přidáno 80 μ l mastermixu tvořeného 40 μ l pufru, 20 μ l *p*-nitrofenolu a 20 μ l UDP-Glc. Pro slepý vzorek obsahoval mastermix místo 20 μ l UDP-Glc 20 μ l vody. Takto připravená destička byla po dobu 20 minut inkubována při 37 °C. Následně byla probíhající reakce zastavena přidáním 50 μ l TCA a stočena na stolní centrifuze (2550 rpm, 5 minut). Do jiné destičky bylo napipetováno 50 μ l NaOH, ke kterému bylo přidáno 50 μ l inkubační směsi. Na závěr byla změřena absorbance při 405 nm.

Aktivita UGlcT byla vypočtena obdobně jako aktivita UGT (viz 4.6.9)

Vztažením aktivity na 1 mg proteinu byla vypočtena specifická aktivita [nmol/min/mg].

4.7 Zpracování dat a statistická analýza

Specifické aktivity jednotlivých enzymů byly u všech frakcí vždy stanoveny ve čtyřech skupinách: kontrolní skupina v čase 0 hodin (KOH), kontrolní skupina inkubovaná 24 hodin (K), skupina inkubovaná 24 hodin s 1 μ M MBZ (MBZ 1) a skupina inkubovaná 24 hodin s 10 μ M MBZ (MBZ 10).

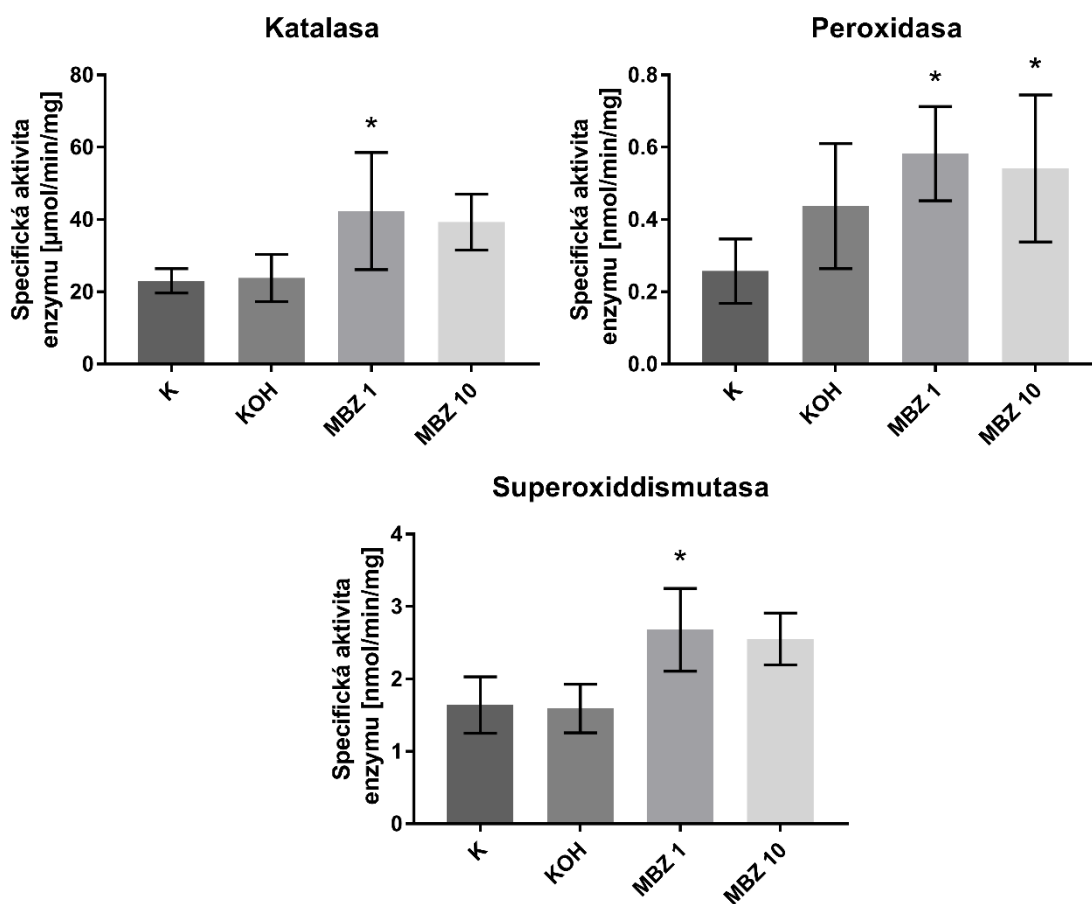
Zpracování dat bylo provedeno v programu Excel sady Microsoft office 2013. Statistická analýza byla provedena v programu Graph Pad Prism 7. Jako statistická metoda byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (one-way ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem). Metoda vyhodnocuje statistickou významnost změn ve specifických aktivitách enzymů. V grafech jsou data vyobrazena jako průměry se směrodatnou odchylkou. Statisticky významné hodnoty jsou označeny hvězdičkou. (* P < 0,05). Ve statistické analýze jsme primárně porovnávali skupiny MBZ 1 a MBZ 10 se skupinou K.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv na aktivitu enzymů v cytosolické frakci

5.1.1 Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v cytosolické frakci

Z oxidačních enzymů byla u cytosolické frakce stanovena aktivita katalasy, peroxidasy a SOD.

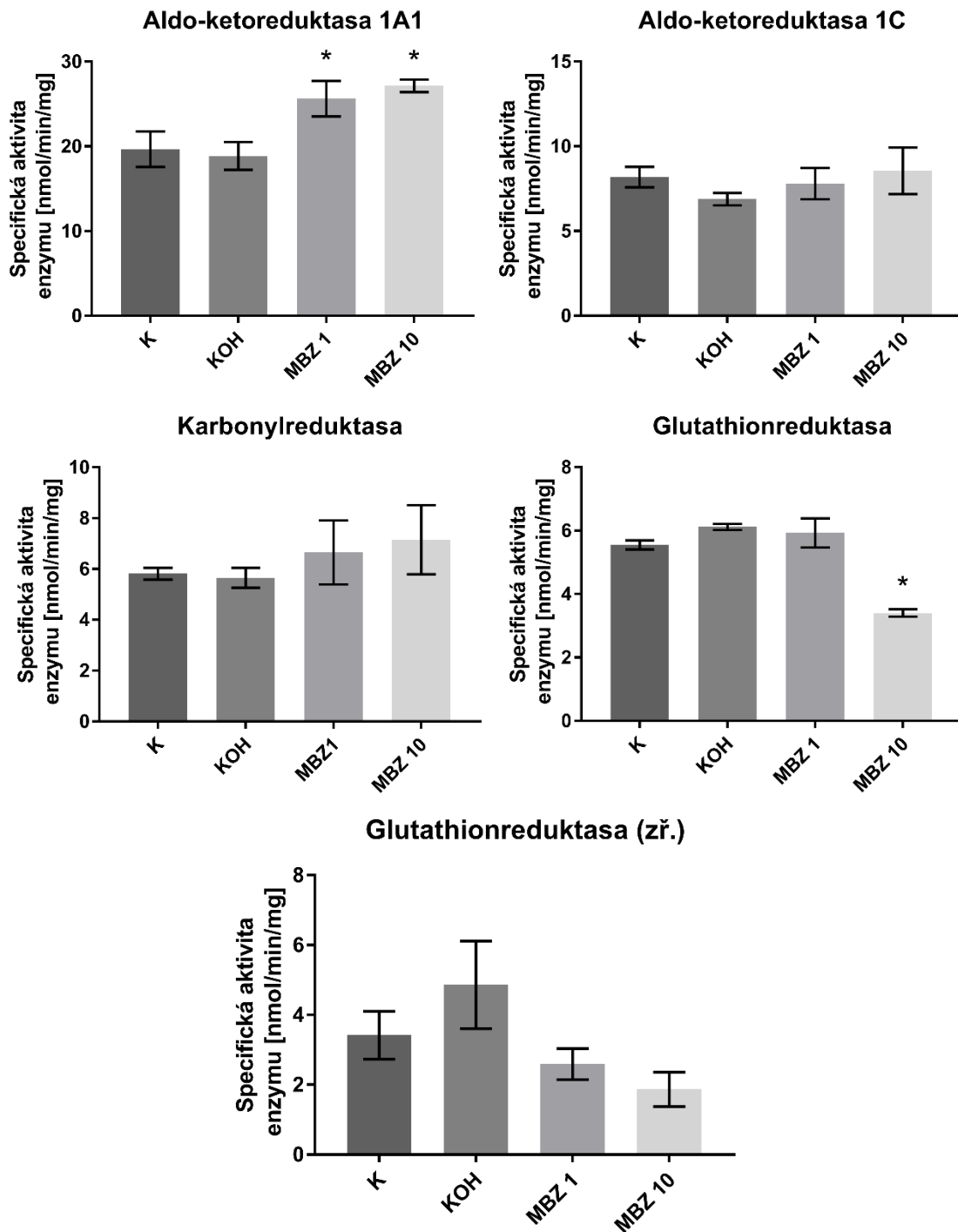


Obr. 6 Změny specifické aktivity katalasy, peroxidasy a superoxiddismutasy v cytosolické frakci v závislosti na expozici 1μM a 10μM MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů (Obr. 6), je patrné že u cytosolické frakce došlo u všech enzymů potenciálně oxidujících xenobiotika ke statisticky významnému nárůstu aktivity proti kontrolnímu vzorku. U katalasy došlo ke statisticky významnému zvýšení aktivity po expozici 1μM MBZ. U peroxidasy došlo ke statisticky významnému zvýšení aktivity po expozici 1μM i 10μM MBZ. U SOD došlo ke statisticky významnému zvýšení aktivity po expozici 1μM MBZ.

5.1.2 Vliv na aktivitu redukčních enzymů v cytosolické frakci

Z redukčních enzymů byla u cytosolické frakce stanovena aktivita AKR1A1, AKR1C, CBR a GR.

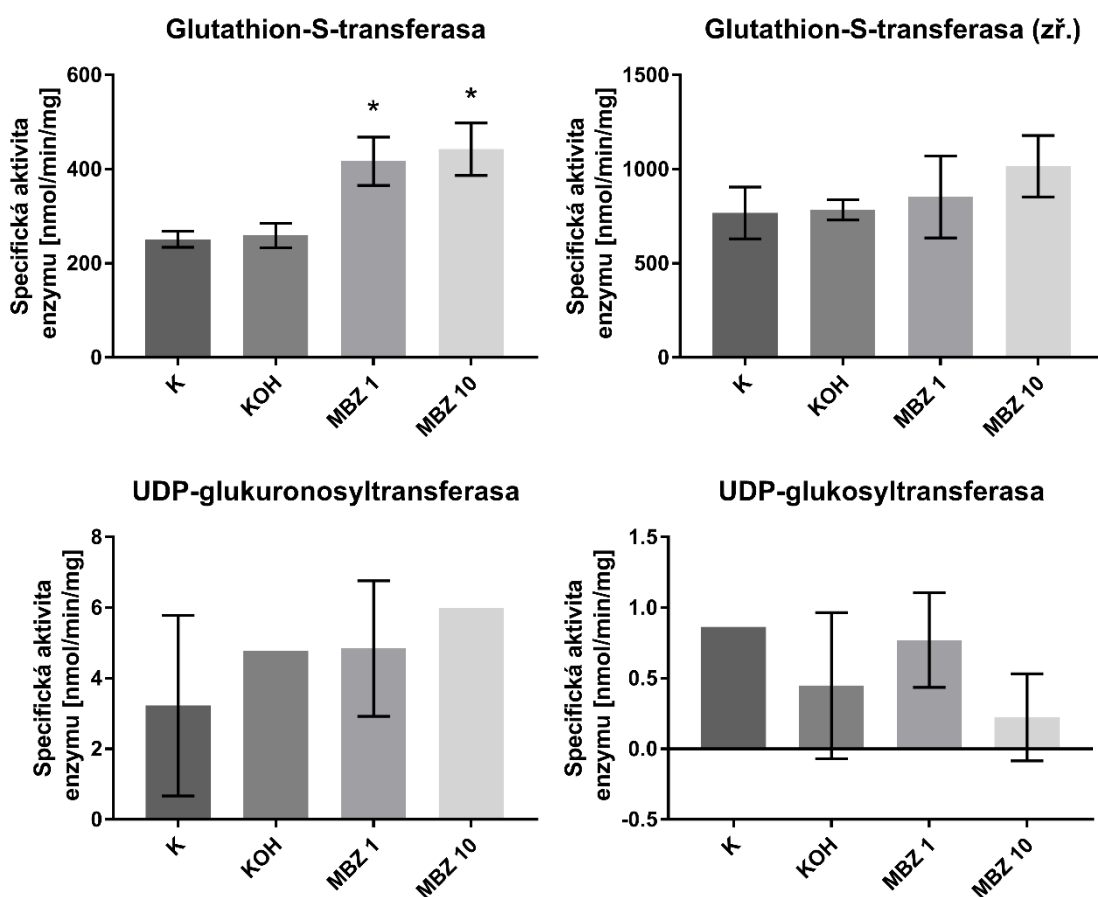


Obr. 7 Změny specifické aktivity aldo-ketoreduktasy 1A1, aldo-ketoreduktasy 1C, karbonylreduktasy a glutathionreduktasy neředěné i zředěné v cytosolické frakci v závislosti na expozici 1 μM a 10 μM MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů (Obr. 7) je patrné následující. U specifické aktivity AKR1A1 je patrný statisticky významný nárůst aktivity po expozici 1 μ M i 10 μ M MBZ. Oproti tomu z grafu specifické aktivity nadrodiny AKR1C je patrné, že u AKR1C nebyl pozorován žádný statisticky významný nárůst či pokles specifické aktivity proti kontrolnímu vzorku. Podobně ani u aktivity CBR nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny. Aktivita GR byla stanovena u koncentrovaných vzorků, i vzorků ředěných v poměru 1:4. U tohoto enzymu byl pozorován statisticky významný pokles aktivity po expozici 10 μ M MBZ, nicméně jen u neředěného vzorku.

5.1.3 Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v cytosolické frakci

Z konjugačních enzymů byla v cytosolické frakci stanovena specifická aktivita GST, UGT a UGlT.



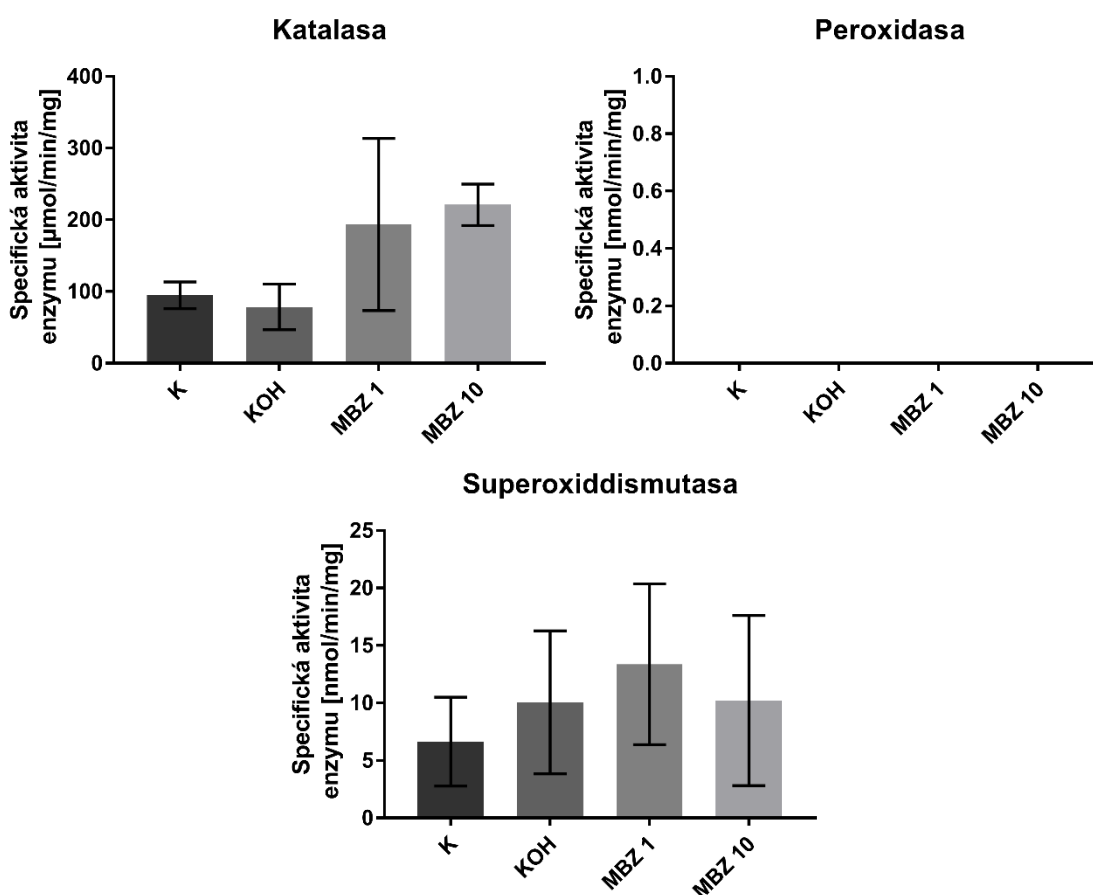
Obr. 8 Změny specifické aktivity glutathion-S-transferasy neředěné i zředěné, UDP-glukuronosyltransferasy a UDP-glukosyltransferasy v cytosolické frakci v závislosti na expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů (Obr. 8) je patrné následující: U GST byl zaznamenán statisticky výrazný nárůst specifické aktivity u vzorků inkubovaných s 1 μ M i 10 μ M MBZ v případě neředěné frakce. U zředěné frakce statisticky významný nárůst v aktivitě pozorován nebyl. Žádné statisticky významné změny v aktivitě nebyly pozorovány u UGT ani u UGlcT.

5.2 Vliv na aktivitu enzymů v mikrosomální frakci

5.2.1 Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v mikrosomální frakci

Z oxidačních enzymů byla u mikrosomální frakce stanovena aktivita katalasy, peroxidasy a SOD.

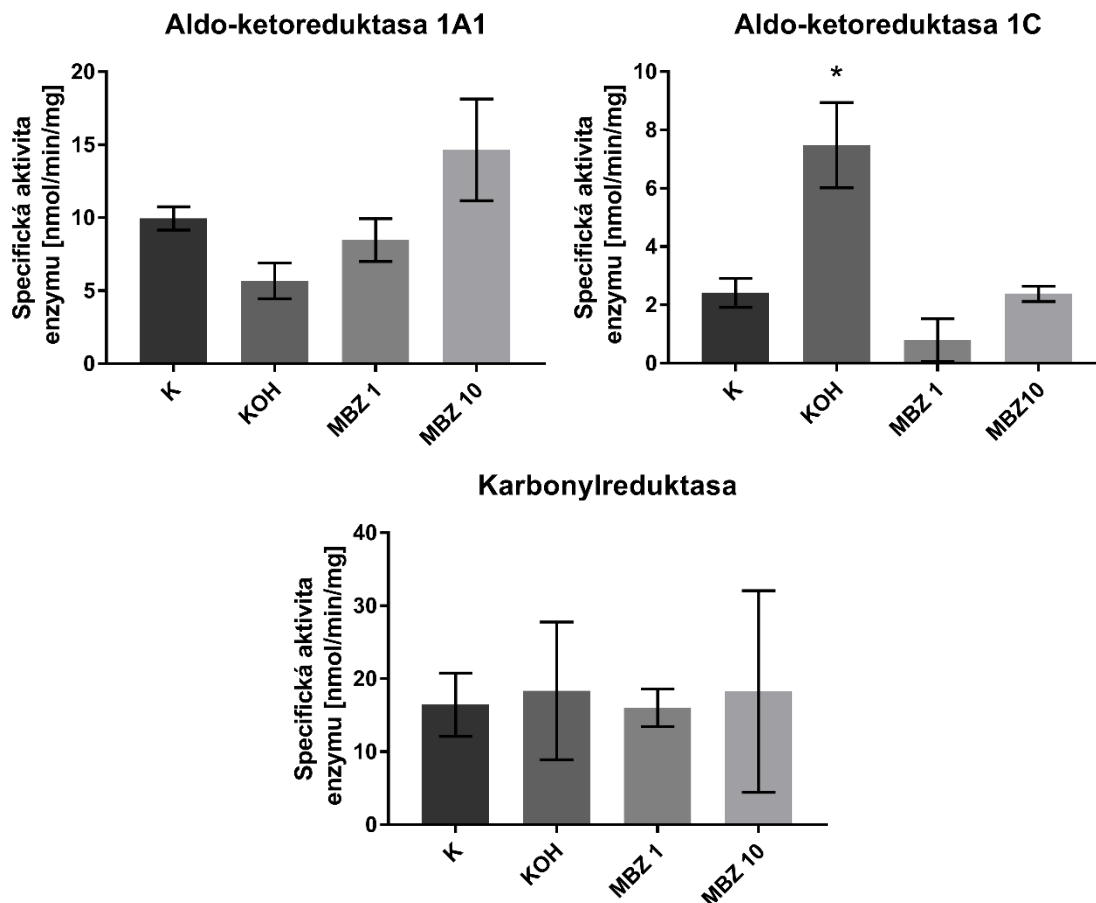


Obr. 9 Změny specifické aktivity katalasy, peroxidasy a superoxiddismutasy v mikrosomální frakci v závislosti na expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafu (Obr. 9) je patrné, že u mikrosomální frakce nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna ve specifické aktivitě katalasy po expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. U peroxidasy nebyla detekována žádná aktivita a to ani u kontrolních vzorků. Aktivita SOD detekována byla, nicméně ke statisticky významným změnám nedošlo.

5.2.2 Vliv na aktivitu redukčních enzymů v mikrosomální frakci

Z redukčních enzymů byla u mikrosomální frakce stanovována aktivita AKR1A1, AKR1C a CBR.

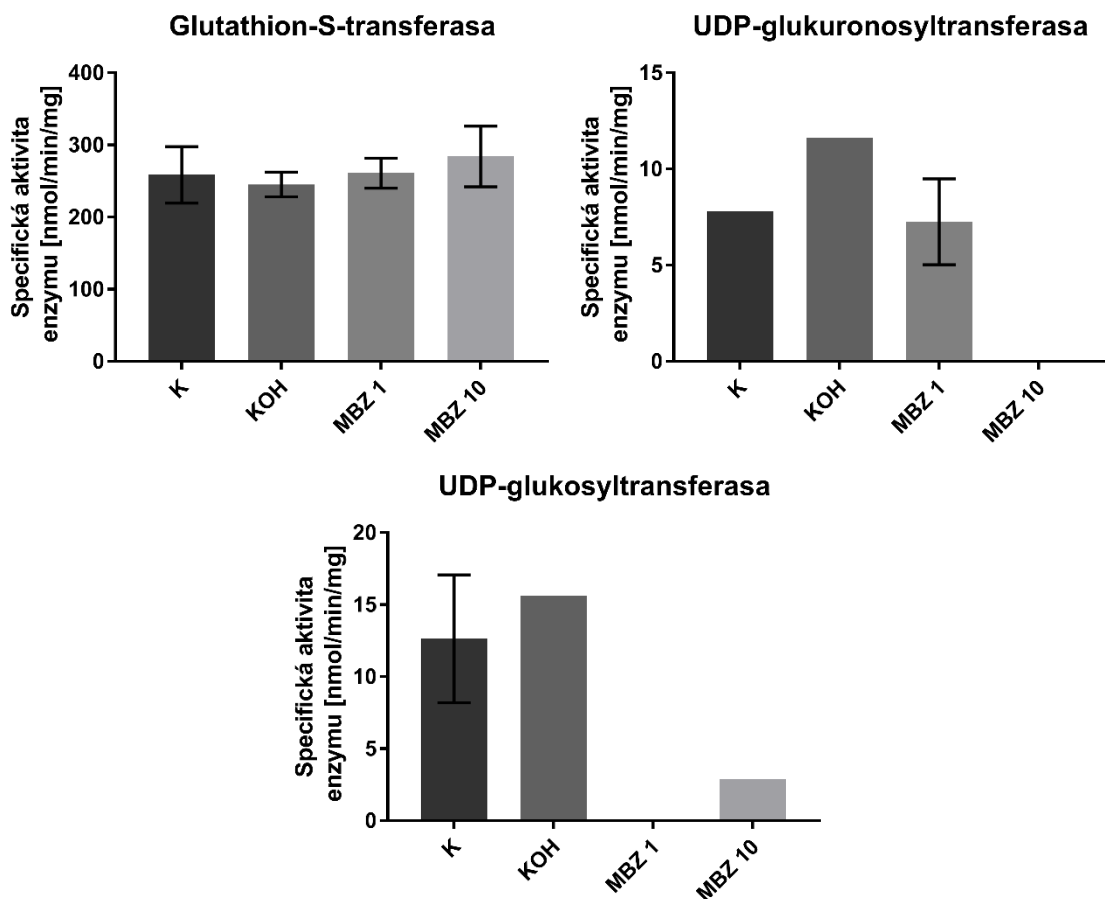


Obr. 10 Změny specifické aktivity aldo-ketoreduktasy 1A1, aldo-ketoreduktasy 1C a karbonylreduktasy v mikrosomální frakci v závislosti na expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Jak je vidět z grafů (**Obr. 10**), v aktivitách AKR1A1 nebyl detekován žádný statisticky významný rozdíl. V případě AKR1C nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v aktivitě po expozici oběma koncentracím MBZ, nicméně byl nalezen statisticky významný pokles aktivity kontrolního vzorku inkubovaného 24 hodin proti kontrolnímu vzorku inkubovanému 0 hodin. V aktivitě CBR nebyla detekována žádná statisticky významná změna.

5.2.3 Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v mikrosomální frakci

Z konjugačních enzymů byla u mikrosomální frakce stanovena aktivita GST, UGT a UGlcT.



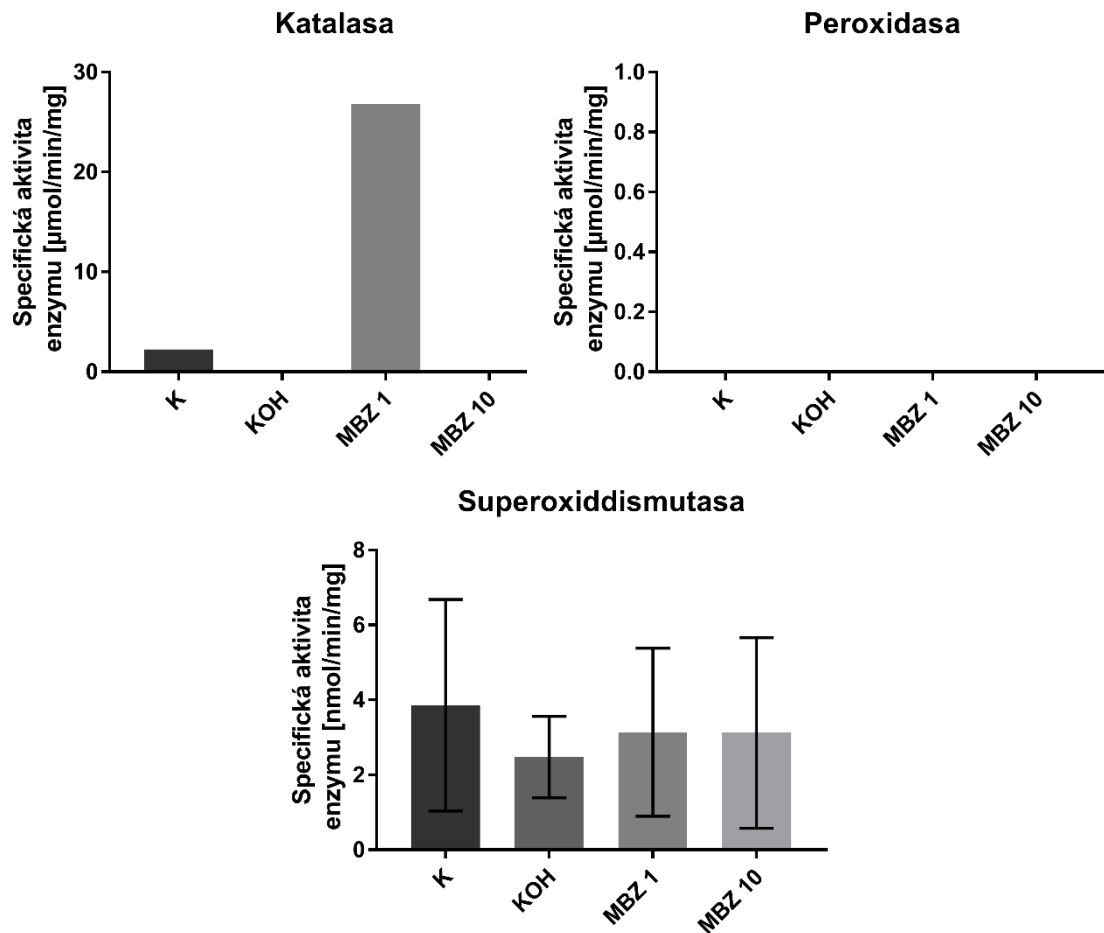
Obr. 11 Změny specifické aktivity glutathion-S-transferasy, UDP-glukuronosyltransferasy a UDP-glukosyltransferasy v mikrosomální frakci v závislosti na expozici 1 μM a 10 μM MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů (Obr. 11) je patrné, že nebyly detekovány žádné statisticky významné změny v aktivitě GST, UGT ani UGlcT.

5.3 Vliv na aktivitu enzymů v mitochondriální frakci

5.3.1 Vliv na aktivitu oxidačních enzymů v mitochondriální frakci

Z oxidačních enzymů byla u mitochondriální frakce stanovena aktivita katalasy, peroxidasy a SOD.

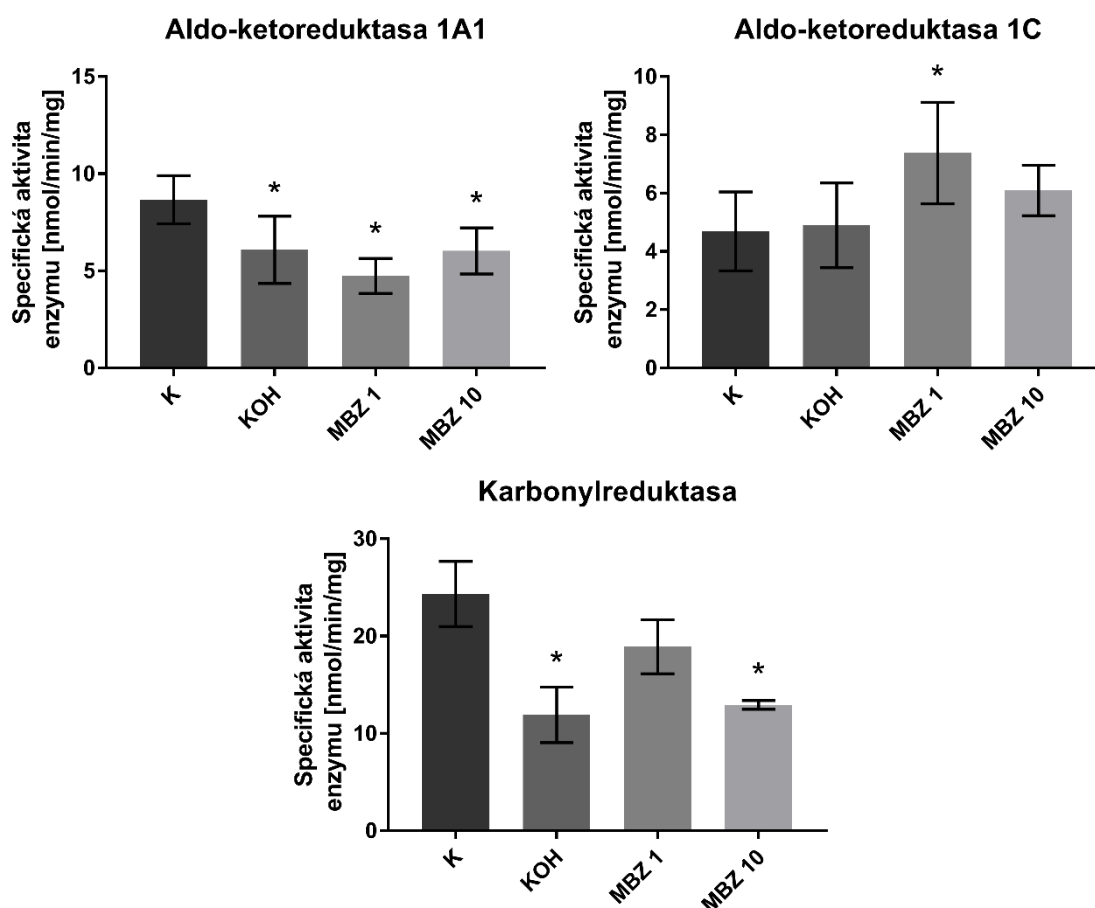


Obr. 12 Změny specifické aktivity katalasy, peroxidasy a superoxiddismutasy v mitochondriální frakci v závislosti na expozici $1\mu\text{M}$ a $10\mu\text{M}$ MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, * $P < 0,05$

Z grafů (**Obr. 12**) je patrné, že v aktivitě katalasy nebyly detekovány žádné statisticky významné změny. Aktivita peroxidasy nebyla v mitochondriální frakci detekována ani po expozici MBZ ani u kontrolních vzorků. V aktivitě SOD nebyly detekovány žádné statisticky významné rozdíly.

5.3.2 Vliv na aktivitu redukčních enzymů v mitochondriální frakci

Z redukčních enzymů byla u mitochondriální frakce stanovena aktivita AKR1A1, AKR1C a CBR.

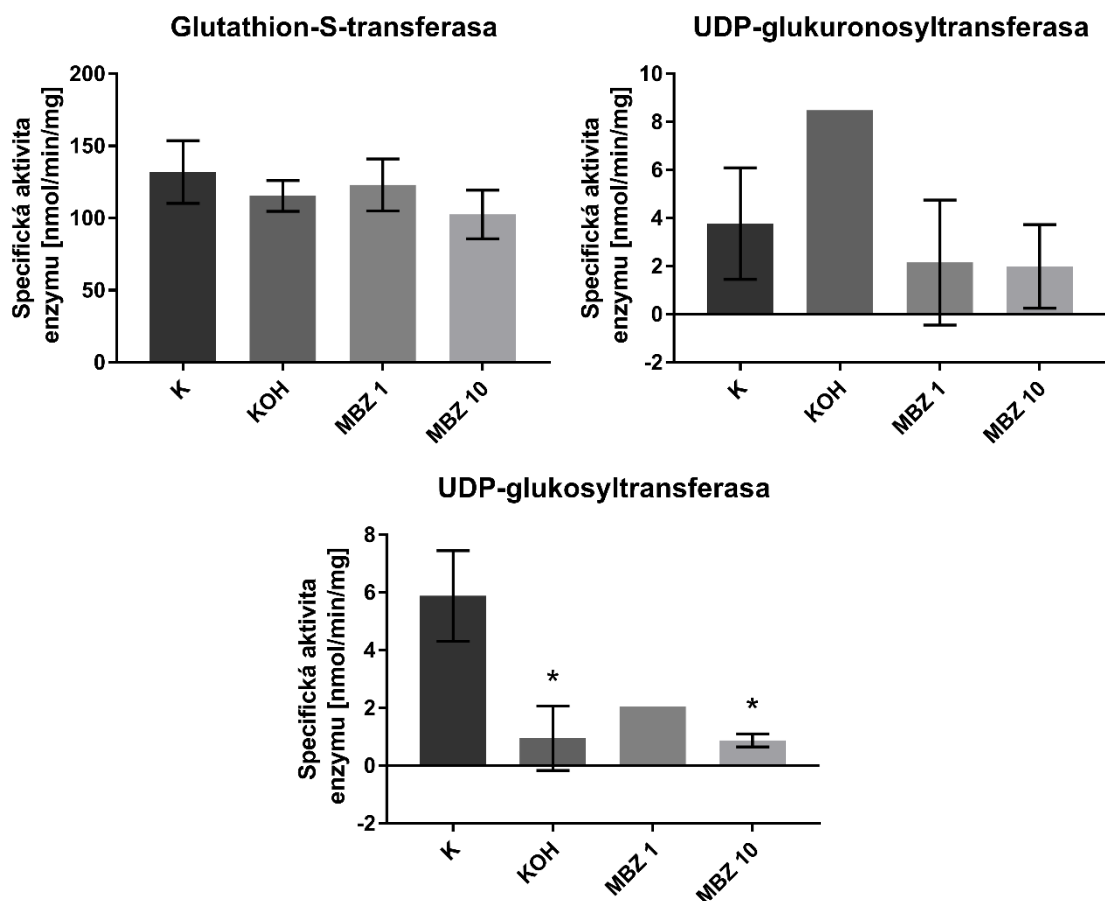


Obr. 13 Změny specifické aktivity aldo-ketoreduktasy 1A1, aldo-ketoreduktasy 1C a karbonylreduktasy v mitochondriální frakci v závislosti na expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů (Obr. 13) lze vyčíst následující. V případě AKR1A1 byl detekován statisticky významný pokles specifické aktivity proti kontrolnímu vzorku po expozici MBZ v obou koncentracích. Zajímavý je rozdíl v aktivitách kontrolních vzorků, kde došlo po 24 hodinové inkubaci k nárůstu aktivity. Naopak u AKR1C lze pozorovat statisticky významný nárůst aktivity po expozici 1 μ M MBZ. U CBR byl detekován statisticky významný pokles změny specifické aktivity po expozici 10 μ M MBZ. Stejně jako u AKR1A1 je ale pozorovatelný v aktivitách kontrolních vzorků, kde došlo po 24 hodinové inkubaci k nárůstu aktivity.

5.3.3 Vliv na aktivitu konjugačních enzymů v mitochondriální frakci

Z konjugačních enzymů byla u mitochondriální frakce stanovena aktivita GST, UGT a UGlcT.



Obr. 14 Změny specifické aktivity glutathion-S-transferasy, UDP-glukuronosyltransferasy a UDP-glykosyltransferasy v mitochondriální frakci v závislosti na expozici 1 μ M a 10 μ M MBZ. Data jsou prezentována jako průměry se směrodatnou odchylkou, *P < 0,05

Z grafů je (Obr. 14), je patrná že u GST ani UGT nebyla detekována žádná statisticky významná změna ve specifické aktivitě. U UGlcT došlo ke statisticky významným změnám v kontrolních vzorcích, kdy došlo k nárůstu aktivity po 24 hodinové inkubaci. Navíc po expozici 10 μ M MBZ došlo ke statisticky významnému poklesu v aktivitě.

6 DISKUSE

Cílem této práce bylo ověřit možnost ovlivnění aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika MBZ u tasemnice krysí (*H. diminuta*) a tak přiblížit roli těchto enzymů v rozvoji helmintorezistence u tohoto parazita. V předchozích studiích byl již metabolismus anthelmintik a aktivity enzymů u této tasemnice zkoumány (Bártíková et al. 2012), nicméně možnost ovlivnění aktivity biotransformačních enzymů anthelmintikem studována nebyla, bylo tedy žádoucí se tohoto úkolu zhostit.

Pro dosažení našich cílů bylo nutné splnit dílčí úkoly. Nejprve bylo třeba získat dospělé tasemnice, čehož jsme docílili infikací definitivního hostitele laboratorního potkana cysticerkoidy, získanými z infikovaného mezihostitele brouka potměníka moučného (*T. molitor*). Po třech týdnech od infikace byl trus potkanů zkontrolován na přítomnost vajíček, a tak potvrzena existence dospělců *H. diminuta* ve střevě potkana. Usmrcením potkanů, pitvou a výplachem střev byly získány tasemnice, které byly rozděleny do čtyř skupin. První část tasemnic byla ihned zamrazena jako kontrolní skupina v čase 0 h (ve výsledcích označena jako KOH), zbylé tři skupiny byly po dobu 24 hodin inkubovány s 1 μ M MBZ, s 10 μ M MBZ a nebo s DMSO, jako kontrolní skupina v čase 24 h. Po inkubaci byly tasemnice zamrazeny a byly připraveny subcelulární frakce – cytosolická, mikrosomální a mitochondriální – ve kterých jsme dále stanovovali aktivity vybraných enzymů. Statistickou analýzou naměřených aktivit jsme získali informace o tom, kde došlo ke statisticky významnému nárůstu / poklesu aktivit po expozici MBZ.

Reduktasy byly vždy považovány za významné enzymy helmintů (Matoušková et al., 2016). Vysoká aktivita těchto enzymů byla potvrzena také u *H. diminuta* (Bártíková et al., 2012). MBZ se metabolizuje redukcí na neaktivní metabolit, je tedy pravděpodobným substrátem těchto enzymů i u parazitických helmintů. To bylo potvrzeno nalezením redukováného metabolitu tohoto anthelmintika u mnoha helmintů, včetně *H. diminuta* (Bártíková et al., 2012; Prchal et al., 2015, 2014; Vokřál et al., 2010). V našem experimentu jsme tedy předpokládali zvýšení aktivity reductas možnou indukci v reakci na expozici tasemnice MBZ, což by *in vivo* vedlo pravděpodobně ke zvýšené deaktivaci anthelmintika a možnému selhání léčby. Indukce reductas by se tak tímto mechanismem mohla podílet na rozvoji helmintorezistence.

V našem experimentu došlo ke statisticky významnému zvýšení aktivity reductas u AKR1A1 v cytosolické frakci a AKR1C ve frakci mitochondriální, což by do jisté míry

podporovalo dříve vyslovenou hypotézu. Podobné výsledky již byly pozorovány i u jiných helmintů. U hlístice *H. contortus* bylo pozorováno zvýšení aktivity D,L-glyceraldehydreduktasy a acenaftenolreduktasy v reakci na expozici FLU (Vokřál et al., 2010). Také u motolice *F. hepatica* bylo pozorováno zvýšení aktivity reduktas, a to CBR po expozici TCBZ (Scarcella et al., 2013).

V našem experimentu jsme ale také pozorovali snížení aktivity AKR1A1 v mitochondriální frakci. Na druhou stranu jsme zde zaznamenali změnu aktivity v čase u kontrolních skupin, kdy aktivita kontroly v čase 24 h jevila nárůst proti kontrole v čase 0 h, což naznačuje vliv samotné inkubace na aktivitu enzymu. Podobné výsledky jsme pozorovali i u CBR v této frakci a u mikrosomální AKR1C, kde byl pozorován pokles aktivity v čase.

Výskyt oxidačních enzymů u helmintů byl dlouho zpochybňován, ale nyní je u helmintů potvrzena jak existence genů kódujících CYP (např. u *S. mansoni*, *S. haematobium*, *H. contortus*) (Laing et al., 2015; Matoušková et al., 2016), tak oxidace některých anthelmintik (Cvilink et al., 2008; Cvilink et al., 2009; Laing et al., 2010; Munguía et al., 2015; Prchal et al., 2016; Prchal et al., 2015; Stuchlikova et al., 2014). Katalasa, peroxidasa a SOD jsou primárně antioxidační enzymy, které v metabolismu léčiv mohou vystupovat jako oxidasy. V našem experimentu jsme pozorovali zvýšení aktivity u všech tří enzymů v cytosolické frakci. Otázkou je, jestli k tomu dochází přímo v reakci na expozici léčivu, jelikož MBZ oxidací metabolizován není, či sekundárně v reakci na oxidační stres. V mitochondriální a mikrosomální frakci nebyla detekována žádná aktivita peroxidasy, a to ani u kontrolních skupin. Aktivitu katalasy v mitochondriální frakci jsme detekovali pouze u dvou vzorků a pouze jednou ze všech měření, výsledky měření tak zde byly s největší pravděpodobností falešně pozitivní a nelze z nich vyvozovat žádné závěry. Ve studii (Bártíková et al., 2012) byla aktivita peroxidasy a katalasy detekována ve všech frakcích. Tyto výsledky se nám tedy nepodařilo zreprodukovat. Aktivita SOD však byla detekována ve všech frakcích.

Z konjugačních enzymů se největší význam přikládal vždy GST (Cvilink et al., 2009). V našem experimentu jsme aktivitu tohoto enzymu detekovali ve všech frakcích, přičemž v cytosolické frakci došlo k jejímu zvýšení. Podobně bylo zvýšení aktivity GST pozorováno u *H. contortus* (Vokřál et al., 2010) po expozici FLU a u *F. hepatica* (Scarcella et al., 2013) po expozici TCBZ. U *H. diminuta*, stejně jako

u ostatních helmintů, ale v předchozích studiích nebyly nalezeny konjugační metabolity léčiv s GSH (Bártíková et al., 2012; Matoušková et al., 2016). Z tohoto důvodu se spekuluje, že význam GST nespočívá jen v její funkci konjugačního enzymu ale také jako proteinu, který xenobiotika nespecificky vyvazuje. To by souhlasilo s naším měřením aktivity GR, která přeměňuje oxidovaný glutathion na redukovaný glutathion, která po expozici MBZ zvýšena nebyla. Naopak u ní po expozici koncentrovanějšímu 10 μ M MBZ došlo ke snížení aktivity.

Aktivity UGT a UGlcT jsou u helmintů detekovány sporadicky (Cvilink et al., 2009). U *H. diminuta* nebyly nalezeny konjugáty léčiv glukuronovou kyselinou ani s glukosou a aktivita byla nalezena pouze u UGlcT v mitochondriální frakci (Bártíková et al., 2012). Sporadická byla detekce aktivit těchto enzymů i v našem experimentu, navíc když byla aktivita detekována, tak s velkými odchylkami mezi jednotlivými měřeními. Na vině může být metodika práce, kterou jsme museli uzpůsobit naším laboratorním podmínkám a spotřebě velkého objemu frakcí u tohoto měření. Výsledky měření aktivit těchto enzymů bych tedy neoznačila za směrodatné a bylo by dobré měření v budoucnu znovu zopakovat.

Metabolismus léčiv a aktivity biotransformačních enzymů byly u tasemnic již do jisté míry studovány (Bártíková et al., 2012; Prchal et al., 2014). V našem experimentu jsme prokázali, že expozice léčivu, v našem případě MBZ, může mít vliv na aktivitu těchto enzymů, což může mít vliv na rozvoj rezistence k anthelmintikům u tasemnic.

7 ZÁVĚR

V boji proti helmintorezistenci je zásadní získávání nových poznatků o mechanismech jejího vzniku. Důležité je objasnění role enzymů metabolizujících xenobiotika v rozvoji tohoto fenoménu.

Modelovou tasemnicí krysí (*H. diminuta*) jsme izolovali z definitivního hostitele potkana (*R. norvegicus*) za použití potemníka moučného (*T. molitor*) jako mezihostitele. Izolované tasemnice byly inkubovány po dobu 24 hodin s 1 μ M a 10 μ M MBZ, byly připraveny subcelulární frakce a stanoveny aktivity vybraných enzymů.

Na základě našich experimentů můžeme říct, že *H. diminuta* je schopna v reakci na přítomnost anthelmintika MBZ zvýšit aktivitu enzymů metabolizujících xenobiotika. K nejvýraznějším změnám došlo v cytosolické frakci, kde jsme pozorovali zvýšení aktivity AKR1A1, GST, peroxidasy, katalasy a SOD. Nárůst aktivity AKR1A1 odpovídá našim předpokladům, jelikož reductasy jsou zodpovědné za metabolismus MBZ. Zajímavý je nárůst aktivity GST, jelikož u *H. diminuta* nebyla pozorována tvorba konjugátů anthelmintik s GSH. GST tak pravděpodobně hraje roli proteinu nespecificky vázajícího anthelmintika. Katalasa, peroxidasa a SOD jsou primárně antioxidační enzymy, v metabolismu léčiv se však o nich spekuluje jako o enzymech potenciálně oxidujících léčiva. V mitochondriální frakci jsme pozorovali nárůst aktivity AKR1C.

Naše výsledky tak podporují hypotézu, že enzymy metabolizující xenobiotika hrají roli v rozvoji helmintorezistence tasemnic.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anzenbacher, P., Zanger, U.M., 2012. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*, 1st ed. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Bártíková, H., Vokřál, I., Forstová-Křížová, V., Skálová, L., Lamka, J., Szotáková, B., 2011. The transport of albendazole and albendazole sulphoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Vet. Parasitol.* 176, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.040>
- Bártíková, H., Vokřál, I., Skálová, L., Kubíček, V., Firbasová, 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, 809–818. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002265>
- Bártíková, H., Vokřál, I., Skálová, L., Lamka, J., Szotáková, B., 2010. *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*. *Xenobiotica* 40, 593–601. <https://doi.org/10.3109/00498254.2010.497565>
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Triton.
- Bogitsh, B.J., Oeltmann, T.N., Carter, and C.E., 2005. *Human Parasitology*, 3rd ed. Elsevier Science.
- Brennan, G.P., Fairweather, I., Trudgett, A., Hoey, E., McCoy, McConville, M., Meaney, M., Robinson, M., McFerran, N., Ryan, L., Lanusse, C., Mottier, L., Alvarez, L., Solana, H., Virkel, G., Brophy, P.M., 2007. Understanding triclabendazole resistance. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.01.009>
- Brophy, P.M., Barrett, J., 1990. Blocking factors and the isolation of glutathione transferases from *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 100, 137–141.
- CDC - DPDx, 2017. Hymenolepiasis [WWW Dokument]. Centers Dis. Control Prev. URL <https://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis/index.html> (Přístup 6. 2. 2018).
- Cvilink, V., Kubíček, V., Nobilis, M., Křížová, V., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Kuběnová, M., Novotná, R., Gavelová, M., Skálová, L., 2008. Biotransformation of

- flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 151, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.010>
- Cvilink, V., Lamka, J., Skálová, L., 2009. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab. Rev.* 41, 8–26. <https://doi.org/10.1080/03602530802602880>
- Cvilink, V., Skálová, L., Szotáková, B., Lamka, J., Kostianen, R., Ketola, R.A., 2008. LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 337–343. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1863-9>
- Cvilink, V., Szotáková, B., Křížová, V., Lamka, J., Skálová, L., 2009. Phase I biotransformation of albendazole in lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Res. Vet. Sci.* 86, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.006>
- Dayan, A.D., 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* 86, 141–159. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00031-7)
- Devine, C., Brennan, G.P., Lanusse, C.E., Alvarez, L.I., Trudgett, A., Hoey, E., Fairweather, I., 2012. Potentiation of triclabendazole action *in vivo* against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. *Vet. Parasitol.* 184, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.006>
- Dewey, S., 2001. *Hymenolepis diminuta* [WWW Dokument]. *Anim. Divers. Web.* URL http://animaldiversity.org/accounts/Hymenolepis_diminuta/ (Přístup 6. 2. 2018).
- EMA-European Medicines Evaluation Agency, 2001. Mebendazole summary report (2) by CVMP, EMA/MRL/781/01-FINAL. Emea 1–9.
- Furtado, L.F.V., de Paiva Bello, A.C.P., Rabelo, É.M.L., 2016. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Trop.* 162, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021>
- Garcia, L.S., 2006. *Diagnostic Medical Parasitology*, 5th ed. ASM Press.
- Godoy, P., Lian, J., Beech, R.N., Prichard, R.K., 2015. *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-2: *In situ* localisation and characterisation of macrocyclic lactone

- transport. *Int. J. Parasitol.* 45, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.09.008>
- Higgins, C.F., 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res. Microbiol.* 152, 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01193-7)
- James, C.E., Hudson, A.L., Davey, M.W., 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol.* 25, 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.04.004>
- Junquera, P., 2017. BENZIMIDAZOLES for veterinary use as ANTIHELMINTICS on CATTLE, SHEEP, GOATS, PIG, POULTRY, DOGS and CATS against parasitic worms [WWW Dokument]. Parasitipedia. URL http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2440&Itemid=2701 (Přístup 25. 2. 2018).
- Kasinathan, R.S., Morgan, W.M., Greenberg, R.M., 2010. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. *Mol. Biochem. Parasitol.* 173, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.003>
- Kim, T.H., Hwang, S.B., Jeong, P.Y., Lee, J., Cho, J.W., 2005. Requirement of tyrosylprotein sulfotransferase-A for proper cuticle formation in the nematode *C. elegans*. *FEBS Lett.* 579, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.044>
- Kołodziej, P., Rzymowska, J., Stępień-Rukasz, H., Lorencowicz, R., Lucińska, M., Dzióbek, M., 2014. Analysis of a child infected with *Hymenolepis diminuta* in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 510–511. <https://doi.org/10.5604/12321966.1120592>
- Kotze, A.C., 2000. Oxidase activities in macrocyclic-resistant and -susceptible *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 86, 873–6. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0873:OAIMRA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0873:OAIMRA]2.0.CO;2)
- Kotze, A.C., 1997. Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int. J. Parasitol.* 27, 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00161-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00161-0)
- Kumkate, S., Chunchob, S., Janvilisri, T., 2008. Expression of ATP-binding cassette

- multidrug transporters in the giant liver fluke *Fasciola gigantica* and their possible involvement in the transport of bile salts and anthelmintics. *Mol. Cell. Biochem.* 317, 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9833-2>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.001>
- Laing, S.T., Ivens, A., Laing, R., Ravikumar, S., 2010. Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem. J.* 432, 505–514.
- Lincke, C.R., The, I., van Groenigen, M., Borst, P., 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 228, 701–711.
- Martin, R.J., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11–34. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>
- Melon, A., Wang, A., Phan, V., McKay, D.M., 2010. Infection with *hymenolepis diminuta* is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/384523>
- Messerli, S.M., Kasinathan, R.S., Morgan, W., Spranger, S., Greenberg, M., Immunology, M., Munchen, H.Z., Germany, M., 2010. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility 167, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.007>. *Schistosoma*
- Munguía, B., Michelena, M., Melian, E., Saldaña, J., Ures, X., Manta, E., Domínguez, L., 2015. Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites. *Exp. Parasitol.* 153, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.03.013>

- Munir, W.A., Barrett, J., 1985. The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology* 91, 145–156.
- New World Encyclopedia contributors, 2009. Tapeworm [WWW Dokument]. New World Encycl. URL <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Tapeworm> (Přístup 12. 2. 2018).
- Nicolao, M.C., Denegri, G.M., Cárcamo, J.G., Cumino, A.C., 2014. P-glycoprotein expression and pharmacological modulation in larval stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Int.* 63, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.017>
- Nishimuta, H., Nakagawa, T., Nomura, N., Yabuki, M., 2013. Significance of reductive metabolism in human intestine and quantitative prediction of intestinal first-pass metabolism by cytosolic reductive enzymes. *Drug Metab. Dispos.* 41, 1104–1111. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.051177>
- Pappas, P.W., Barley, A.J., 1999. Beetle-to-Beetle Transmission and Dispersal of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) Eggs via the Feces of *Tenebrio molitor*. *J. Parasitol.* 85, 384. <https://doi.org/10.2307/3285655>
- Patamia, I., Cappello, E., Castellano-Chiodo, D., Greco, F., Nigra, L., Cacopardo, B., 2010. A human case of *Hymenolepis diminuta* in a child from eastern Sicily. *Korean J. Parasitol.* 48, 167–169. <https://doi.org/10.3347/kjp.2010.48.2.167>
- Pearson, R.D., 2016. *Hymenolepis diminuta* Infection [WWW Dokument]. Merck Manuals Prof. Version. URL <http://www.merckmanuals.com/en-pr/professional/infectious-diseases/cestodes-tapeworms/hymenolepis-diminuta-infection> (Přístup 11. 2. 2018).
- Pica-Mattoccia, L., Carlini, D., Guidi, A., Cimica, V., Vigorosi, F., Cioli, D., 2006. The schistosome enzyme that activates oxamniquine has the characteristics of a sulfotransferase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 307–312. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900048>
- Prechal, L., Bartikova, H., Becanova, A., Jirasko, R., Vokral, I., Stuchlikova, L., Skalova, L., Kubicek, V., Lamka, J., Trejtnar, F., Szotakova, B., 2015. Biotransformation of anthelmintics and the activity of drug-metabolizing enzymes in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Parasitology* 142, 648–659.

- 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. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001711>
- Prchal, L., Vokřál, I., Kašný, M., Rejšková, L., Zajíčková, M., Lamka, J., Skálová, L., Lecová, L., Szotáková, B., 2016. Metabolism of drugs and other xenobiotics in giant liver fluke (*Fascioloides magna*). *Xenobiotica* 46, 132–140. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1060370>
- Raines, P., Barrett, J., 1988. *Hymenolepis diminuta*: lack of sulphate activation and sulphotransferase activity. *Exp. Parasitol.* 65, 209–213.
- Rozario, T., Newmark, P.A., 2015. A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Exp. Parasitol.* 158, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.015>
- Saeed, H.M., Mostafa, M.H., O'Connor, P.J., Rafferty, J.A., Doenhoff, M.J., 2002. Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms. *FEBS Lett.* 519, 205–209. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02755-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02755-2)
- Saier, M.H., Reddy, V.S., Tamang, D.G., Västermark, Å., 2014. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* 42, 251–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1097>
- Scarcella, S., Solana, M. V., Fernandez, V., Lamenza, P., Ceballos, L., Solana, H., 2013. Increase of glutathione S-transferase, carboxyl esterase and carbonyl reductase in *Fasciola hepatica* recovered from triclabendazole treated sheep. *Mol. Biochem. Parasitol.* 191, 63–65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.09.002>
- Skálová, L., Boušová, I., 2013. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, 1st ed. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Smrž, J., 2014. *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Stuchlikova, L., Jirasko, R., Vokral, I., Valat, M., Lamka, J., Szotakova, B., Holcapek,

- M., Skalova, L., 2014. Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Test. Anal.* 6, 1055–1062.
- Tanowitz, H.B., Wittner, M., White, A.C., 2011. Introduction to Tapeworm Infections, Third Edit. ed, *Tropical Infectious Diseases*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00118-X>
- Tena, D., Simon, M.P., Gimeno, C., Pomata, M.T.P., Illescas, S., Amondarain, I., Gonzalez, A., Dominguez, J., Bisquert, J., 1998. Human infection with *Hymenolepis diminuta*: Case report from Spain. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2375–2376.
- Vokřál, I., Bártíková, H., Prchal, L., Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., Lamka, J., Kubicek, V., 2012. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology* 139, 1309–1312.
- 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, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.018>
- Vokřál, I., Křížová, V., Lamka, J., Kubíček, V., Szotáková, B., Várady, M., Nobilis, M., Skálová, L., 2010. Effect of Flubendazole on Biotransformation Enzymes Activities in *Haemonchus contortus*. *Open Parasitol. J.* 4, 24–28. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010024>
- Volf, P., Horák, P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*, Triton.
- Webb, C., Cabada, M.M., 2017. Intestinal cestodes. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 30, 504–510. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000400>