

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**VLIV PARAZITA NA AKTIVITU
BIOTRANSFORMAČNÍCH A ANTIOXIDAČNÍCH
ENZYMŮ VE STŘEVĚ HOSTITELE**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Zuzana Mládková

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

V Hradci Králové 2018

.....

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat své školitelce prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vřelý přístup v průběhu celého vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. a PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za užitečné rady při realizaci experimentální části. Také děkuji celému kolektivu katedry biochemických věd za poskytnutí velmi příjemného pracovního prostředí.

Tato práce je součástí výzkumného projektu Univerzity Karlovy *SVV 260 416*.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Zuzana Mládková

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

Název diplomové práce: **Vliv parazita na aktivitu biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevě hostitele**

Hymenolepis diminuta, tasemnice krysí, je běžně využívána jako modelový organismus třídy *Cestoda* pro studium fyziologie, biochemie a metabolismu léčiv u tasemnic. V poslední době je *Hymenolepis diminuta* zkoumána i v souvislosti s helmintoterapií a potenciálním využitím v léčbě střevních zánětlivých chorob. Cílem této studie bylo zjistit, jak *H. diminuta* ovlivní aktivitu detoxikačních enzymů ve střevě hostitele. Nejdříve bylo infikováno 6 potkanů (kmene Wistar). Těm byly podány cysticerkoidy (larvální stádia tasemnice krysí) získané po předchozí izolaci z nakaženého brouka *Tenebrio molitor* (mezihostitel). Současně byl podán kontrolní skupině dalších 6 potkanů fyziologický roztok. Všichni potkani pak byli chováni ve vivariu po dobu 2 měsíců za střídavého světelného režimu (12 h světlo/tma). Následně byly tasemnice vyjmuty ze střev infikovaných potkanů a ze všech potkanů byla izolována střevní mukóza obsahující metabolicky aktivní enzymy. Poté byly připraveny subcelulární frakce pro následný *in vitro* experiment. K měření aktivity enzymů byla použita spektrofotometrie a spektrofluorimetrie. Z naměřených výsledků vyplývá, že *Hymenolepis diminuta* je schopna ovlivnit aktivitu biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevě hostitele. Z enzymů 1. fáze metabolismu došlo k ovlivnění některých isoform cytochromu P 450 a některých reduktas. Z konjugačních enzymů došlo v přítomnosti parazita k nárůstu enzymatické aktivity sulfotransferas. Některé enzymy oxidačního stresu jako katalasa a peroxidasy vykazovaly rovněž vyšší hladiny oproti kontrole. Výsledky této práce tak pomohly prohloubit znalosti o tom, jak *Hymenolepis diminuta* může ovlivnit svého hostitele.

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Zuzana Mládková

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

Title of diploma thesis: **Effect of parasite on activity of biotransformation and antioxidant enzymes in host intestine**

Hymenolepis diminuta, known as a rat tapeworm, is commonly used in science as a model of *Cestoda* for studying physiology, biochemistry and drug metabolism in tapeworms. Recently, *Hymenolepis diminuta* has been studied for helminth-based therapy for a potential treatment of inflammatory bowel disease. The aim of this study was to determine how *H. diminuta* influences the activity of detoxification enzymes of the host intestine. At first 6 male rats (Wistar breed) were infected by cysticercoids of *Hymenolepis diminuta* previously isolated from the beetles *Tenebrio molitor* (intermediate host). At the same time the physiological saline solution was administered to the control group of 6 male rats. All rats were housed for 2 months in animal quarters with 12 h light/dark cycle. Thereafter, the tapeworms were removed from their intestines. Intestinal mucosa containing metabolic active enzymes was isolated. Subsequently, the subcellular fractions were prepared and used for *in vitro* experiment. The activity of enzymes was measured by spectrophotometry and spectrofluorimetry. The results show that *H. diminuta* is able to affect the activity of biotransformation and antioxidant enzymes. The activity of some enzymes of the Phase I of metabolism was influenced, several isoforms of cytochrome P450 and reductases. The activity of conjugation enzymes, especially sulfotransferases, was increased in intestine of rats infected by *H. diminuta*. Concerning the antioxidant enzymes, the activity of catalase and peroxidases were increased in comparison with the control group. The results of this study helped to deepen knowledge how the helminth *Hymenolepis diminuta* can influence its host.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Hymenolepis diminuta	9
2.1.1. Morfologie a fyziologie	9
2.1.2. Životní cyklus	12
2.1.3. Hymenolepióza	15
2.2. Helmintoterapie	15
2.2.1. Hygienická hypotéza	17
2.2.2. „Old friends“ hypotéza	17
2.2.3. Požadavky při výběru helminta	17
2.2.4. Helmintoterapie v současnosti	19
2.3. Biotransformační enzymy	19
2.3.1. Enzymy 1. fáze biotransformace	19
2.3.2. Enzymy 2. fáze biotransformace	23
2.4. Antioxidační enzymy	24
3. CÍL PRÁCE	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1. Chemikálie	28
4.2. Přístroje	29
4.3. Výpočetní programy	30
4.4. Zásobní roztoky	30
4.5. Získání biologického materiálu	31
4.6. Příprava subcelulárních frakcí	32
4.7. BCA stanovení bílkoviny	33
4.8. Stanovení aktivity enzymů 1. fáze biotransformace	35
4.8.1. Stanovení aktivity některých isoformů cytochromu P450	35
4.8.2. Stanovení aktivity FMO	38
4.8.3. Stanovení aktivity AKR1A1	39
4.8.4. Stanovení aktivity reduktas metyraponu	40
4.8.5. Stanovení aktivity AKR1C9	41
4.8.6. Stanovení aktivity CBR1	42
4.9. Stanovení aktivity enzymů 2. fáze metabolismu	44
4.9.1. Stanovení aktivity UGT	44

4.9.2. Stanovení aktivity SULT	45
4.9.3. Stanovení aktivity GST	47
4.10. Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	48
4.10.1. Stanovení aktivity peroxidas	48
4.10.2. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy	49
4.10.3. Stanovení aktivity glutathionreduktasy	50
4.10.4. Stanovení aktivity thioredoxinreduktasy	52
4.10.5. Stanovení aktivity katalasy	53
5. VÝSLEDKY	55
5.1. Koncentrace proteinů	55
5.2. Ovlivnění enzymů 1. fáze metabolismu přítomností tasemnice	56
5.2.1. Aktivita některých isoform cytochromu P450.....	56
5.2.2. Aktivita FMO	57
5.2.3. Aktivita AKR1A1	58
5.2.4. Aktivita reduktas metyraponu	59
5.2.5. Aktivita AKR1C9	61
5.2.6. Aktivita CBR1	62
5.3. Ovlivnění enzymů 2. fáze metabolismu přítomností tasemnice	63
5.3.1. Aktivita UGT, SULT, GST	63
5.4. Ovlivnění antioxidačních enzymů přítomností tasemnice	64
5.4.1. Aktivita peroxidas	64
5.4.3. Aktivita glutathionreduktasy	67
5.4.4. Aktivita thioredoxinreduktasy	68
5.4.5. Aktivita katalasy	69
6. DISKUZE	71
7. ZÁVĚR	76
SEZNAM ZKRATEK	77
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79

1. ÚVOD

Hymenolepis diminuta, tasemnice krysí, je kosmopolitně rozšířený druh tasemnice. V laboratorních podmínkách se vzhledem ke snadné infekci a použití mezihostitelů i definitivních hostitelů stala modelovým organismem jak pro studium metabolismu anthelmintik či jiných xenobiotik, tak i pro studium biochemie, fyziologie a morfologie u celé třídy *Cestoda* (Bártíková et al. 2012).

V současné době jsou někteří parazité (včetně *Hymenolepis diminuta*) zkoumáni v souvislosti s tzv. helmintoterapií. Bylo totiž zjištěno, že parazité mohou být pro imunitní systém svého hostitele prospěšní. Tato terapie využívá imunomodulační schopnosti helmintů, kteří mohou přispět ke zdravému vývoji imunitního systému a mohou ho zacílit správným směrem. Helmintoterapie zaznamenává úspěchy zvláště u autoimunitních onemocnění, jejichž počty vzrůstají v civilizovaných zemích, kde je vysoká úroveň hygienických standardů. Někteří parazité jsou již v druhé fázi klinického testování. *Hymenolepis diminuta* se jeví jako další potenciálně vhodný kandidát pro využití v helmintoterapii s možností léčby střevních zánětlivých onemocněních jako je ulcerativní kolitida a Crohnova choroba (Helmbj 2015, Fleming & Weinstock 2015).

V této práci byl studován vliv tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) na aktivitu vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevě hostitele. Změna enzymatických aktivit se může projevit nejen změnou metabolismu léčiv, ale zároveň může ovlivnit metabolismus endogenních látek. To vše se může podílet na ovlivnění obranyschopnosti hostitele.

2. TEORETICKÁ ČÁST

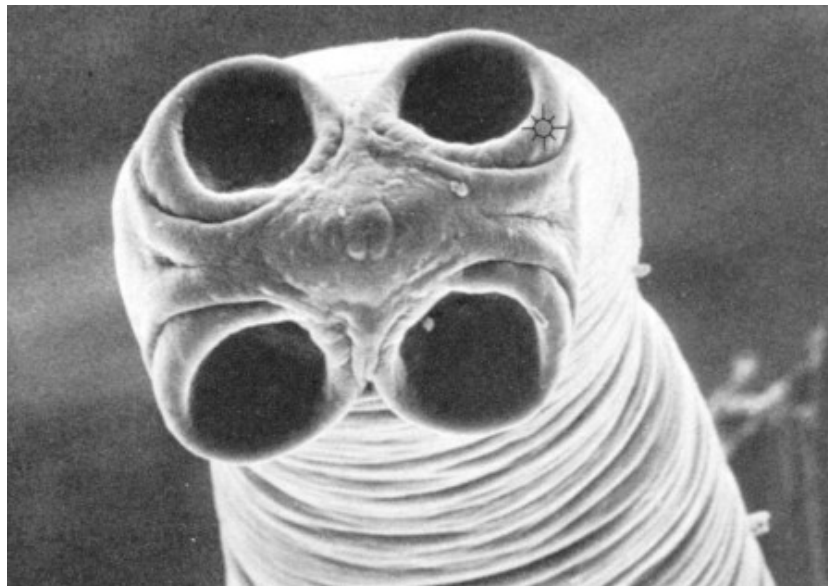
2.1. *Hymenolepis diminuta*

Hymenolepis diminuta, tasemnice krysí, je taxonomicky řazena do kmene *Platyhelminthes*, třídy *Cestoda*, řádu *Cyclophyllidea*, čeledi *Hymenolepididae* a rodu *Hymenolepis* (Volf et al. 2007). Tasemnici krysí poprvé popsal v roce 1819 německý anatom, zoolog a parazitolog Karl Asmund Rudolphi (Arai 1980).

2.1.1. Morfologie a fyziologie

Dospělá tasemnice *Hymenolepis diminuta* má dorzálně zploštělé tělo dosahující délky 20–60 cm (Jíra 1998). Tělo dospělého jedince lze rozdělit do tří částí: skolex (hlavička), krček a strobilum (tělo).

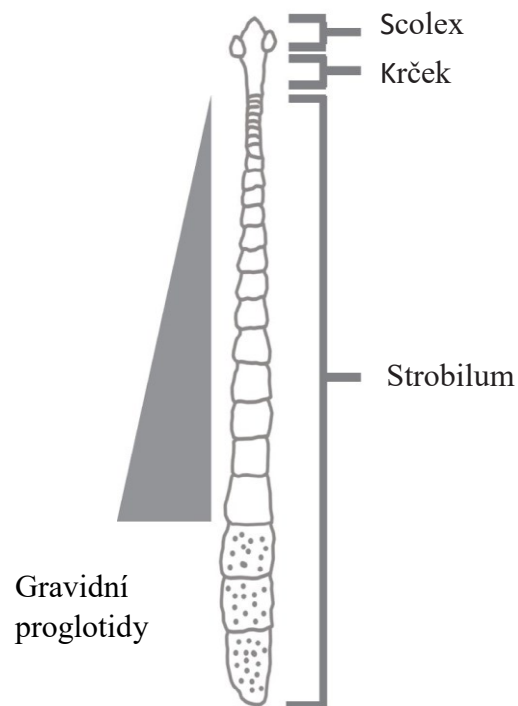
Na povrchu hlavičky (skolex) se nacházejí dva páry kruhovitých přísavek sloužících k adhezi ke střevní stěně hostitele (Obr. 1). Centrálně mezi přísavkami lze najít vysunovatelný chobotek (rostellum), který je zevně pokryt mikrotrichy (Rozario & Newmark 2015). Rostellum u *Hymenolepis diminuta* není na rozdíl od blízkého druhu *Hymenolepis nana* opatřeno rostelárními háčky (Garcia 2007).



Obr. 1 Scolex *Hymenolepis diminuta* se 4 přísavkami a chobotkem. Zdroj: Ubelaker et al. 1973.

Druhou částí těla *Hymenolepis diminuta* je krček, který slouží jako aktivní proliferační oblast, z níž se postupně vytváří strobilum (Bolla & Roberts 1971).

Strobilum se skládá ze stovek až tisíců jednotlivých článků. Každý článek tvoří samostatnou reprodukční jednotku. Články (proglotidy) postupně vznikají směrem od krční části. Nejstarší proglotidy se tedy nacházejí v distální části těla a obsahují zralá vajíčka (Rozario & Newmark 2015).



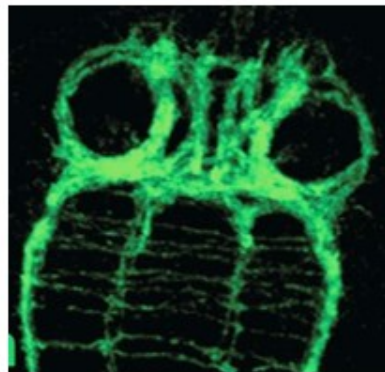
Obr. 2 Schéma stavby těla *H. diminuta*. Upraveno dle Rozaria & Newmarka 2015.

Z povrchu celého těla u tasemnic vystupují tzv. mikrotrichy. Jedná se o přeměněné mikroklky, které zvětšují tělní povrch (Volf et al. 2007). Zevně jsou mikrotrichy kryty glykokalyxem, vrstvou makromolekul se sacharidy, která chrání parazita (Rodrigues et al. 2015). Důležitou součástí povrchu těla tvoří tegument neboli neodermis. Jedná se o povrchové syncytium, které má těla buněk zanořena pod vrstvou povrchové svaloviny. Tegument zajišťuje plnění dvou značně protichůdných funkcí. Umožňuje jak funkci ochrannou před trávicími šťávami a imunitním systémem hostitele, tak současně zajišťuje i absorpci živin z trávicího traktu. Pro všechny tasemnice včetně *Hymenolepis diminuta*

je totiž typická absence střeva, takže povrchové syncytium je hlavním místem příjmu potravy (Volf et al. 2007).

Svalstvo *Hymenolepis diminuta* se skládá z podélných a kruhových svalových svazků, šikmá svalovina u všech tasemnic chybí (Volf et al. 2007). Svalovina je vytvořena i u adhezivních orgánů jako je rostellum a přísavky. U *Hymenolepis diminuta* díky tomu dochází k oddělení a následnému připojení k jiným místům ve střevě hostitele (Xie et al. 2017). Svalstvo je tedy pro tasemnici krysí nezbytné, neboť svalová kontrakce slouží k lokomoci ve střevě či ke spojení se střevní stěnou (Rozario & Newmark 2015).

Nervová soustava je u *Hymenolepis diminuta* provazcovitá (Obr. 3). Její základ tvoří párová hlavová ganglia umístěná pod basální částí přísavek. Z nich vybíhají dva laterální a dva mediální nervové provazce. V přední hlavové části inervují přísavky a rostellum, v zadní části prostupují celé strobilum. Ve strobilu mají nervové svazky pravidelné uspořádání. Podélné svazky jsou příčně spojeny tzv. komisurami. V každém proglotidu jsou obvykle tři příčné komisury (Arai 1980, Rozario & Newmark 2015).



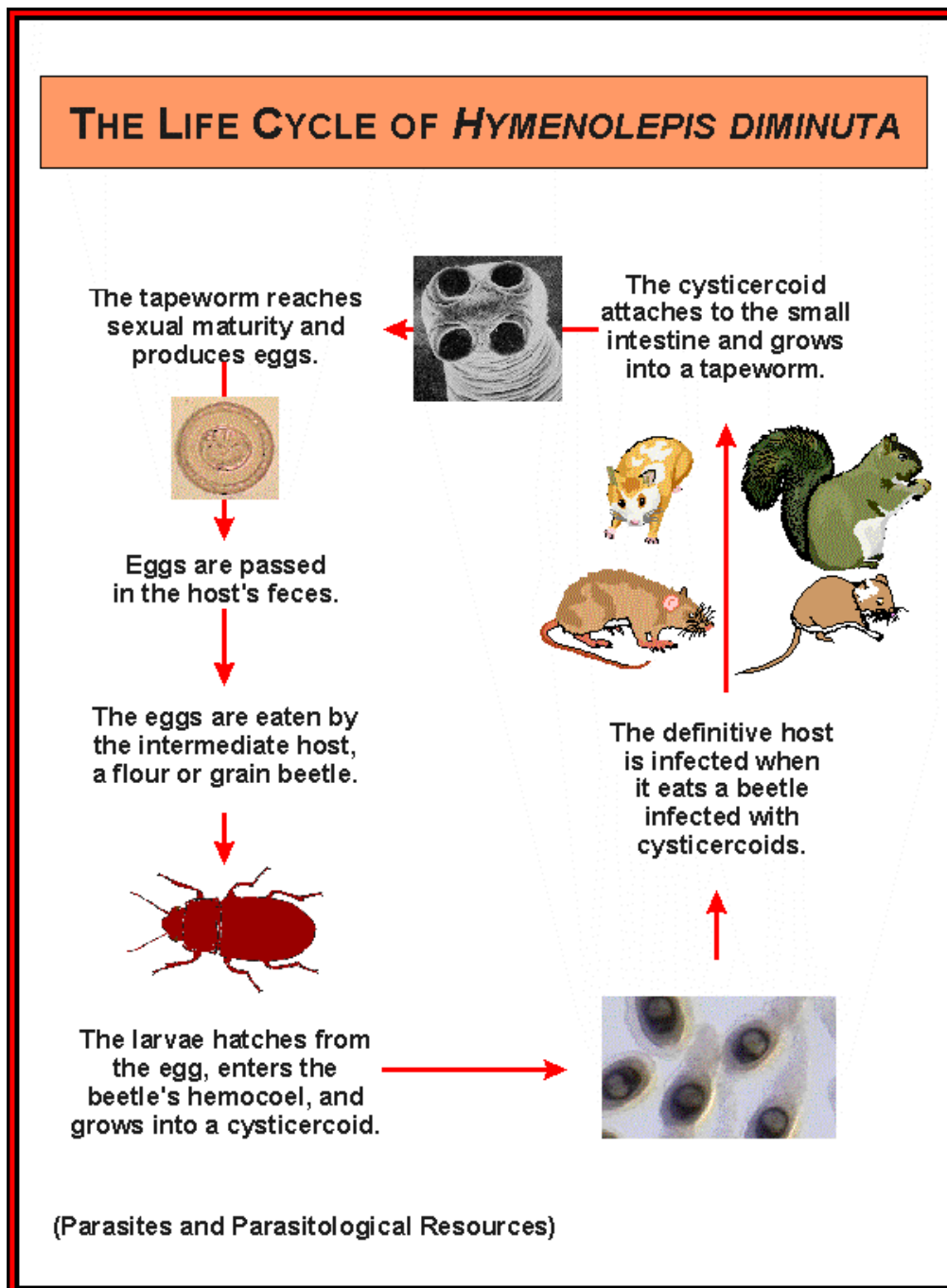
Obr. 3 Hlavová ganglia a provazcovitá nervová soustava *H. diminuta* vizualizovaná anti-synapsinem. Zdroj: Rozario & Newmark 2015.

Exkreční a osmoregulační systém je u *Hymenolepis diminuta* tvořen protonefridiemi. Jedná se o rozvětvené kanálky, na jejichž počátku jsou plaménkové buňky, které fungují jako primitivní nefrony. Z plaménkových buněk vystupují bičíky, které svým pohybem připomínají plamen. Vířením svazků bičíků se část tělní tekutiny vhání do sběracího kanálku, kde se zpět do těla vstřebávají některé užitečné látky a ven na povrch vytéká voda a odpadní látky (Volf et al. 2007, Rozario & Newmark 2015).

Hymenolepis diminuta je hermafrodit a v každém článku je obsažena samčí i samičí reprodukční soustava (Volf et al. 2007). Samčí reprodukční systém tvoří testes, v nichž se postupně vyvíjí ze spermatogonálních kmenových buněk spermatozoa (Kelsoe et al. 1977). Další součástí samčího pohlavního systému je ejakulační orgán cirrus. Cirrus se může rozšířit i mimo proglotid a proniknout tak jiným článkem přes samičí genitální atrium. Samičí pohlavní soustavu dále tvoří laločnatý vaječník, v němž postupně dozrávají oocyty (Rozario & Newmark 2015). Důležitým rysem je, že články v proximální části těla v blízkosti krčku nejsou zralé a obsahují nevyvinuté pohlavní orgány. S postupným zráním jedince *Hymenolepis diminuta* se postupně vyvíjí a zrají pohlavní orgány, a proto články směrem k distálnímu konci těla obsahují již vyvinuté samčí a samičí pohlavní orgány. Oplození nastává nejčastěji mezi dvěma tasemnicemi, nebo mezi články na stejné strobile, jestliže se ve střevě vyskytuje jen jeden jedinec. Terminální články jsou gravidní a obsahují vajíčka, která poté mohou být uvolněna do vnějšího prostředí (Rozario & Newmark 2015, Volf et al. 2007).

2.1.2. Životní cyklus

Životní cyklus *Hymenolepis diminuta* (viz Obr. 4) je nepřímý, neboť tato tasemnice není schopna dokončit svůj vývoj v jediném hostiteli (Rozario & Newmark 2015). Mezihostitelem je hmyz, konkrétně se jedná o brouky rodu *Tenebrio* (*Tenebrio molitor* – potěmník moučný) nebo *Tribolium* (*Tribolium castaneum* – potěmník hnědý; *Tribolium confusum* – potěmník skladištní), případně také blechy. Konečným hostitelem je hlodavec (krysa, potkan). Definitivním hostitelem se ve výjimečných případech může stát i člověk (Andreassen et al. 1999).



Obr. 4 Vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta*. Zdroj: www.web.stanford.edu.

Podrobněji lze konstatovat, že oplozená vajíčka v terminálních proglottidech jsou uvolněna do vnějšího prostředí společně se stolicí konečného hostitele (Rozario & Newmark 2015). Vajíčka mají nažloutlou barvu a jejich velikost se pohybuje mezi 60-79 μm . Uvnitř vajíčka se vyvíjí první larva onkosféra (hexakant), která je opatřena 6 háčky a zevně je kryta ochrannými obaly (Garcia 2007).

V případě pozření vajíčka mezihostitelem (brouk rodu *Tenebrio* či *Tribolium*) dochází k odloučení ochranných obalů a k postupnému průniku do střeva mezihostitele. Následně pak onkosféra proniká střevní stěnou do hoemocelu, což je tělní dutina, která je součástí oběhové soustavy hmyzu. Zde se zhruba po 10 dnech vyvíjí druhá larva označovaná jako cysticerkoid (Obr. 5). Cysticerkoid je infekční stádium (Andreassen et al. 1999, Hartenstein & Jones 2003, Rozario & Newmark 2015).



Obr. 5 Cysticerkoid. Foto: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

U mezihostitele vývojové stádium tasemnice krysí vyvolává i některé změny chování. Bylo prokázáno, že infikovaní brouci projevují nižší pohybovou aktivitu a zároveň u nich došlo ke ztrátě fotofobního chování, čímž se infikovaný brouk stává snadnější kořistí pro definitivního hostitele (Hurd & Fogo 1991, Robb & Reid 1996). Dále přítomnost larválních stádií u mezihostitele vede ke snížení reprodukce blokováním vaječných receptorů pro vitellogenin (Warr et al. 2006, Volf et al. 2007).

V další fázi vývojového cyklu je infikovaný mezihostitel, jenž obsahuje cysticerkoidy, pozřen definitivním hostitelem. Tím je hlodavec, nejčastěji potkan nebo krysa (Garcia 2007). Infekčnost cysticerkoidů je velmi vysoká. Průměrně 95 % cysticerkoidů se vyvine v dospělé jedince *Hymenolepis diminuta* (Stradowski 1994). Míra úspěšnosti nákazy závisí i na množství cysticerkoidů, jimiž je potkan infikován. Při nákaze 1–20 cysticerkoidy je výtěžnost 100–65 %. V případě infekce 20–40 cysticerkoidy průměrná výtěžnost klesá na 13–2 % (Hesselberg & Andreassen 1975).

V trávicím traktu definitivního hostitele dojde k postupnému uvolnění cysticerkoidů. Cysticerkoid postupně ztrácí i vnější obal a procesem tzv. excystace dochází ve dvanáctníku k uvolnění nového jedince *Hymenolepis diminuta*. Tento juvenilní jedinec

má skolex s přísavkami, pomocí nichž je již schopen se uchytit ke stěně střeva, kde následně během 3 týdnů dospívá do reprodukční zralosti (Goodchild & Harrison 1961, Rozario & Newmark 2015).

Ve střevě definitivního hostitele se uplatňuje tzv. crowding efekt, kdy s narůstajícím počtem tasemnic se snižuje jejich velikost. Nedostatek prostoru je tedy jeden z významných faktorů působící na morfometrii *Hymenolepis diminuta* (Read 2000).

2.1.3. Hymenolepióza

Ačkoli běžně je definitivním hostitelem hlodavec, může se jím ve výjimečných případech stát i člověk. Od počátku 20. století do roku 2016 bylo celkově zaznamenáno kolem 500 případů infekce u člověka (Ahmad et al. 2017). Nakazit se může pozřením cereálií s mezihostitelem nebo nedostatečným tepelným zpracováním brouků rodu *Tenebrio* či *Tribolium* konzumovaných jako pokrm v zemích jihovýchodní Asie. Jak uvádí Wiwanitkit (2004), výskyt infekce v Thajsku je sporadický a v 9 z 10 případů asymptomatický. Zcela vzácně se infekce může projevit průjemem, abdominálním diskomfortem, nauseou či malátností. Lékem volby je prazikvantel v dávce 5–10 mg/kg tělesné hmotnosti nebo niklosamid (Garcia 2007, Ahmad et al. 2017, Kilincel et al. 2015).

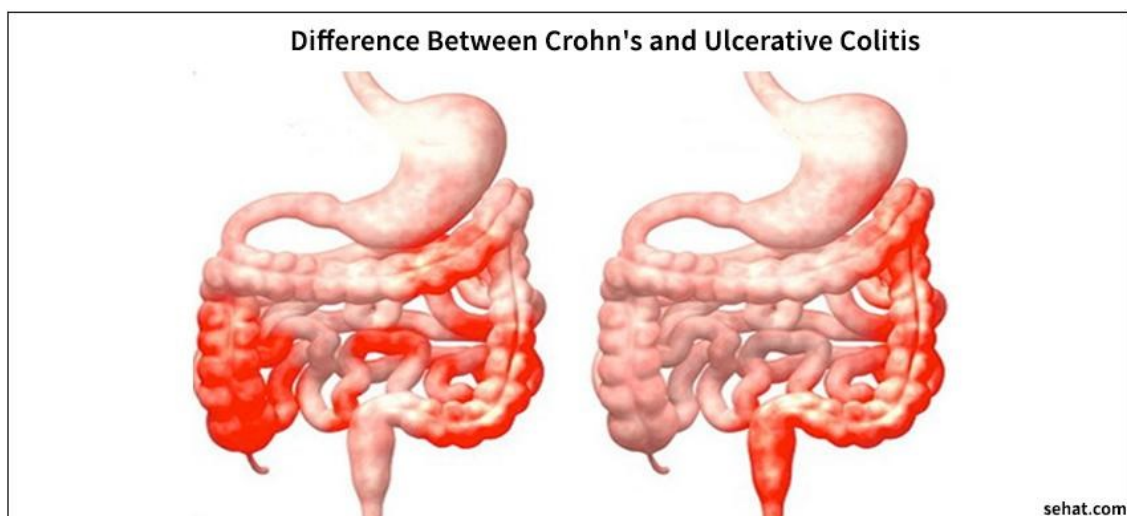
2.2. Helmintoterapie

Helminti doprovázejí lidstvo v průběhu celé evoluce člověka. Během této doby si dokázali vytvořit efektivní adaptační mechanismus na lidský organismus. Ten zahrnuje i vliv na imunitní systém, neboť aby mohli v hostiteli co nejdéle přežít, potřebují lidský imunitní systém potlačit a modulovat. Helminté tak v průběhu tisíců let měli vliv na vývoj imunitního systému a stali se efektivními imunomodulátory (Weinstock & Elliott 2009, Smyth et al. 2017).

K myšlence helmintoterapie vedl fakt, že během 20. století došlo k rapidnímu nárůstu střevních autoimunitních chorob jako je Crohnova choroba či ulcerativní kolitida v ekonomicky vyspělých zemích, zatímco v rozvíjejících se zemích, kde jsou infekce

helminty běžné, je prevalence střevních autoimunitních chorob nízká (Gazi et al. 2017, Heylen et al. 2014).

Odhaduje se, že celosvětově trpí střevními autoimunitními chorobami 4–5 milionů pacientů (Heylen et al. 2014). Nejvyšší zaznamenaná prevalence je v Evropě a Severní Americe. V Evropě je prevalence ulcerativní kolitidy nejvyšší v Norsku, kde připadá 505 pacientů na 100 000 obyvatel. Prevalence Crohnovy choroby je z evropských států nejvyšší v Německu, kde připadá 322 pacientů na 100 000 obyvatel (Siew et al. 2017). Crohnova choroba a ulcerativní kolitida se řadí do skupiny autoimunitních chronických onemocnění charakterizovaných remitujícími a relapsujícími střevními zánětlivými epizodami. Mezi symptomy patří bolest břicha, rektální krvácení, horečka, úbytek hmotnosti, průjem (Heylen et al. 2014). Obě tyto nosologické jednotky nesou mnohé společné rysy, včetně genetických a imunopatologických, v řadě aspektů se však odlišují. Ulcerativní kolitida například postihuje pouze tlusté střevo (Obr. 6). Avšak Crohnova choroba může postihnout kteroukoli část trávicího ústrojí, zpravidla tenké i tlusté střevo (Bureš et al. 2014).



Obr. 6 Rozdíl v lokalizaci Crohnovy choroby (vlevo) a ulcerativní kolitidy (vpravo) v gastrointestinálním traktu. Zdroj: www.sehat.com.

Přesná etiologie těchto střevních autoimunitních chorob není zcela jednoznačně objasněna. Možné vysvětlení nárůstu počtu případů v posledních letech poskytuje tzv. hygienická hypotéza a tzv. „Old Friends“ hypotéza (Weinstock & Elliott 2009).

2.2.1. Hygienická hypotéza

Imunitní systém člověka je ovlivňován vnitřními i vnějšími faktory. Hygienická hypotéza, která byla poprvé publikována v 80. letech minulého století (Strachan 1989), předpokládá, že vysoké hygienické standardy ve vyspělých zemích, čištění pitné vody, používání konzervantů a antimikrobních přísad v potravinách a nadměrné používání antibiotik vede k narušování přirozeného vývoje imunitního systému už od raného věku a následnému vyššímu riziku autoimunitních chorob (Weinstock & Elliott 2009, Fleming & Weinstock 2015, Wolff et al. 2012, Petanová 2007).

Gwatkin et al. (1999) uvádí, že v nejhudších zemích světa jsou onemocnění vyvolaná patogeny (bakteriální, virová onemocnění a helmitózy) hlavní příčinou úmrtí. Zatímco v socio-ekonomicky vyspělých zemích světa je úmrtnost zapříčiněna především nepřenosnými chorobami (rakovina, autoimunitní onemocnění).

2.2.2. „Old friends“ hypotéza

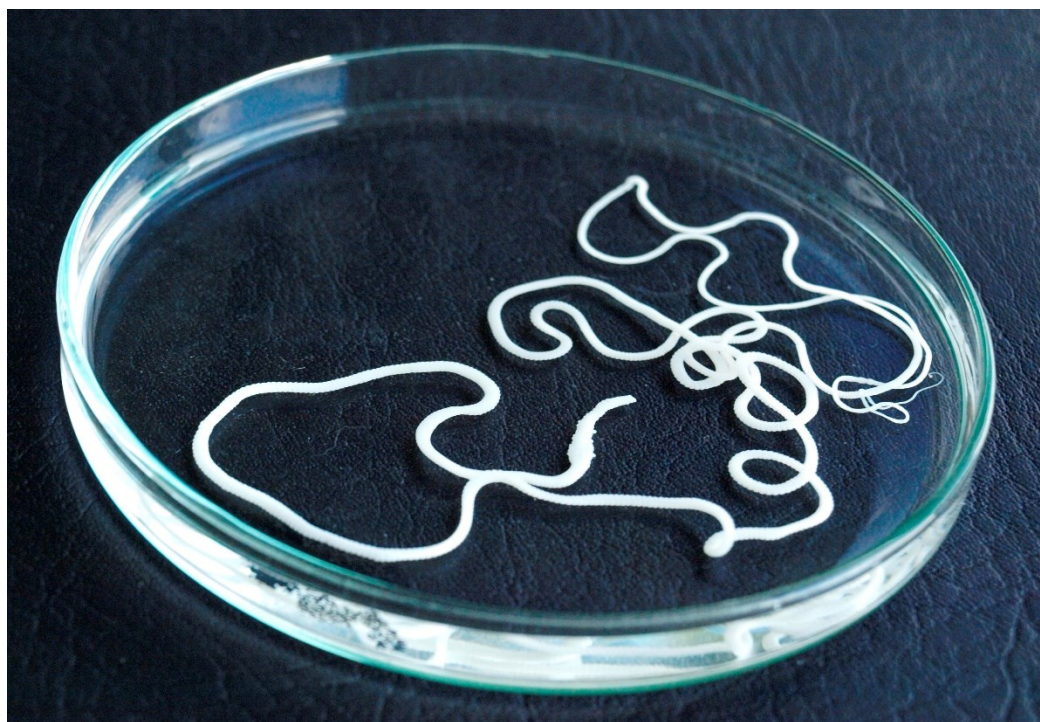
„Old friends“ hypotéza postupně rozšířila hygienickou hypotézu. Helminti žili s člověkem v průběhu evoluce přes několik tisíc let. Během této doby si tyto „staří přátelé“ („old friends“) vytvořili adaptační mechanismy vyznačující se imunomodulačními a imunosupresivními účinky na hostitelský organismus. Občasné parazitární infekce tedy vedly spíše ke zdravému rozvoji imunitního systému. Podle „old friends“ hypotézy je příčinou rozvoje střevních imunitně zprostředkovaných chorob snížená expozice parazity, na nichž jsme evolučně závislí (Gazi & Taylan 2017, Rook 2010).

2.2.3. Požadavky při výběru helminta

Jak popisuje Lukeš et al. (2014), je třeba respektovat určitá kritéria při výběru vhodného parazita pro helmintoterapii. Mezi tyto požadavky patří:

- a) životní cyklus s minimální somatickou migrací
- b) žádná nebo nízká patogenita pro člověka s mírnými klinickými příznaky, které trvají krátkou dobu
- c) lokalizace dospělce v gastrointestinálním traktu
- d) minimální šíření infekčních stadií z experimentálně infikovaných pacientů do prostředí (vhodní parazité s nízkou plodností nebo nepřímým životním cyklem)

- e) dostupnost čistých nebo sterilních infekčních stadií z živých kultur nebo gnotobiotických zvířat
- f) dostatečné znalosti ontogeneze, biologie, epidemiologie a patogenity daného parazita s možností jeho případné eradikace pomocí anthelmintik



Obr. 7 Dospělý jedinec *H. diminuta*. Foto: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Dle těchto kritérií se *Hymenolepis diminuta* (Obr. 7) jeví jako vhodný kandidát. Neprojevuje se somatickou migrací přes stěvní stěnu hostitele, dospělý jedinec se v definitivním hostiteli nachází pouze ve střevě. Má nepřímý životní cyklus, k němuž potřebuje mezihostitele. Pro člověka nepředstavuje vysoké patogení riziko, případně existuje možnost efektivní léčby anthelmintiky. Vývojová stádia lze získat z gnotobiotických zvířat. Nespornou výhodou je i snadný chov mezihostitelů a hostitelů. A v neposlední řadě jsou dostupné dostatečné poznatky a znalosti z hlediska morfologie, fyziologie i ontogeneze *Hymenolepis diminuta*.

2.2.4. Helmintoterapie v současnosti

V rámci helmintoterapie jsou v druhé fázi klinického testování parazité tenkohlavec prasečí (*Trichuris suis*) a měchovec americký (*Necator americanus*). Tenkohlavec prasečí v rámci dvojité zaslepené randomizované studie jevil oproti placebo pozitivní výsledky u ulcerativní kolitidy (Helmbly 2015). Dle Croese (2006) bylo v rámci klinické studie měchovce amerického (*Necator americanus*) zaznamenáno zlepšení u 7 pacientů z 9 trpících Crohnovou nemocí. *Trichuris suis* a *Necator americanus* jsou v současné době testovány i u pacientů s celiakií i astmatem (Helmbly 2015).

Vzhledem k dalšímu hledání potenciálních parazitů vhodných pro helmintoterapii se jako vhodný kandidát jeví *Hymenolepis diminuta*, která je v současné době ve stádiu testování na zvířatech. Je tedy nutné získat znalosti o tom, jak je *Hymenolepis diminuta* schopna ovlivnit svého hostitele pro případné další testování u konkrétních nozologických jednotek.

2.3. Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy jsou základní skupinou enzymů podílejících se na metabolismu endogenních látek a xenobiotik. Biotransformace zahrnuje změnu chemické struktury a fyzikálních vlastností. Tato skupina enzymů bývá rozdělena na enzymy 1. fáze metabolismu a na enzymy 2. fáze metabolismu. Biotransformační enzymy jsou zodpovědné zpravidla za detoxikaci látek a následné udržení rovnováhy v organismu. Hladina enzymů může být ovlivněna např. genetickými faktory, onemocněním, věkem nebo pohlavím (Martínková et al. 2007). V rámci této diplomové práce byly studovány některé vybrané biotransformační enzymy.

2.3.1. Enzymy 1. fáze biotransformace

Jedná se především o enzymy oxidační, redukční a hydrolytické. Během první fáze metabolismu dochází zpravidla ke zvýšení polaritý látek. Biologická aktivita bývá obvykle snížena, avšak v případě proléčiv může být i zvýšena (Dostálek et al. 2006).

Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny a v lidském těle se vyskytují především v játrech, avšak významné jsou také jejich hladiny v plicích, tenkém střevě, ledvinách,

kůži, mozku, nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií (Stiborová et al. 1999). Cytochromy P450 se vyznačují především monooxygenasovou aktivitou, kdy dochází k zabudování jednoho atomu vzdušného kyslíku do molekuly substrátu. V případě, že zdrojem oxidační reakce je molekula organického hydroperoxidu, vykazuje CYP peroxidasovou aktivitu (Skálová et al. 2011). Cytochromy P450 jsou výjimečné množstvím metabolizovaných substrátů. Rovněž bylo zjištěno velké množství rodin, podrodin a isoform CYP. Některé z nich byly studovány v rámci této diplomové práce.

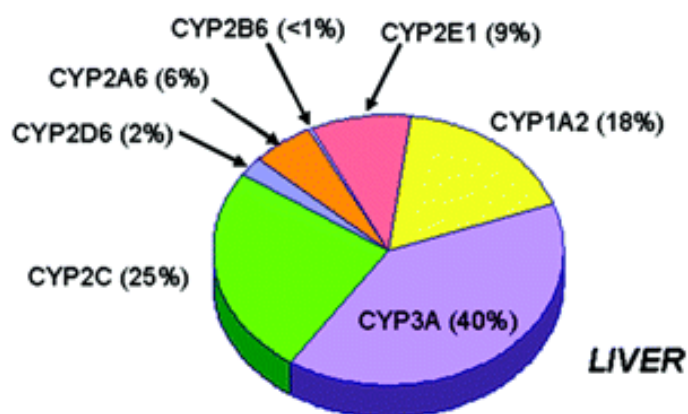
Jednou z podrodin cytochromů je podrodina CYP1A, do níž patří isoforma CYP1A1 a CYP1A2. Obě tyto isoformy si jsou do značné míry podobné, neboť vykazují 70% homologii v aminokyselinové sekvenci. Liší se však lokalizací. Zatímco CYP1A2 se nachází pouze v játrech, CYP1A1 je lokalizován extrahepatálně a to především v gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách (Stiborová et al. 1999). Mezi xenobiotické substráty obou enzymů patří například kofein, theofylin, tricyklická antidepresiva jako amitriptylin či imipramin nebo dále anthelmintikum albendazol. CYP1A2 a CYP1A1 se podílí také na aktivaci prekarcinogenů, mezi něž patří polycyklické aromatické aminy a polychlorované bifenyly (Skálová et al. 2011). Pro podrodinu CYP1A je rovněž typická mezidruhová stabilita. Martignoni et al. (2006) uvádí, že byla u potkana zaznamenána 80 % identita s lidským CYP1A2 a 83 % s lidským CYP1A1.

Zastoupení podrodiny CYP2B je v lidském organismu značně nižší, ale i přesto se isoforma CYP2B6 podílí na metabolismu některých xenobiotik jako je aflatoxin, nikotin či cyklofosfamid (Stiborová et al. 1999).

Podrodina CYP2C je nejvíce zastoupena isoformou CYP2C9, která se zásadně podílí na metabolismu warfarinu, mezi další xenobiotické substráty patří například sartany či nesteroidní antiflogistika. Steroidní látky (př. dexametason) byly popsány jako induktory CYP2C9 a CYP2B6 (Skálová et al. 2011, Stiborová et al. 1999).

Nejvýznamnější enzym podrodiny CYP3A je CYP3A4 (Obr. 8). Tento enzym se vyskytuje nejvíce v lidských játrech a střevech, méně pak v ledvinách či placentě. CYP3A4 se zásadně podílí na metabolismu léčiv. Je prokázáno, že přes 50 % léčiv a asi 30 % všech xenobiotik je biotransformováno touto isoformou. Mezi substráty lze

jmenovat například anthelmintika benzimidazoly, antibiotikum erythromycin, také beta-blokátory nebo benzodiazepiny. Dále i léčiva jako je mesalazin nebo glukokortikoidy, která jsou indikována u střevních zánětlivých chorob jako je ulcerativní kolitida a Crohnova choroba. Indukce či inhibice této isoformy tak hraje zásadní roli z hlediska lékových interakcí. Mezi známé induktory CYP3A4 patří barbituráty, rifampicin, dexametason, cigaretový kouř. Mezi inhibitory se řadí azolová antimykotika, makrolidová antibiotika, grepový džus (Skálová et al. 2011).



Obr. 8 Podíl jednotlivých isoform cytochromu P450 na metabolismu léčiv v játrech.

Zdroj: Paine et al. 2006.

Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) patří mezi oxidační enzymy. Jedná se o integrální membránové proteiny lokalizované v endoplazmatickém retikulu. U člověka je známo 5 isoform, jejichž substrátová specifita se částečně překrývá. Mezi substráty FMO obvykle patří látky obsahující ve své struktuře heteroatomy jako je dusík, fosfor či síra. Příkladem tak může být například léčivá látka albendazol, fenothiazin, efedrin (Hines 2007, Jakoby & Ziegler 1990).

Aldo-ketoreduktasy

Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR) zahrnuje velké množství enzymů katalyzujících redoxní reakce, především reakce redukci. AKR využívají kofaktor NADPH k redukci alkoholů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Jsou lokalizovány v cytosolu a lze

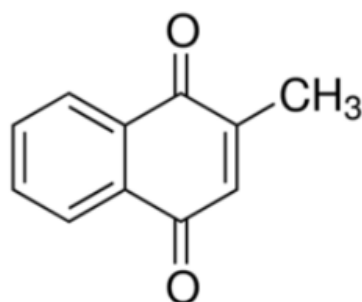
je najít ve většině živých organismů. Jako substrát slouží glukosa, steroidy, produkty peroxidace lipidů, polutanty životního prostředí (Barski et al. 2008, Penning 2015). Existuje 15 lidských AKR, které se podílejí také na diabetických komplikacích, malignitách závislých na steroidních hormonech nebo nedostatku žlučových kyselin (Wsól et al. 2015, Penning 2015).

V rámci této diplomové práce byla studována isoforma AKR1A1, která je exprimována ve většině tkání. AKR1A1 (aldehydreduktasa) vykazuje nízkou substrátovou specifitu. Tento enzym preferuje karboxylovou skupinu, ale také se podstatně podílí na metabolismu neurotransmiterů, anthracyklinů, benzo[a]pyrenů (Skálová et al. 2011). AKR1A1 katalyzuje konverzi D-glukuronátu na L-gulonát, což je nezbytný krok v biosyntéze vitamínu C u většiny zvířat (Linster & Van 2007). O důležité úloze AKR1A1 při syntéze kyseliny askorbové svědčí i fakt, že její inhibice vede k výraznému snížení obsahu vitamínu C v moči myší (Barski et al. 2008).

Dále byla studována podrodina AKR1C, do níž patří 4 lidské isoformy. Isoforma AKR1C4 se vyskytuje pouze v játrech, AKR1C2 a 1C3 je exprimována v prostatě a prsní tkáni. U potkana je nejvíce zastoupena isoforma AKR1C9 (www.uniprot.org). Obecně lze konstatovat, že podrodina AKR1C (hydroxysteroiddehydrogenasy) oproti podrodině AKR1A reaguje jak s aldehydovou, tak i ketonovou skupinou. Enzymy AKR1C hrají důležitou roli v metabolismu steroidních hormonů. Tím mohou ovlivnit i vznik některých nádorových onemocnění jako je karcinom prsu či benigní hyperplazie prostaty. Zároveň se podílejí na metabolismu některých protinádorových chemoterapeutik (Barski et al. 2008, Skálová et al. 2011).

Karbonylreduktasy

Karbonylreduktasy (CBR) patří do rodiny dehydrogenas / reduktas s krátkým řetězcem. Karbonylreduktasy jsou NADPH-dependentní cytosolové enzymy se širokou substrátovou specificitou pro mnoho endogenních látek a xenobiotik s karbonylovou skupinou (Forrest & Gonzales 2000). Tu ve své struktuře obsahují například anthelmintika (mebendazol, prazikvantel a niklosamid), antracykliny (doxorubicin, daunorubicin) nebo chinony (menadion: Obr. 9). Karbonylreduktasa 1 (CBR1) je lokalizována ve většině tkání a ve zvýšené míře je exprimována v tenkém střevě (Hara et al. 2017).



Obr. 9 Struktura menadionu. Zdroj: Hawarri et al. 2009.

2.3.2. Enzymy 2. fáze biotransformace

2. Fáze biotransformace je katalyzována konjugačními enzymy. Během 2. fáze biotransformace dochází k reakci s endogenní sloučeninou za vzniku konjugátu, který je hydrofilnější a následně rychleji eliminovaný z organismu. Konjugačními reakcemi zpravidla dochází ke snížení biologické aktivity látky. Konjugačními reakcím podléhají i endogenní látky jako jsou hormony, žlučové kyseliny (Josephy et al. 2008). Konjugační enzymy jsou různé transferasy, jedná se jak o cytosolické, tak mikrosomální enzymy. Mezi nejběžnější reakce 2. fáze metabolismu patří konjugace s kyselinou glukuronovou, sulfatace, konjugace s glutathionem, acetylace, metylace, konjugace s aminokyselinami (Skálová et al. 2011).

UDP-glukuronosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) katalyzují glukuronidaci, při které dochází ke konjugaci s kyselinou UDP-glukuronovou. Tato nadrodina enzymů je u savců kvantitativně nejdůležitější z 2. fáze biotransformačních enzymů. Přibližně 35 % léčiv je v 2. fázi metabolizováno UGT. Vzniklý glukuronid je obvykle neaktivní a snadno se vylučuje z těla pomocí močových a žlučových cest. UDP-glukuronosyltransferasy jsou také důležité při detoxikaci environmentálních chemických látek, stejně jako endogenních sloučenin jako je bilirubin, biogenní aminy, steroidní a thyroïdní hormony, mastné kyseliny a žlučové kyseliny. UGT jsou proto důležité z hlediska účinnosti, ale i toxicity léčiv a homeostasy endogenních molekul (Flockhart & Desta 2009).

Sulfotransferasy

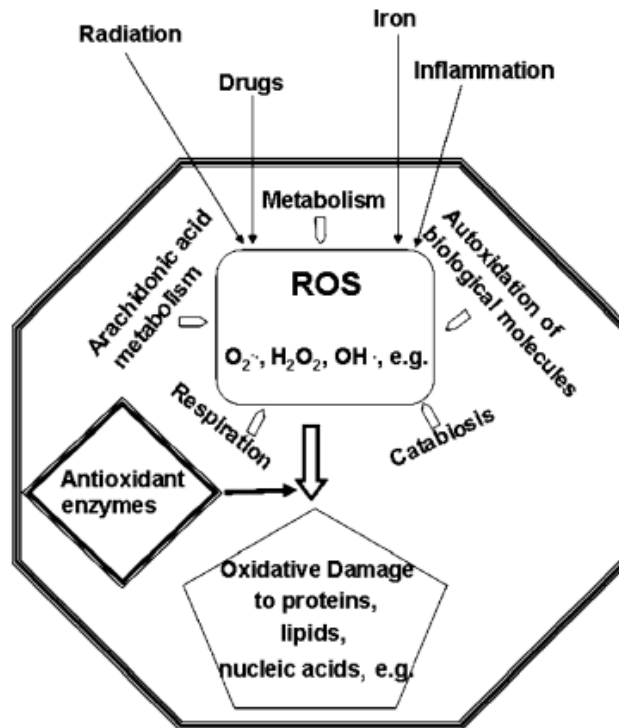
Sulfotransferasy (SULT) katalyzují konjugační reakci, při které konjugačním činidlem a donorem sulfátu je energeticky bohatý 3'-fosfoadenosyl-5'-fosfosulfát (PAPS), který vzniká z ATP a síranu. Substrátem pro sulfataci jsou především alkoholy, fenoly a aminy. Koncentrace xenobiotika může ovlivnit jeho metabolizaci. Při nižší koncentraci převládá sulfatace, při vyšší glukuronidace (Gamage et al. 2006). Z eobiotických látek je sulfatace významná u katecholaminů, steroidních a thyroïdních hormonů. Exprese sulfotransferas je indukována glukokortikoidy a agonisty glukokortikoidního receptoru (Runge-Morris & Kocarek 2005). Sulfotransferasy jsou cytosolické enzymy. U potkanů byla zjištěna pohlavní rozdílnost, kdy u samců převažovala vysoká aktivita SULT1 oproti samicím, u nichž byla výrazně vyšší SULT2 (Skálová et al. 2011).

Glutathion-S-transferasy

Glutathion-S-transferasy (GST) katalyzují konjugaci redukovaného glutathionu (GSH) s xenobiotickými či eobiotickými substráty. Mezi xenobiotika metabolizována GST patří nitrosloučeniny, paracetamol, cisplatina aj. Z endogenních látek pak organické hydroperoxydy, leukotrieny a produkty oxidativního stresu (Hollman et al. 2016, Skálová et al. 2011). GST se mohou vyskytovat v cytosolu, mitochondriích i mikrosomech, avšak nejvyšší zastoupení je v cytosolu (Sheehan et al. 2001).

2.4. Antioxidační enzymy

Během fylogenetického vývoje vytvářely biologické systémy ochranné antioxidační mechanismy, které mohou inaktivovat volné radikály. Antioxidační enzymy mohou zachytit reaktivní volné radikály, mezi které patří reaktivní kyslíkové formy (ROS) vznikající při metabolických pochodech (Obr. 10). ROS poté mohou vést k poškození různých buněčných komponent, proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Antioxidační enzymy se řadí mezi metaloproteiny. Organismus k jejich syntéze potřebuje dostatečné množství stopových prvků: zinku, manganu, mědi, selenu, železa (Zima 2003, Chiumiento & Bruschi 2009). Níže uvedené enzymy byly předmětem studia v rámci této diplomové práce.



Obr. 10 Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) během buněčného metabolismu.

Zdroj: Chiumiento & Bruschi 2009.

Peroxidasy

Nadrodina peroxidas patří k nejvýznamnějším intracelulárním antioxidantům. Primární funkce peroxidas je odstranění peroxidu vodíku či dalších toxických hydroperoxidů. Peroxidasy jsou zároveň schopny oxidovat i některá xenobiotika. Peroxidasy jsou v živočišné i rostlinné říši více druhů. Některé z nich jsou nespecifické a oxidují více různých substrátů, jiné potřebují jen určitý specifický substrát (Skálová et al. 2011, Racek & Holeček 1999).

U živočichů je nejvýznamnějším enzymem **glutathionperoxidasa** (GPx), která katalyzuje štěpení peroxidu vodíku a současnou oxidaci cystein obsahujícího glutathionu (Racek & Holeček 1999).

Glutathionreduktasa

Aby enzymatický systém glutathion peroxidasy mohl plynule zajišťovat degradaci peroxidu vodíku, je třeba regenerovat glutathion v redukované formě. K tomu slouží enzym glutathionreduktasa (GR), který využívá k redukci glutathionu pyridinový koenzym NADPH.

Dědičný defekt tvorby GR nebo GPx vede k poškození buněčných membrán, které nejsou chráněny před lipoperoxidací, což může mít za následek například mírnou až středně těžkou hemolytickou anémii (Racek & Holeček 1999).

Thioredoxinreduktasa

Thioredoxinreduktasa (TrxR) patří do rodiny enzymů katalyzující NADPH-dependentní redukci redoxního proteinu thioredoxinu (Trx). Tento selenoenzym je hlavním reduktantem disulfidů v buňkách. Redukuje i askorbylový radikál zpět na vitamin C, dále redukuje i lipidové hydroperoxydy, kyselinu lipoovou, seleničitany aj. Široká substrátová specifita tohoto enzymu je způsobena druhým redox-aktivním místem (Mustacich & Powis 2000). Thioredoxinreduktasa se uplatňuje při syntéze DNA, fertilizaci, ochraně kůže před UV paprsky a při remodelaci kostí. Má ochranný účinek vůči oxidačnímu stresu v centrálním nervovém systému, chrání i před vznikem nádorového bujení (Holeček et al. 2004).

Katalasa

Katalasa je enzym složený ze čtyř podjednotek, z nichž každá obsahuje prostetickou protoporfyrinovou skupinu s Fe^{3+} (Zima 2003). Katalasa se vyskytuje u všech organismů s aerobním metabolismem. Její význam pro organismus spočívá v ochraně buněk před toxickým vlivem vysoké koncentrace peroxidu vodíku. Katalasa je lokalizována v peroxisomech, kde katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Hraje tak důležitou roli při získávání tolerance k oxidačnímu stresu a adaptivní buněčné odpovědi (Zámocký 1998, Racek & Holeček 1999). Při nízkých koncentracích peroxidu vodíku a za přítomnosti malých molekulárních donorů elektronů (alkoholů, fenolů, dusitanů) může katalasa vykazovat peroxidasovou aktivitu (Djordjevic 2004).

Zvýšení aktivity katalasy bylo zjištěno u pacientů s hepatitidou a jaterními poruchami, hemolytickými onemocněními, akutní pankreatitidou nebo dále svalovými dystrofiemi. Snížená aktivita se však objevila u pacientů s anémií, maligními nemocemi a Downovým syndromem (Djordjevic 2004).

Mezi enzymy s antioxidační aktivitou bývá řazena i **glutathion-S-transferasa**. Tento konjugační enzym (viz kapitola 2.3.2.) se podílí na metabolismu xenobiotik, ale i organických epoxidů a hydroperoxidů.

3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit, jak přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) ovlivní aktivitu vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevech potkana (*Rattus norvegicus var. alba*). K dosažení hlavního cíle bylo provedeno:

- Nakažení mezihostitelů (brouci *Tenebrio molitor*) vajíčky tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) a získání larválních stádií tasemnice
- Infikace potkanů (konečných hostitelů) larválními stádii tasemnice krysí
- Izolace střevní mukózy z potkanů infikovaných tasemnicí krysí (*Hymenolepis diminuta*) a potkanů kontrolních
- Příprava subcelulárních frakcí ze střevní mukózy
- Stanovení aktivit vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevě kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů s využitím spektrofotometrie a spektrofluorimetrie
- Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

Při stanovení byly v experimentech kromě běžných chemikálií čistoty p. a. (Penta, ČR; Lachema, ČR) použity následující reagenty:

Acenaftenol, Aldrich (Praha, Česká republika)

Acetonitril (ACN), Merck (Praha, Česká republika)

Anilin, Sigma (Praha, Česká republika)

Benzyloxyresorufin, Sigma (Praha, Česká republika)

Bicinchoninová kyselina (BCA), Sigma (Praha, Česká republika)

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), Sigma (Praha, Česká republika)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), Sigma (Praha, Česká republika)

Ethoxyresorufin, Sigma (Praha, Česká republika)

3'-Fosfoadenosin-5'-fosfát (PAP), Sigma (Praha, Česká republika)

Glukosa-6-fosfát, Sigma (Praha, Česká republika)

Glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, Sigma (Praha, Česká republika)

Glutathion (GSH), Fluka (Praha, Česká republika)

Glutathion oxidovaný (GSSG), Koch Light Laboratories

Glutathionreduktasa (GR), Fluka (Praha, Česká republika)

Glyceraldehyd, BHD (Německo)

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma (Praha, Česká republika)

Chlorid hořečnatý, Sigma (Praha, Česká republika)

1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), Fluka (Praha, Česká republika)

Menadion, Sigma (Praha, Česká republika)

Methoxyresorufin, Sigma (Praha, Česká republika)

7-Methoxy-4-trifluoromethylkumarin (MFC), Sigma (Praha, Česká republika)

Metyrapon, Fluka (Praha, Česká republika)

Molybdenan amonný, Lachema (Praha, Česká republika)

NADH, Merck (Praha, Česká republika)

NADP⁺, Serva (Německo)

NADPH, Serva, Merck; (Německo, Česká republika)

2-Naftol, Sigma (Praha, Česká republika)
Pentoxysesorufin, Sigma (Praha, Česká republika)
p-Nitrofenol, Fluka (Praha, Česká republika)
p-Nitrofenylsulfát, Sigma (Praha, Česká republika)
Pyridinkarboxaldehyd, Aldrich (Praha, Česká republika)
Pyrokatechol, Lachema (Praha, Česká republika)
Resorufin, Sigma (Praha, Česká republika)
Slovasol, Sigma (Praha, Česká republika)
t-Butyl-hydroperoxid 70 %, Sigma (Praha, Česká republika)
Thiobenzamid, Fluka (Praha, Česká republika)
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan, Lach-Ner
UDP-glukuronová kyselina (UDP-GA), Sigma (Praha, Česká republika)

4.2. Přístroje

Analytické váhy Scaltec SBS 22
Centrifuga Eppendorf 5415 D
Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos instruments
Digitální pH-metr Boeco BT-675
Homogenizátor Potter-Elvehjem
Magnetická míchačka Variomag Electronicruhrer Mono
Mrazicí box Jouan VXE Series
Spektrofotometr a spektrofluorimetr Tecan Infinite M 200
Thermoblok Thermomixer Comfort Eppendorf
IKA Vortex Genius 3
Ultracentrifuga Beckman Coulter TM Avanti J-301
Ultrazvuková lázeň VWR Ultrasonic Cleaner
Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070
Ostatní laboratorní pomůcky

4.3. Výpočetní programy

Počítačový program i-Control: použit pro vyhodnocení absorbance.

Počítačový program Microsoft Excel 2016: použit pro výpočty enzymatických aktivit a statistické vyhodnocení.

Statistická významnost byla testována pomocí Studentova t-testu. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$ a statisticky velmi významné při $p < 0,01$.

4. 4. Zásobní roztoky

Na-fosfátový pufr 0,1 M, pH 6,5; pH 7,0; pH 7,4

1000 ml 0,1 M Na_2HPO_4

250 ml 0,1 M NaH_2PO_4

Jednotlivé složky byly připraveny do odměrných baněk a za stálého míchání a kontroly pH slévány na požadovanou hodnotu pH.

Na-K-fosfátový pufr, 60 mM, pH 7,4

500 ml 60 mM Na_2HPO_4

500 ml 60 mM KH_2PO_4

Jednotlivé složky byly připraveny do odměrných baněk a za stálého míchání a kontroly pH slévány na požadovanou hodnotu pH.

K-fosfátový pufr 0, 1 M, pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0

500 ml 0,1 M K_2HPO_4

200 ml 0,1 M KH_2PO_4

Jednotlivé složky byly připraveny do odměrných baněk a za stálého míchání a kontroly pH slévány na požadovanou hodnotu pH.

Tris-HCl pufr 0,1 M, pH 7,4

1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu bylo rozpuštěno v 75 ml redestilované vody. Poté bylo pomocí 1 M HCl upraveno pH na 7,4. Následně byl doplněn objem na 100 ml.

4.5. Získání biologického materiálu

Pro experimentální část studie bylo nejprve nutné infikovat mezihostitele vajíčky tasemnice krysí. Jako mezihostitel byl zvolen brouk potemník moučný (*Tenebrio molitor*).

Deset potemníků moučných bylo chováno ve skleněných nádobách s přístupem vzduchu a bylo jim podáváno krmivo pro potkany. Den před plánovanou infekcí vajíčky tasemnice byli brouci podrobeni 24 hodinovému lačnění. Vyhládlým potemníkům byl poté do skleněné nádoby podán trus nakaženého potkana, který obsahoval vajíčka tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Přítomnost vajíček v trusu pro infekci byla předem mikroskopicky prokázána. Tento trus byl potemníkům ponechán v nádobě po dobu 3 dnů. Během této doby byl trus průběžně vodou vlhčen. A to z důvodu snadnějšího pozření a tím i vyšší pravděpodobnosti infekce brouků. Po 12 dnech, kdy bylo možné předpokládat vyvinutí cysticerkoidů (larválních stádií) tasemnice, byli brouci dekapitováni. Poté byly pinzetou odebrány krovky a křídla a brouci byli podrobeni pitvě. Obsah brouků byl na hodinovém sklíčku pomocí preparační jehly rozptýlen ve fyziologickém roztoku a sledován pod stereolupou. Zde bylo možné pozorovat cysticerkoidy. Ve čtyřech potemnicích byly nalezeny desítky až stovky cysticerkoidů, u třech potemníků byla četnost cysticerkoidů nižší a u dalších třech potemníků nebyla infekce úspěšná. Poté byl pod stereolupou prohlédnut vzhled cysticerkoidů. Ty, které vyhovovaly svým tvarem a velikostí a nebyly nikterak porušeny, byly pomocí pipety vyjmuty. Takto bylo vždy 12 cysticerkoidů pipetováno do celkem 6 mikrozku mávek s připraveným fyziologickým roztokem.

Po získání larválních stádií (cysticerkoidů) bylo možné infikovat hostitele. Jednalo se celkem o 12 samců potkana (*Rattus norvegicus*, var. *alba*, kmen Wistar) ve věku 8 až 10 týdnů. Šesti potkanům byly pomocí žaludeční sondy podány cysticerkoidy s fyziologickým roztokem (tasemnicí ovlivněná skupina), zbylým 6 potkanům pak pouze fyziologický roztok (kontrolní skupina). Při infekci byl nejprve každý potkan uspán

etherem a zvážen. Poté byl žaludeční sondou opatrně podán fyziologický roztok s cysticerkoidy z připravené mikrozkušavky. Na závěr bylo ještě sodnou pipetováno malé množství samotného fyziologického roztoku, neboť bylo důležité dbát opatrnosti, aby cysticerkoidy neulpěly na stěnách sondy. Takto bylo postupováno celkem u 6 potkanů (skupina ovlivněná tasemnicí). Kontrolní skupině dalších 6 potkanů pak byl za stejných podmínek sondou aplikován pouze fyziologický roztok (bez cysticerkoidů) a to z důvodu, aby byli podrobena stejnému stresu. Těchto celkem 12 potkanů bylo chováno 2 měsíce ve viváriu za střídavého světelného režimu (12 hodin světlo, 12 hodin tma). Potrava byla podávána rovněž oběma skupinám stejná (granule pro potkany). Průběžně byl potkanům sledován trus, v němž se postupně u všech 6 infikovaných potkanů po měsíci objevila vajíčka tasemnice.

Po uplynutí 2 měsíců od infekce byli potkani postupně uspáni etherem a poté usmrceni dekapitací. Každý potkan byl zvážen a podroben pitvě. Bylo vyoperováno tenké střevo a následně třikrát promyto fyziologickým roztokem. Tím došlo k vypláchnutí střevního obsahu a u skupiny nakažených tasemnicemi došlo k jejich uvolnění ze střeva. Takto očištěné tenké střevo bylo chirurgickými nůžkami rozstříháno na menší kousky, z kterých byla podložním sklíčkem opatrně sejmuta střevní mukóza, která byla vložena do mikrozkušavek a zamražena při - 80 °C v mrazícím boxu. U skupiny kontrolní byla střevní mukóza získána a uchována za stejných podmínek.

4.6. Příprava subcelulárních frakcí

Vzorky střevní mukózy (kontrolní i tasemnicí ovlivněné skupiny) byly vyjmuty z mrazícího boxu a pozvolna na ledu rozmrazeny. V chladící místnosti byla mukóza rozvážena (každá skupina zvlášť) po 4 g do malých plastových mističek. Navážka každé mističky byla vložena do 30 ml zkumavky homogenizátoru. K mukóze bylo v homogenizátoru přidáno ještě 6 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 a vše zhomogenizováno pohybem pístu. Zhomogenizovaný obsah byl přelit do centrifugační kyvety nachystané v nádobě s ledem. Píst a homogenizátor byly vypláchnuty 6 ml pufru a tento objem byl také přilít do centrifugační kyvety.

Dále bylo provedeno první stočení na centrifuze Heraeus, která byla předem naprogramována na 5 000 g, dobu 20 minut a teplotu 4 °C. Po prvním stočení byl vzniklý supernatant přelit do čistých kyvet. Zbývající ulpělá peleta obsahující potrhané buněčné

membrány, vazivo či jádra byla po slítí supernatantu zlikvidována. Supernatant v čistých kyvetách byl stočen opět na centrifuze Heraeus při rychlosti 20 000 g po dobu 60 minut při 4 °C.

Supernatant z druhého stočení byl následně přelit do centrifugačních kyvet určených pro centrifugu Beckman. Tyto kyvety byly naplněny do tří čtvrtin objemu a byly vyváženě umístěny do rotoru předem vychlazené ultracentrifugy Beckman a pečlivě uzavřeny víčkem. Poté bylo spuštěno třetí stočení, které probíhalo při 105 000 g, po dobu 65 minut a při teplotě 4 °C.

Po třetím stočení supernatant obsahoval cytosol. Ten byl odebrán do dvou skleněných kádinek (zvláště kontrolní a tasemnicí ovlivněná skupina). Z kádinek byl cytosol dále v chladicí místnosti za stálého míchání rozpipetován po 1 ml do předem popsáných mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Ty byly následně uloženy do mrazícího boxu s nastavenou teplotou - 80 °C.

Do kyvet z třetí centrifugace obsahující pelety s mikrosomy bylo přidáno 30 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4. Pomocí malého homogenizačního pístu pak byly pelety obsahující mikrosomy rozsuspendovány. Kyvety byly vyváženě znovu vloženy do centrifugy Beckman, kde byla opět nastavena centrifugace při 105 000 g, teplotě 4 °C a době 60 minut. Po uplynulém stočení byl supernatant vylit a k peletě z každé kyvety byly přidány 4 ml Na-fosfátového pufru (pH 7,4) s 20 % (v / v) roztoku glycerolu. Vše bylo skleněnou tyčinkou promícháno, slito do dvou skleněných kádinek (zvláště kontrolní a tasemnicí ovlivněná skupina). A obsah v kádinkách byl zhomogenizován v ultrazvukové lázni. Takto získaná mikrosomální frakce byla za stálého míchání rozpipetována po 330 µl do předem označených mikrozkušavek o objemu 500 µl a uložena do mrazícího boxu s nastavenou teplotou - 80 °C.

4.7. BCA stanovení bílkoviny

Vzhledem k tomu, že specifická enzymatická aktivita se vztahuje na miligram bílkoviny příslušné frakce, bylo nejdříve nutné změřit obsah bílkoviny ve frakcích. K tomu byla použita metoda s BCA dle Smitha et al. (1985).

Princip stanovení

Jedná se o reakci, při níž proteiny obsažené v mikrosomech a cytosolu redukují v alkalickém prostředí ionty měďnaté (Cu^{2+}) na ionty měďné (Cu^+). Měďné ionty (Cu^+) poté vytvářejí modrofialové komplexní sloučeniny se sodnou solí BCA (bicinchoninová kyselina). Intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny ve vzorku.

Metodika stanovení

Byl připraven pracovní roztok C smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1.

Složení roztoku A: NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH

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

Pro kalibrační křivku byl použit 0,1 % roztok sérového albuminu (BSA), který byl připraven z 0,05 ml výchozího 20 % roztoku sérového albuminu (BSA) doplněného do 10 ml redestilovanou vodou. Do 6 mikrozkušavek bylo podle níže uvedené tabulky 1 napipetováno příslušné množství 0,1 % BSA a redestilované vody do celkového objemu 100 μl (obsah bílkoviny tedy činil 0 až 1 000 μg).

Tab. 1 Ředění 0,1 % roztoku BSA pro přípravu kalibrační křivky.

	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Roztok 0,1 % BSA (μl)	Destilovaná voda (μl)
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Pro sestavení kalibrační přímky bylo odebráno vždy 10 μl roztoku dané koncentrace bílkoviny a napipetováno do sloupce mikrotitrační destičky s kulatým dnem.

Subcelulární frakce (mikrosomy a cytosol), které byly na ledu pozvolna rozmrazeny, byly naředěny 20x redestilovanou vodou. Poté z nich bylo odebráno 10 μl a napipetováno do

sloupce mikrotitrační destičky (celkem tedy 8 paralelních měření pro cytosol a 8 paralelních měření pro mikrosomy). Pro získání slepého pokusu bylo ještě do jedné prázdné jamky destičky napipetováno 10 µl redestilované vody.

Poté do všech jamek mikrotitrační destičky bylo multikanálovou pipetou přidáno 200 µl pracovního roztoku C. Po promíchání byla destička inkubována v Termomixeru při 37 °C. Následně byla pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M 200 změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

4.8. Stanovení aktivity enzymů 1. fáze biotransformace

4.8.1. Stanovení aktivity některých isoform cytochromu P450

Základem stanovení je přidání substrátu (poměrně specifického pro danou isoformu CYP) k mikrosomální frakci. Jednotlivé isoformy metabolizují svůj specifický substrát na fluoreskující produkt (resorufin). Přírůstek fluorescence, který závisí na aktivitě dané isoformy cytochromu P450, byl měřen na spektrofluorimetru.

Cytochromy P450 (CYP) 1A1, 1A2, 3A a 2B

Pro stanovení jednotlivých isoform byly použity substráty uvedené v tabulce 2.

Tab. 2 Přehled substrátů měřených isoform cytochromu P450.

Substrát	Isoforma CYP
Ethoxyresorufin (ER)	1A1 (částečně 1A2), EROD
Methoxyresorufin (MR)	1A2 (částečně 1A1), MROD
Benzyloxyresorufin (BR)	3A/2B, BROD
Pentoxyresorufin (PR)	2B, PROD

Zásobní roztoky

0,1 M Tris-HCl pufr pH 7,4

0,1 M MgCl₂ (kofaktor)

0,5 mM substrát v dimethylsulfoxidu (DMSO)

50 mM NADPH v Tris-HCl pufru

0,5 μ M resorufin v DMSO

Postup

V prvním kroku byly rozmrazeny mikrosomy kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny. Poté bylo do dvou sloupců mikrotitrační destičky Greiner pipetováno 5 μ l mikrosomů (vždy jedny mikrosomy do jednoho sloupce, tzn. 8 paralelních měření). Dále bylo multikanálovou pipetou přidáno 195 μ l reakční směsi obsahující 3,64 ml Tris-HCl pufru, 0,20 ml MgCl₂, 20 μ l příslušného substrátu, 40 μ l roztoku NADPH. Do třetího sloupce (standardní přídavek) pak bylo multikanálovou pipetou napipetováno 10 μ l 0,5 μ M roztoku resorufinu (odpovídá 5 pmol v jamce) a 190 μ l Tris-HCl pufru. Destička poté byla vložena do spektrofluorimetru Tecan Infinite M 200, kde byla po dobu 5 minut při 37 °C měřena spodní fluorescence. Poté byla destička inkubována dalších 25 minut při 37 °C a nakonec (celkově tedy ve 30. minutě od startu reakce) byla opět změřena fluorescence na přístroji Tecan Infinite M 200.

Výpočet:

$$A = (F_{30} - F_5) \cdot 5 \cdot 200 / (F_{res} \cdot 25) \quad [\text{pmol/min/ml}]$$

F ₃₀	Fluorescence vzorku po 30 minutách
F ₅	Fluorescence vzorku po 5 minutách
F _{res}	Fluorescence standardního přídávku resorufinu v čase t = 30 minut
5	Množství resorufinu v pmol v jamce (standard. přídavek)
200	Přepočet na 1 ml frakce (1000/5 = 200)
25	Čas v minutách

Cytochrom P450 2C9

Ke stanovení isoformy CYP2C9 byl jako substrát použit 7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin (MFC), který je relativně specifický pro CYP2C9 (Price et al.

2000) a přeměňuje se na fluoreskující produkt 7-hydroxy-4-trifluormethylkumarin (HFC).

Zásobní roztoky:

0,1 M Na-fosfátový pufr (pH 7,4)

0,1 M MgCl₂ (kofaktor)

2 mM MFC v dimethylsulfoxidu (DMSO)

25 mM NADPH v Na-fosfátovém pufru

10 μM HFC v DMSO

Postup:

Po rozmražení a promíchání mikrosomů bylo do dvou sloupců mikrotitrační destičky Greiner pipetováno 8 μl mikrosomů (vždy jedny mikrosomy do jednoho sloupce, tzn. 8 paralelních měření). Poté bylo multikanálovou pipetou přidáno celkem 192 μl reakční směsi obsahující 8,9 ml pufru, 0,5 ml MgCl₂, 200 μl MFC, 100 μl roztoku NADPH. Do třetího sloupce (standardní přídavek) pak bylo multikanálovou pipetou dáno 10 μl 10 μM roztoku HFC (odpovídá 100 pmol v jamce) a 190 μl Na-fosfátového pufru. Destička byla bezprostředně poté dána do přístroje Tecan Infinite M 200, kde byla po dobu 5 minut při 37 °C měřena spodní fluorescence. Rovněž i u stanovení této isoformy byla destička inkubována dalších 25 minut při 37 °C. Po tomto čase (celkově tedy ve 30. minutě od startu reakce) byla opětovně změřena fluorescence.

Výpočet

$$A = (F_{30} - F_5) \cdot 100 \cdot 125 / (F_{res} \cdot 25) \quad [\text{pmol/min/ml}]$$

F₃₀ Fluorescence vzorku po 30minutách

F₅ Fluorescence vzorku v 5. minutě

F_{res} Fluorescence standardního přídávku resorufinu v čase t = 30 minut

100 množství HFC v pmol v jamce (standard. přídavek)

125 přepočet na 1 ml frakce (1000 / 8 = 125)

4.8.2. Stanovení aktivity FMO

V přítomnosti flavinové monooxygenasy (FMO) dochází k reakci substrátu thiobenzamidu (TB) za vzniku produktu S-oxidu thiobenzamidu (TBSO) vykazující absorpční maximum při 370 nm. Enzymatická aktivita FMO byla vyjádřena pomocí vzrůstu absorbance. Ke stanovení byl zvolen postup dle práce Cashmana et al. (1981).

Zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr (pH 8,0)

Acetonitril (ACN)

89 mM roztok thiobenzamidu (TB)

NADPH-regenerační systém

Pracovní roztoky:

Reakční směs: připravena smísením 0,1M K-fosfátového pufru (pH 8,0) s NADPH-regeneračním systémem.

Ředěný substrát (TB)

Ředěný acetonitril (ACN)

Postup:

Nejdříve byly rozmrazeny subcelulární frakce (mikrosomy) a pečlivě promíchány. Do 2 sloupců mikrotitrační destičky Greiner s plochým dnem bylo napipetováno 20 μ l mikrosomů (1 sloupec mikrosomy kontrolní, druhý sloupec mikrosomy potkanů ovlivněných *H. d.*), poté bylo multikanálovou pipetou přidáno 180 μ l reakční směsi. Těsně před měřením bylo multikanálovou pipetou přidáno do prvních dvou jamek každého sloupce 10 μ l ředěného roztoku ACN (slepý pokus) a 10 μ l ředěného roztoku TB do ostatních šesti jamek každého sloupce. Tím byl zahájen start reakce a destička byla neprodleně vložena do přístroje Tecan Infinite M 200, kde byla změřena absorbance vždy po 2 minutách celkem po dobu deseti minut.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient NADPH ($8,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
1000	přepočet na nmol/min/ml
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,6 cm
V_i	objem reakční směsi 0,210 ml
V_s	objem biologické frakce (mikrosomů) 0,020 ml

4.8.3. Stanovení aktivity AKR1A1

Stanovení aldo-ketoreduktasy isoformy 1A1 (AKR1A1) je založeno na měření poklesu absorbance při 340 nm. Podstatou je přeměna NADPH na NADP^+ . Pomocí molárního absorpčního koeficientu NADPH lze poté kvantifikovat enzymatickou aktivitu (Ohara et al. 1995, Kawamura et al. 1999).

Zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr (pH 6,0)

0,1 M 4-pyridinkarboxaldehyd (4-PC)

2 mM NADPH

Postup:

Po rozmražení cytosolu bylo do 6 jamek prvního sloupce mikrotitrační destičky GAMA napipetováno 10 μl cytosolu kontrolní skupiny. Do druhého sloupce pak bylo rovněž do 6 jamek napipetováno 10 μl cytosolu skupiny potkanů ovlivněných *H. d.* (každý vzorek tedy 6x). Do prvních dvou jamek obou sloupců byl dán Na-fosfátový pufr o pH 7,4 (slepý pokus). V dalším kroku bylo multikanálovou pipetou přidáno 190 μl reakční směsi

obsahující: 4,684 ml K-fosfátového pufru, 52,63 μ l 4 -PC, 263,15 μ l NADPH. Destička byla vložena do čtečky Tecan Infinite M 200, kde byla již předem nastavena teplota 37 °C. Pokles absorbance byl sledován po dobu 5 minut při 340 nm.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce 0,01 ml

4.8.4. Stanovení aktivity reductas metyraponu

Při stanovení reductas (konkrétně AKR1C9 a CBR1 v cytosolu) s metyraponem dochází k přeměně NADPH na NADP^+ , což je spektrofotometricky sledováno při 340 nm jako pokles absorbance (Maser & Oppermann 1997, Matsunaga et al. 2007).

Zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr (pH 6,0)

0,1 M metyrapon

2 mM NADPH

Postup:

Nejprve byly rozmrazeny mikrozkuhavky obsahující cytosol obou skupin potkanů. Do celkem 2 sloupců mikrotitrační destičky GAMA bylo napipetováno 10 μ l subcelulární frakce (pro každý sloupec jedna frakce umístěná v pozicích C–H mikrotitrační destičky,

tj. 6x každý vzorek). U slepých vzorků (pozice A–B) bylo místo frakce dáno 10 μ l Na-K-fosfátového pufru o pH 7, 4. Následně bylo přidáno multikanálovou pipetou 190 μ l připravené reakční směsi, která obsahovala 9,369 ml K-fosfátového pufru, 105,3 μ l roztoku metyraponu, 526,3 μ l roztoku NADPH. Destička byla urychleně poté umístěna do přístroje Tecan Infinite M 200. Pokles absorbance byl sledován po dobu 5 minut při vlnové délce 340 nm.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce 0,01 ml

4.8.5. Stanovení aktivity AKR1C9

Základem stanovení redukčního enzymu aldo-ketoreduktasy 1C9 je měření vzrůstu absorbance způsobeném přeměnou NADP^+ na NADPH. Kvantitativně lze pomocí vzrůstu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH vyjádřit aktivitu tohoto enzymu. Vzrůst absorbance je sledován při 340 nm (Ohara et al. 1995, Kawamura et al. 1999).

Zásobní roztoky:

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

0,1 M Acenaftenol

20 mM NADP^+

Postup:

Subcelulární frakce (cytosol kontrolní skupiny a skupiny ovlivněné *H. d.*) byly pozvolna na ledu rozmrazeny. Do dvou sloupců mikrotitrační destičky GAMA postavené na ledovém bloku bylo napipetováno 10 μl cytosolu (vzorky 6x), v případě slepého vzorku (2x) 10 μl Na-K-fosfátového pufru o pH 7,4. Poté bylo multikanálovou pipetou přidáno 190 μl reakční směsi, která se skládala z: 7,12 ml 0,1 M TRIS/HCl pufru, 80 μl roztoku acenaftenolu, 400 μl roztoku NADP⁺. Destička byla co nejrychleji vložena do již předem na 37 °C vytemperovaného přístroje Tecan Infinite M 200, kde byl po dobu 5 minut sledován nárůst absorbance.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce

4.8.6. Stanovení aktivity CBR1

Základem stanovení je redukce substrátu menadionu v přítomnosti karbonylreduktasy 1 (CBR1). Tato reakce je doprovázena současnou oxidací kofaktoru NADPH, což je možné fotometricky zaznamenat při vlnové délce 340 nm jako pokles absorbance (Maté et al. 2008).

Zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr (pH 7,4)

50 mM roztok menadionu v ethanolu

5 mM roztok NADPH

Postup:

Cytosol kontrolní skupiny i skupiny potkanů ovlivněných *H. d.* byl rozmražen. Mezitím byla připravena reakční směs obsahující: 7,495 ml K-fosfátového pufru, 84,21 µl roztoku menadionu a 421 µl roztoku NADPH. Poté bylo do 2 sloupců mikrotitrační destičky GAMA napipetováno 10 µl příslušného cytosolu, v případě slepého pokusu (vždy první dvě jamky) bylo místo frakce přidáno 10 µl Na-fosfátového pufru o pH 7,4. V dalším kroku pak bylo pomocí multikanálové pipety přidáno do všech jamek 190 µl reakční směsi. Destička byla lehce protřepána a vložena do předem vytemperovaného (na 37 °C) přístroje Tecan Infinite M 200, v němž byl sledován pokles absorbance po dobu 5 minut při 340 nm.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce 0,010 ml

4. 9. Stanovení aktivity enzymů 2. fáze metabolismu

4.9.1. Stanovení aktivity UGT

Při stanovení aktivity UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) dochází k tvorbě konjugovaného p-nitrofenolu s UDP-glukuronovou kyselinou (UDP-GA). Nezareagovaný p-nitrofenol je v neutrálním prostředí žlutě zbarvený a vykazuje maximum absorpce při vlnové délce 405 nm (Letelier et al. 2005).

Zásobní roztoky:

TRIS/HCl pufr (pH 7,4)

Substrát: 2,5 mM p-nitrofenol

Konjugační činidlo: 10 mM UDP-GA

Detergent: 5 % roztok slovasolu

Deproteinizační roztok: 3 % trichloroctová kyselina (TCA)

Neutralizační roztok: 1 M NaOH

Postup:

Nejdříve byly rozmrazeny mikrosomy (kontrolní skupiny i skupiny ovlivněné *H. d.*). Poté bylo do mikrozkušavek napipetováno 20 μ l detergentu a k tomu přidáno 40 μ l příslušných mikrosomů (poměr detergent : protein 1 : 2). Zkušavky byly promíchány a inkubovány při 4 °C přesně 20 minut. Poté bylo do dalších mikrozkušavek na ledu pipetováno: 100 μ l pufru, 40 μ l UDP-GA (vzorky) nebo 40 μ l redestilované vody (slepý pokus), 20 μ l p-nitrofenolu a 20 μ l mikrosomů s detergentem. Vše bylo pečlivě promícháno a tato inkubační směs byla vložena do termobloku na 20 minut (37 °C, mírné třepání). Tyto mikrozkušavky byly následně vloženy do boxu s ledem, kde do nich bylo přidáno ještě 50 μ l TCA, vše bylo promícháno a poté stočeno na stolní centrifuzě (5 000 ot/min, 5 minut). Mezitím bylo do mikrotitrační destičky do 4 sloupců pipetováno 50 μ l NaOH, avšak do první jamky (pozice A1) pouze redestilovaná voda. V dalším kroku bylo do jamek s NaOH přeneseno 50 μ l inkubační směsi z lednice (vždy z jedné mikrozkušavky do 1 sloupce destičky). Poté byla mikrotitrační destička vložena do čtečky Tecan Infinite M 200, kde byla změřena absorpce při 405 nm.

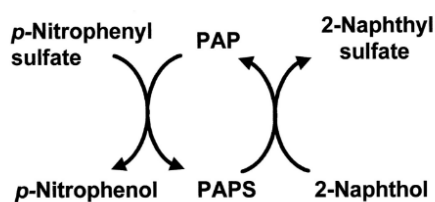
Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ_{p-NF}	molární absorpční koeficient $18,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,5 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
$zř$	zředění, tj. 3,3
t	doba inkubace, tj. 20 min
V_i	objem reakční směsi 0,1 ml
V_s	objem biologické frakce 0,01 ml

4.9.2. Stanovení aktivity SULT

Principem stanovení je přeměna *p*-nitrofenylsulfátu na *p*-nitrofenol katalyzována sulfotransferasou (SULT). Zároveň dochází k přenosu sulfoskupiny z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) na 2-naftol (Obr. 11). Ke spektrofotometrickému měření je využito vznikajícího produktu *p*-nitrofenolu, který v neutrálním prostředí vykazuje absorbanci při 405 nm (Frame et al. 2000, Yang et al. 1996).



Obr. 11 Přeměna *p*-nitrofenylsulfátu na *p*-nitrofenol. Zdroj: Frame et al. 2000.

Zásobní roztoky:

50 mM K-fosfátový pufr (pH 6,5)

50 mM MgCl₂

20 μM 3'-fosfoadenosin-5'-fosfát (PAP)

50 mM p-nitrofenylsulfát (pNFS)

10 mM 2-naftol

0,25 M TRIS-HCl pufr (pH 8,7)

Postup:

Cytosol (kontrolní skupiny i skupiny ovlivněné *H. d.*) byl pozvolna rozmražen. Mezitím bylo do prvního sloupce mikrotitrační destičky GAMA uložené na ledovém bloku napipetováno 10 μl pufru (slepý vzorek). Do druhého a třetího sloupce bylo pipetováno 10 μl cytosolu dané skupiny. Poté bylo multikanálovou pipetou do všech 3 sloupců přidáno 90 μl reakční směsi. Ta obsahovala 0,5 ml roztoku MgCl₂, 0,5 ml roztoku PAP, 0,5 ml pNFS, 50 μl roztoku 2-naftolu a 2,95 ml K-fosfátového pufru. Destička byla jemně protřepána a inkubována 10 minut při 37 °C. Probíhající reakce byla po přesně uplynulém čase zastavena přidáním 100 μl 0,25 M Tris-HCl pufru (pH 8,7) a bezprostředně poté bylo provedeno měření absorbance při 405 nm v přístroji Tecan Infinite M 200.

Výpočet:

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

ΔA_{vz} změna absorbance vzorku za 1 minutu

ΔA_{sl} změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ϵ molární absorpční koeficient 18,20 mM⁻¹ · cm⁻¹

l délka vrstvy (výška jamky) 0,55 cm

t doba inkubace 10 minut

V_i objem reakční směsi 0,20 ml
 V_s objem biologické frakce 0,010 ml

4.9.3. Stanovení aktivity GST

V přítomnosti glutathion-*S*-transferasy (GST) dochází k reakci substrátu CDNB (1-chlor-2,4-dinitrobenzen) s konjugačním činidlem GSH (redukováný glutathion) a vzniku S-2,4-dinitrofenylglutathionu vykazující absorpční maximum při 340 nm. Ke stanovení byl použit postup dle práce Yea & Zhanga (2001).

Pracovní roztoky:

0,1 M Na-fosfátový pufr (pH 6,5)

51,5 mM roztok CDNB v ethanolu

5,15 mM roztok GSH v 0,1M Na-fosfátovém pufru

Reakční směs: roztok GSH, roztok CDNB smíšený s 0,1M Na-fosfátovým pufr

Postup:

Vzorky cytosolu (kontrolní skupiny i skupiny ovlivněné *H. d.*) byly rozmrazeny a naředěny 10x 0,1 M Na-fosfátovým pufr o pH 7,4. Do 6 jamek 2 sloupců mikrotitrační destičky Greiner s plochým dnem bylo napipetováno 6 μ l ředěného cytosolu kontrolní skupiny (pozice C–H na mikrotitrační destičce). Do zbylých 2 jamek v obou sloupcích byl napipetován Na-fosfátový pufr o pH 7,4 (slepý vzorek). Dle stejného schématu pak byla do dalších dvou sloupců napipetována ředěná frakce cytosolu *H. d.* ovlivněných potkanů a rovněž tak i slepý vzorek. Následně bylo napipetováno 194 μ l reakční směsi. Po lehkém protřepání byla destička vložena do předem vytemperovaného (na 37 °C) spektrofotometru Tecan Infinite M 200, kterým byla měřena absorbance 6x v minutových intervalech při 340 nm.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
V_i	objem reakční směsi (0,2 ml)
1000	přepočet na nmol/min/ml
ϵ	molární absorpční koeficient ($9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
l	výška jamky (0,6 cm)
V_s	objem biologické frakce (0,006 ml)

4.10. Stanovení aktivity antioxidačních enzymů

4.10.1. Stanovení aktivity peroxidas

Peroxidasy katalyzují reakci, při níž je rozkládán peroxid vodíku a zároveň dochází k přeměně dvojice anilin-pyrokatechol na růžově zbarvený produkt [4(fenylamino)benzen-1,2-diol], jehož přírůstek je zaznamenáván spektrofotometricky při 510 nm. Ke stanovení byl použit postup, který uvádí Molaei et al. (2007).

Zásobní roztoky:

0,2 M Na-fosfátový pufr (pH 7,0)

1,7 mM roztok H_2O_2

Substrát: pyrokatechol, anilin smíšený s 0,2 M Na-fosfátovým pufrem

Postup:

Do 2 sloupců mikrotitrační destičky bylo nejdříve napipetováno multikanálovou pipetou 90 μl substrátu a 100 μl H_2O_2 a následně byla destička preinkubována 4 minuty při 25 °C. Poté bylo do prvních dvou jamek obou sloupců napipetováno 10 μl Na-K-fosfátového pufru o pH 7,4 (slepý vzorek). Do ostatních jamek (pozice C–H, vždy tedy 6 paralelních měření) bylo dále napipetováno 10 μl příslušné biologické frakce, čímž byl započat start

reakce. Destička byla neprodleně vložena do přístroje Tecan Infinite M 200, kde byl v 7 cyklech sledován přírůstek produktu.

Poznámka: Vzhledem k tomu že reakce se spouští přidáním subcelulární frakce, byl měřen cytosol i mikrosomy zvlášť, aby nebylo pipetováno velké množství vzorků najednou.

Výpočet:

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

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
V_i	objem reakční směsi (0,2 ml)
1000	přepočet na nmol/min/ml
zř	zředění
ϵ	molární absorpční koeficient ($5,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
l	výška jamky (0,75 cm)
V_s	objem biologické frakce (0,01 ml)

4.10.2. Stanovení aktivity glutathionperoxidasy

Glutathionperoxidasa (GPx) katalyzuje reakci, při níž je glutathion přeměňován na oxidovaný glutathion, který je průběžně redukován glutathionreduktasou (GR). Ta tak zajišťuje konstantní hladinu glutathionu (GSH). Reakci doprovází oxidace NADPH, což je monitorováno fotometricky poklesem absorbance při 340 nm. Stanovení proběhlo dle Flohého & Günzlera (2009).

Zásobní roztoky:

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

20 mM roztok EDTA

glutathionreduktasa (10 U/ml)

10 mM roztok glutathionu

4 mM roztok NADPH

Postup:

Nejdříve byly rozmrazeny subcelulární frakce (mikrosomy i cytosol). Mezitím byla připravena reakční směs, jež obsahovala: 4,154 ml pufru, 0,462 ml roztoku EDTA, 0,462 ml roztoku glutathion reductasy, 0,923 ml roztoku glutathionu. Do 4 sloupců mikrotitrační destičky GAMA bylo napipetováno 50 μ l příslušné frakce, v případě slepého vzorku byl napipetován Na-fosfátový pufr (pH 7,4), poté bylo multikanálovou pipetou přidáno 130 μ l reakční směsi. Dále byla destička preinkubována 10 minut při 37 °C. Následně bylo multikanálovou pipetou přidáno 10 μ l NADPH. Po 5 minutách bylo multikanálovou pipetou přidáno 10 μ l t-butyl hydroperoxidu, čímž byla nastartována reakce. Byl sledován pokles absorbance po dobu 5 minut při 340 nm.

Výpočet:

$$\text{Aktivita} = \frac{(\Delta A_{vz} - \Delta A_{sl}) \cdot V_i \cdot 1000 \cdot 2}{\epsilon \cdot l \cdot V_s} \quad [\text{nmol/min/ml}]$$

ΔA_{vz}	změna absorbance vzorku za 1 minutu
ΔA_{sl}	změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu
ϵ	molární absorpční koeficient $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce 0,050 ml
2	2 μ mol GSH produkuje 1 μ mol NADPH (ze stechiometrie reakce)

4.10.3. Stanovení aktivity glutathionreduktasy

Principem metody je přeměna oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion. Tato reakce je katalyzována glutathionreduktasou a současně dochází

k oxidaci NADPH (Carlberg & Mannervick 1985). Spotřeba NADPH byla zaznamenána pomocí úbytku absorbance při 340 nm.

Zásobní roztoky:

0,1M K-fosfátový pufr (pH = 7,00)

5 mM roztok EDTA

2,5 mM roztok NADPH

4 mM roztok GSSG

Postup:

Přístroj Tecan Infinite M 200 byl nejdříve vytemperován na teplotu 37 °C. Poté byl rozmražen cytosol (kontrolní skupiny i skupiny ovlivněné *H. d.*) a zředěn 5x. Mezitím byla připravena reakční směs skládající se z: 2 ml K-fosfátového pufru, 1,6 ml roztoku EDTA, 2 ml roztoku GSSG a 0,4 ml roztoku NADPH. Následně bylo do 6 jamek prvního sloupce destičky pipetováno 50 µl cytosolu kontrolní skupiny, do 6 jamek druhého sloupce bylo pipetováno 50 µl cytosolu potkanů ovlivněných tasemnicí. Do prvních dvou jamek každého sloupce byl pipetován Na-fosfátový pufr o pH 7,4 (slepý vzorek). Poté bylo multikanálovou pipetou do všech jamek přidáno 150 µl reakční směsi a destička byla urychleně vložena do přístroje Tecan Infinite M 200. Zde byla měřena absorbance po dobu 6 minut.

Výpočet:

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

ΔA_{vz} změna absorbance vzorku za 1 minutu

ΔA_{sl} změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ϵ_{NADPH} molární absorpční koeficient $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm

1000 přepočítání na nmol/min/ml

V_i objem reakční směsi 0,20 ml

V_s objem biologické frakce při 5x ředění 0,010 ml

4.10.4. Stanovení aktivity thioredoxinreduktasy

Thioredoxinreduktasa (TrxR) katalyzuje přeměnu 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) na 5-thio-2-nitrobenzoovou kyselinu (TNB) za současné oxidace NADPH (Kuntz et al. 2007). Pomocí spektrofotometrického sledování přírůstku absorbance při 412 nm bylo sledováno množství vznikajícího TNB (Bonilla et al. 2008).

Zásobní roztoky:

0,1 M K-fosfátový pufr (pH 7,0)

50 mM EDTA

2 mM NADPH

1 mM DTNB

Postup:

Subcelulární frakce byla pozvolna na ledu rozmrazena a poté 5x redestilovanou vodou naředěna. Následně bylo do dvou sloupců mikrotitrační destičky GAMA napipetováno do 6 jamek 50 μ l cytosolu (první sloupec cytosol kontrolní skupiny, druhý sloupec cytosol ovlivněný tasemnicí *H. d.*). Do zbylých dvou jamek každého sloupce byl napipetován sodno-fosfátový pufr o pH 7,4 (slepý vzorek). Poté bylo napipetováno multikanálovou pipetou 150 μ l reakční směsi obsahující: 2 ml K-fosfátového pufru, 1,6 ml 50 mM EDTA, 2 ml 1 mM roztoku DTNB, 0,4 ml roztoku NADPH. Destička byla mírně protřepána a vložena do přístroje Tecan Infinite M 200, v němž bylo provedeno měření enzymatické aktivity při 412 nm po dobu 6 minut.

Výpočet:

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

ΔA_{vz} změna absorbance vzorku za 1 minutu

ΔA_{sl} změna absorbance slepého vzorku za 1 minutu

ϵ_{NADPH}	molární absorpční koeficient $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
l	délka vrstvy (výška jamky) 0,75 cm
1000	přepočet na nmol/min/ml
V_i	objem reakční směsi 0,20 ml
V_s	objem biologické frakce při ředění 5x 0,010 ml

4.10.5. Stanovení aktivity katalasy

Katalasa katalyzuje reakci přeměny peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Nezareagovaný peroxid vytváří s molybdenanem amonným žlutý komplex, jehož absorbance se měří při 405 nm (Góth 2003).

Zásobní roztoky:

60 mM Na-K-fosfátový pufr (pH 7,4)

6,5 mM H_2O_2

32,4 mM roztok molybdenanu amonného

Postup:

Do mikrotitrační destičky GAMA bylo vše (s výjimkou frakcí) pipetováno multikanálovou pipetou. Složky byly přidávány postupně dle tabulky 3. Subcelulární frakce byly 10x zředěny Na-K fosfátovým pufrem pH 7,4.

Tab. 3 Schéma pipetování do GAMA destičky (Bl-blank; MIK K – mikrosomy kontrolní; MIK Tas – mikrosomy ovlivněné tasevníci *H. diminuta*; molybd. – molybdenan amonný).

	Bl 1 MIK K	MIK K	Bl 1 MIK Tas	MIK Tas	Bl 2	Bl 3
1.	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl H ₂ O ₂	100 µl pufru
2.	100 µl molybd.	20 µl MIK K	100 µl molybd.	20 µl MIK Tas	20 µl pufru	20 µl pufru
3.	Inkubace 1 min (37 °C, třepání)					
4.	-----	100 µl molybd.	-----	100 µl molybd.	100 µl molybd.	100 µl molybd.
5.	1 min ponecháno stát					
6.	20 µl MIK K	-----	20 µl MIK Tas	-----	-----	-----
7.	Změřena absorbance při 405 nm					

Poznámka: Toto schéma bylo použito i v případě měření aktivity v cytosolu, kde do čtyř sloupců byl místo mikrosomů přidán cytosol.

Výpočet:

$$\text{Aktivita} = \frac{(\text{Abl 1} - \text{Avz})}{(\text{Abl 2} - \text{Abl 3})} \cdot 32,5 \cdot \text{zř} \quad [\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}]$$

Abl 1 absorbance blanku 1

Avz absorbance vzorku

Abl 2 absorbance blanku 2

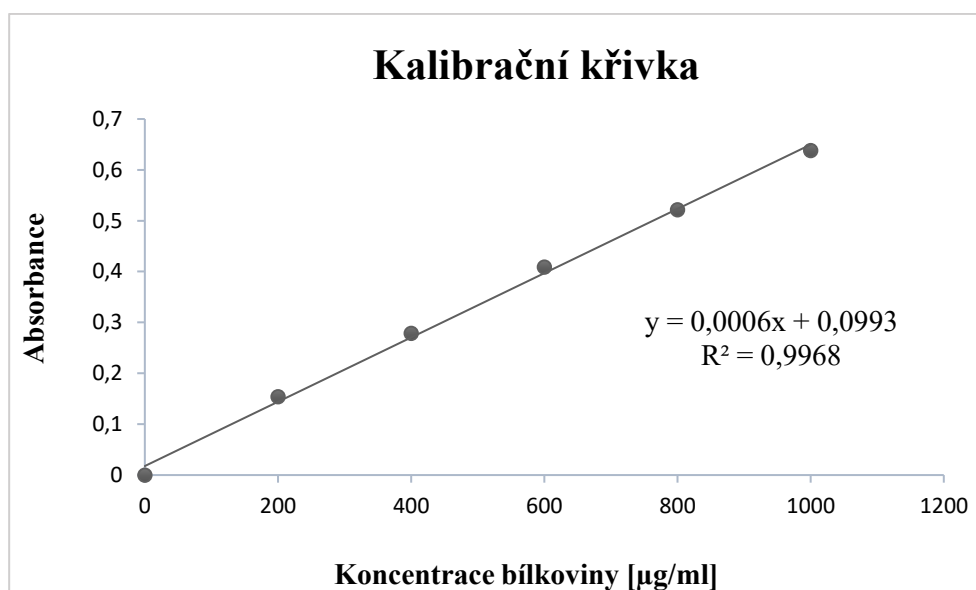
Abl 3 absorbance blanku 3

zř zředění (10)

5. VÝSLEDKY

5.1. Koncentrace proteinů

Koncentrace bílkoviny v subcelulárních frakcích byla stanovena dle kapitoly 4.7. Od hodnot naměřené absorbance vzorků byl odečten průměr hodnot absorbance slepých vzorků. Na základě získaných hodnot byla sestrojena kalibrační křivka vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny (Obr. 12).



Obr. 12 Závislost absorbance na koncentraci bílkoviny.

Poté pomocí vzorce rovnice lineární regrese ($y = 0,0006x + 0,0993$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9968$) byla vypočtena koncentrace bílkoviny ve střevních mikrosomech a cytosolu kontrolní skupiny potkanů a potkanů s tasemnicí *Hymenolepis diminuta*. Tyto průměrné hodnoty získané ze 3 nezávislých měření (viz Tab. 4) pak byly použity při výpočtu specifických enzymatických aktivit.

Tab. 4 Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích.

Frakce	Koncentrace bílkoviny [mg/ml]
MIK kontrola	4,08 ± 0,21
MIK tasemnice	3,59 ± 0,14
CYT kontrola	8,17 ± 0,32
CYT tasemnice	8,63 ± 0,36

5.2. Ovlivnění enzymů 1. fáze metabolismu přítomností tasemnice

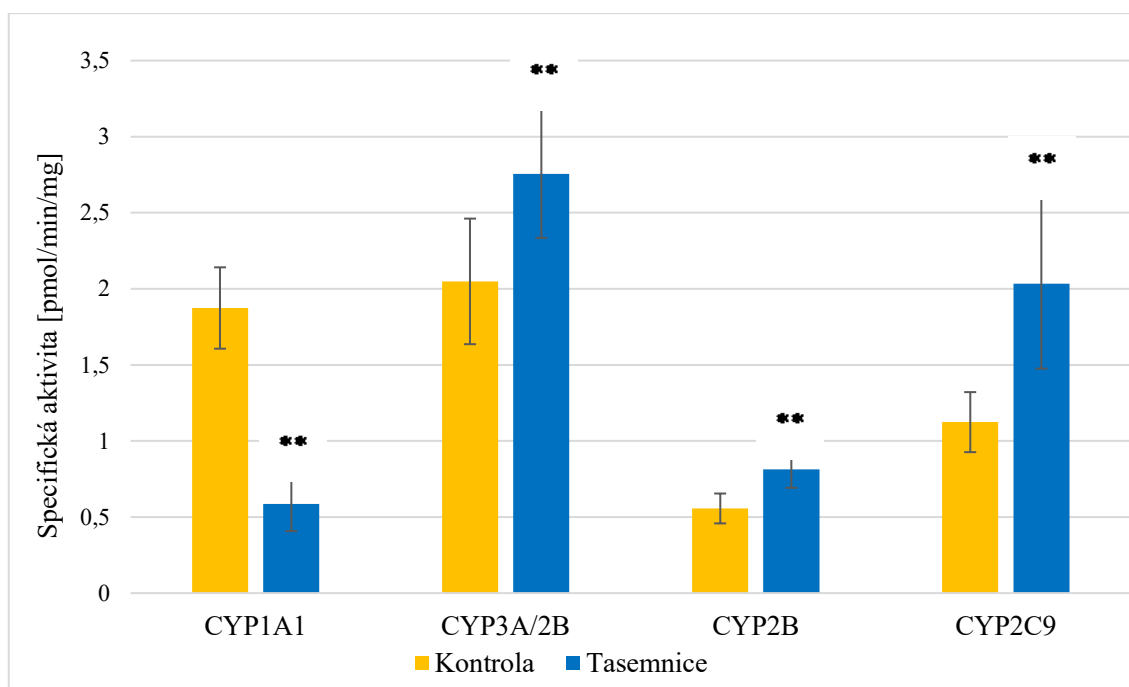
5.2.1. Aktivita některých isoform cytochromu P450

Použitím specifických substrátů pro jednotlivé isoformy (CYP1A1, CYP1A2, CYP3A, CYP2B a CYP2C9) cytochromu P450 byl v mikrosomálních frakcích spektrofotometricky naměřen přírůstek fluorescence, z něhož byla vypočítána enzymatická aktivita (viz kapitola 4.8.1). Získané hodnoty pak byly dále přeočítány pomocí koncentrace proteinu na hodnoty specifické enzymatické aktivity [pmol/min/mg]. Výsledky vyjadřují průměrnou hodnotu specifické aktivity a směrodatnou odchylku ze 3 experimentálních měření (Tab. 5).

Tab. 5 Specifická aktivita isoform cytochromu P450 ve střevních mikrosomech kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Specifická enzymatická aktivita [pmol/min/mg]		
Isoforma CYP	Kontrola	Tasemnice
1A1 (EROD)	1,87 ± 0,27	0,59 ± 0,18 **
1A2 (MROD)	nenalezena	nenalezena
3A/2B (BROD)	2,05 ± 0,48	2,76 ± 0,44 **
2B (PROD)	0,56 ± 0,10	0,81 ± 0,12 **
2C9	1,12 ± 0,20	2,03 ± 0,56 **

** označuje statisticky velmi významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$).



Obr. 13 Znárodnění specifické aktivity isoform cytochromu P450 ve střevních mikrosomech kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. ** označuje statisticky velmi významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$).

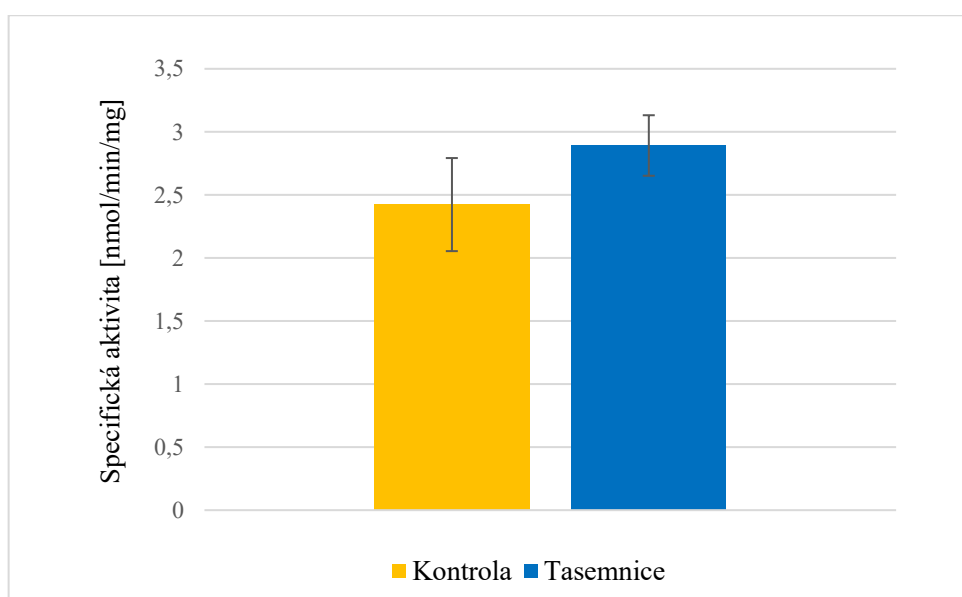
Výsledky měření (Obr. 13) ukazují, že přítomnost tasemnice *Hymenolepis diminuta* statisticky velmi významně ($p < 0,01$; Studentův t-test) ovlivnila aktivitu některých isoform cytochromu P450. Konkrétně u isoformy 3A, 2B a 2C9 byl zaznamenán nárůst aktivity, naopak u isoformy 1A1 byl zjištěn pokles aktivity oproti kontrolní skupině. U isoformy 1A2 nebyla aktivita ve střevních mikrosomech detekována.

5.2.2. Aktivita FMO

Stanovení enzymové aktivity flavinové monooxygenasy (FMO) bylo provedeno dle metodiky uvedené v 4.8.2. Enzymatická aktivita byla poté dále vztažena na obsah bílkoviny, čímž byla získána hodnota specifické enzymatické aktivity [nmol/min/mg]. V tabulce 6 jsou znázorněny průměrné hodnoty z celkem 3 experimentálních měření.

Tab. 6 Znáznornění specifické aktivity FMO v mikrosomech kontrolní a tasevní ovlivněné skupiny potkana.

Frakce – mikrosomy	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	2,42 ± 0,37
Tasemnice	2,89 ± 0,24



Obr. 14 Znáznornění specifické aktivity FMO v mikrosomech kontrolní a tasevní ovlivněné skupiny potkanů.

Z výsledků (Obr. 14) vyplývá, že nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ve specifické aktivitě mezi kontrolní a tasevní ovlivněnou skupinou potkanů.

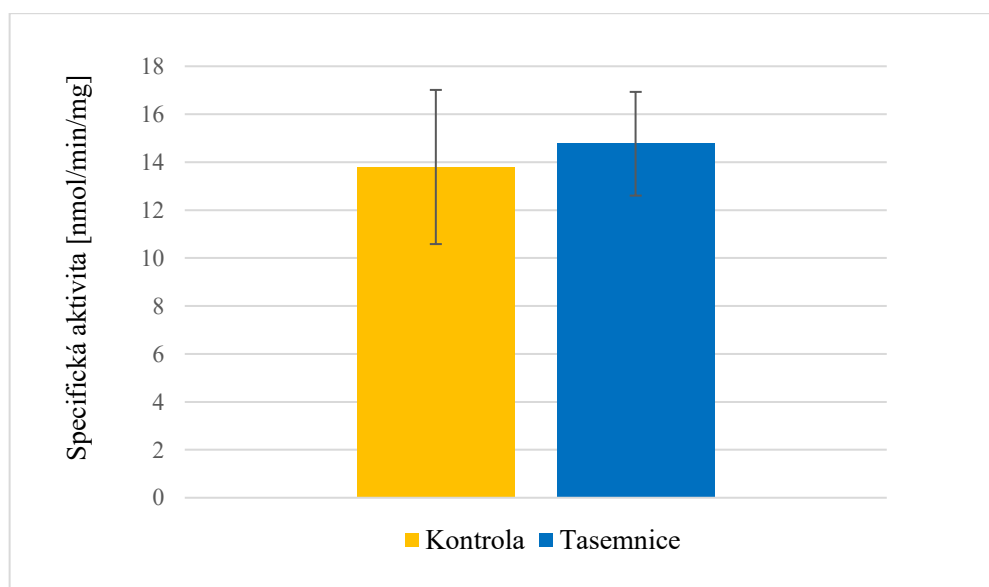
5.2.3. Aktivita AKR1A1

Stanovení aktivity enzymu AKR1A1 se substrátem 4-pyridinkarboxaldehydem bylo provedeno dle kapitoly 4.8.3. Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána enzymatická aktivita, která byla dále vztažena na obsah bílkoviny. Tím byla získána hodnota specifické enzymatické aktivity [nmol/min/mg]. Níže uvedené výsledky (Tab. 7)

vyjadřují průměrnou hodnotu specifické aktivity a směrodatnou odchylku celkem ze tří experimentálních měření.

Tab. 7 Specifická aktivita AKR1A1 v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Frakce – cytosol	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	13,80 ± 3,21
Tasemnice	14,77 ± 2,16



Obr. 15 Znárodnění specifické aktivity AKR1A1 v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Z výsledků (Obr. 15) vyplývá, že přítomnost tasemnice statisticky významně neovlivnila aktivitu enzymu AKR1A1.

5.2.4. Aktivita reduktas metyraponu

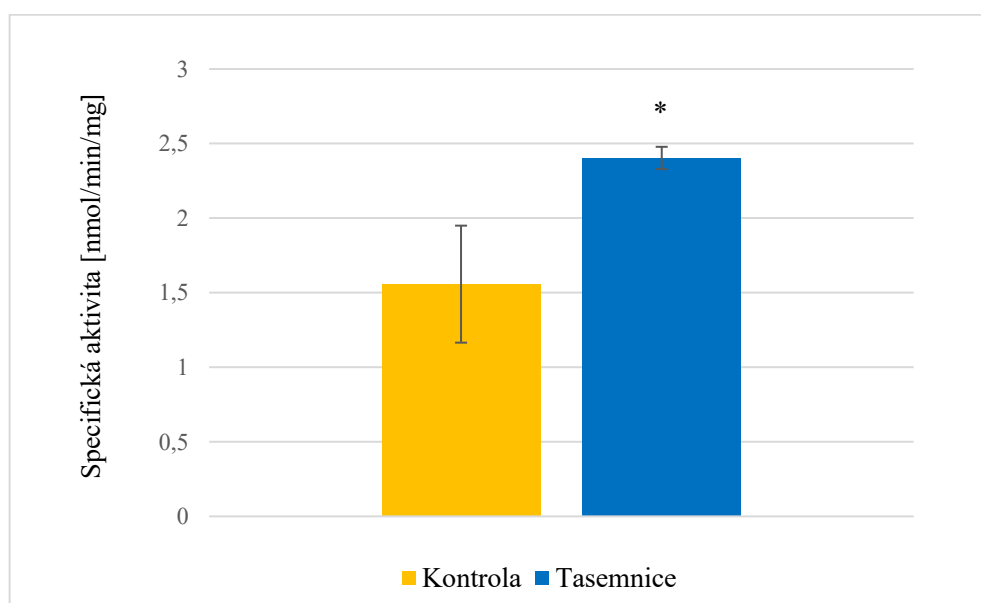
Stanovení aktivity reduktas metyraponu (AKR1C9 a CBR1 v cytosolu) je založeno na měření poklesu absorbance, z nichž byla následně kvantitativně vyjádřena enzymatická aktivita (viz kapitola 4.8.4). Získané hodnoty enzymatické aktivity pak byly dále

přepočítány na mg proteinu v příslušné frakci, čímž byly převedeny na hodnoty specifické enzymatické aktivity [nmol/min/mg]. V tabulce 8 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze 3 experimentálních měření.

Tab. 8 *Specifická aktivita AKR1C9 a CBR1 v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.*

Frakce – cytosol	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	1,56 ± 0,39
Tasemnice	2,40 ± 0,07 *

* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (p < 0,05).



Obr. 16 *Znázornění specifické aktivity AKR1C9 a CBR1 cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. * označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině (p < 0,05).*

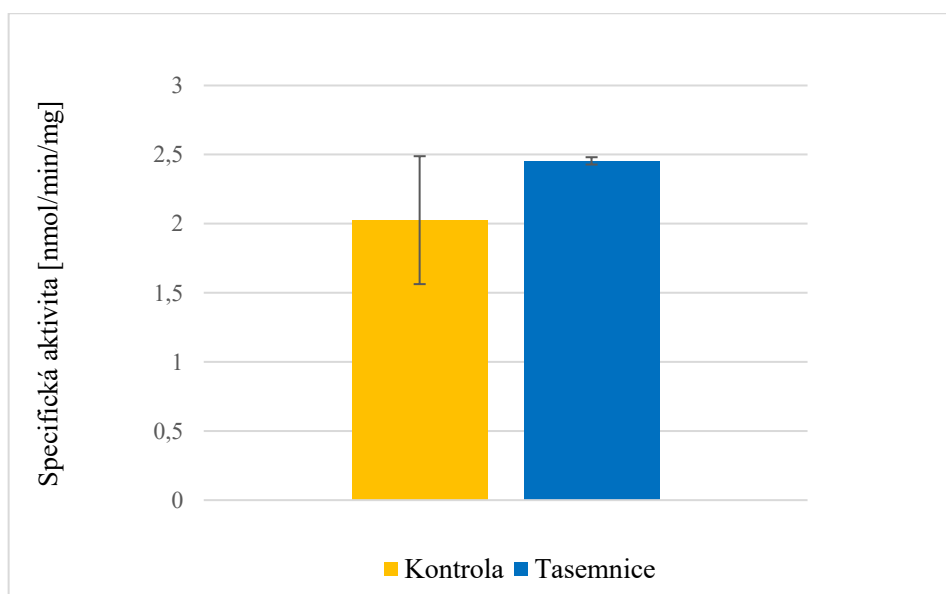
Ze získaných hodnot je patrný nárůst enzymatické aktivity AKR1C9 a CBR1 ovlivněných tasemnicí (Obr. 16). Tato změna byla při statistickém vyhodnocení Studentovým t - testem signifikantní (p < 0,05).

5.2.5. Aktivita AKR1C9

Aktivita AKR1C9 byla stanovena (dle kapitoly 4.8.5) v cytosolických frakcích za přítomnosti substrátu (acenaftenol) a za současné přeměny NADP^+ na NADPH. To bylo zaznamenáno jako nárůst absorbance, z níž byla spočítána hodnota enzymatické aktivity. Ta byla dále (pomocí přepočítání na mg proteinu) převedena na specifickou enzymatickou aktivitu [nmol/min/mg]. Výsledky uvedené v tabulce 9 vyjadřují průměrnou hodnotu specifické aktivity celkem ze 3 experimentálních měření.

Tab. 9 Specifická aktivita AKR1C9 v cytosolu kontrolní a tasevní ovlivněné skupiny potkanů.

Frakce - cytosol	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	$2,03 \pm 0,46$
Tasemnice	$2,45 \pm 0,02$



Obr. 17 Znárodnění specifické aktivity AKR1C v cytosolu kontrolní a tasevní ovlivněné skupiny potkanů.

Z výsledků vyplývá, že přítomnost tasevní významně neovlivnila aktivitu enzymu AKR1C9 (Obr. 17).

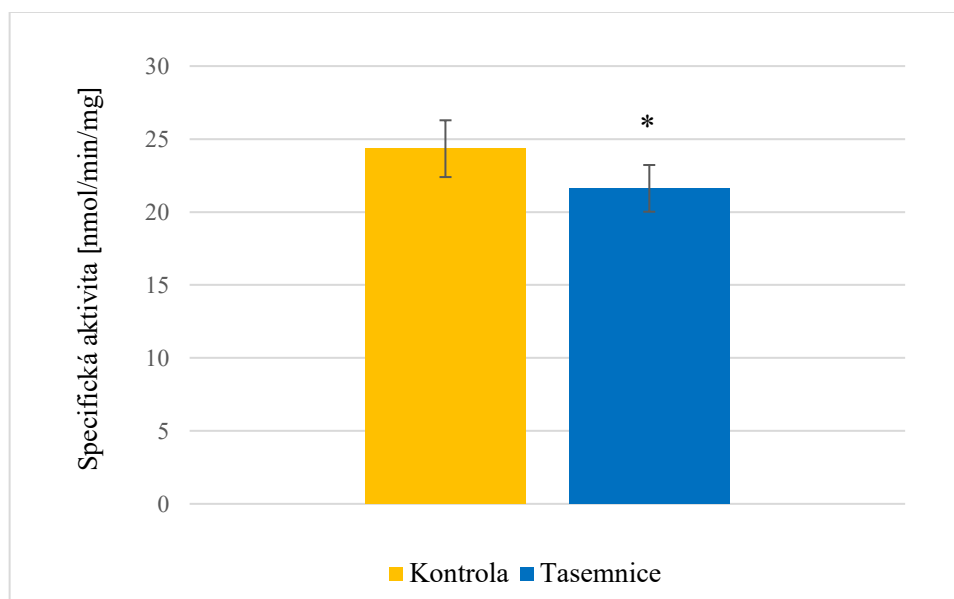
5.2.6. Aktivita CBR1

Pomocí spektrofotometricky zjištěné absorbance byla aktivita karbonylreduktasy 1 (CBR1) stanovena v cytosolických frakcích za přítomnosti substrátu menadionu (viz kapitola 4.8.6.). Následným vztahením enzymatické aktivity na celkové množství bílkoviny ve vzorku byla vypočítána specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]. Výsledky zahrnují průměrné hodnoty celkem ze 3 experimentálních měření (Tab. 10).

Tab. 10 Specifická aktivita CBR1 v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Frakce - cytosol	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	24,34 ± 1,94
Tasemnice	21,62 ± 1,60 *

* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$).



Obr. 18 Znáornění specifické aktivity CBR1 v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. * označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$).

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že přítomnost tasemnice *Hymenolepis diminuta* způsobila pokles aktivity enzymu CBR1 (Obr. 18). Tento pokles byl ve Studentově t-testu prokázán jako statisticky významný ($p < 0,05$).

5.3. Ovlivnění enzymů 2. fáze metabolismu přítomností tasemnice

5.3.1. Aktivita UGT, SULT, GST

Stanovení UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) v mikrosomech bylo provedeno dle kapitoly 4.9.1. Při stanovení sulfotransferasy (SULT) v cytosolu bylo postupováno dle kapitoly 4.9.2. U obou měření byla zjišťována absorbance nekonjugovaného substrátu (p-nitrofenolu) a tato hodnota pak byla použita k výpočtu enzymatické aktivity daného enzymu.

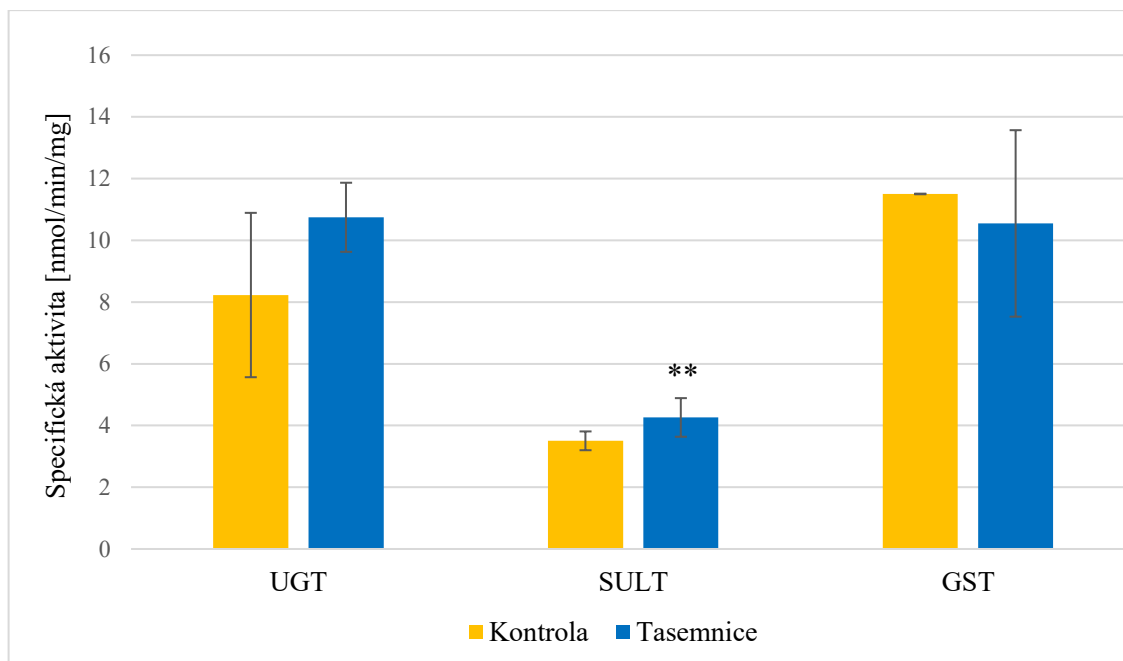
V případě měření aktivity glutathion-S-transferasy (GST) v cytosolu byla základem tvorba konjugátu GSH-CDNB (viz kapitola 4.9.3), jehož absorbance byla použita k výpočtu aktivity enzymu.

U všech tří výše zmíněných enzymů (UGT, SULT a GST) byla enzymatická aktivita dále přepočítána pomocí koncentrace proteinu ve frakci na specifickou enzymatickou aktivitu [nmol/min/mg]. V tabulce 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze 3 experimentálních měření.

Tab. 11 Specifická aktivita UGT, SULT a GST v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Enzym	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]			
	MIK Kontrola	MIK Tasemnice	CYT Kontrola	CYT Tasemnice
UGT	8,23 ± 2,66	10,75 ± 1,12	nenalezena	nenalezena
SULT	-----	-----	3,50 ± 0,30	4,26 ± 0,63 **
GST	-----	-----	11,50 ± 0,01	10,55 ± 3,02

** označuje statisticky velmi významný rozdíl oproti kontrolní skupině (p < 0,01).



Obr. 19 Znárodnění specifické aktivity UGT, SULT a GST v jednotlivých frakcích. ** označuje statisticky velmi významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$).

Výsledky měření (Obr. 19) ukazují, že přítomnost tasemnice ve střevě způsobila mírný nárůst enzymatické aktivity UGT v mikrosomech. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný.

Oproti tomu u sulfotransferasy (SULT) byl zjištěn nárůst enzymatické aktivity, jež byl při vyhodnocení Studentovým t -testem statisticky velmi významný (hladina $p < 0,01$).

U glutathion-S-transferasy (GST) nedošlo ke statisticky významné změně enzymatické aktivity.

5.4. Ovlivnění antioxidačních enzymů přítomností tasemnice

5.4.1. Aktivita peroxidas

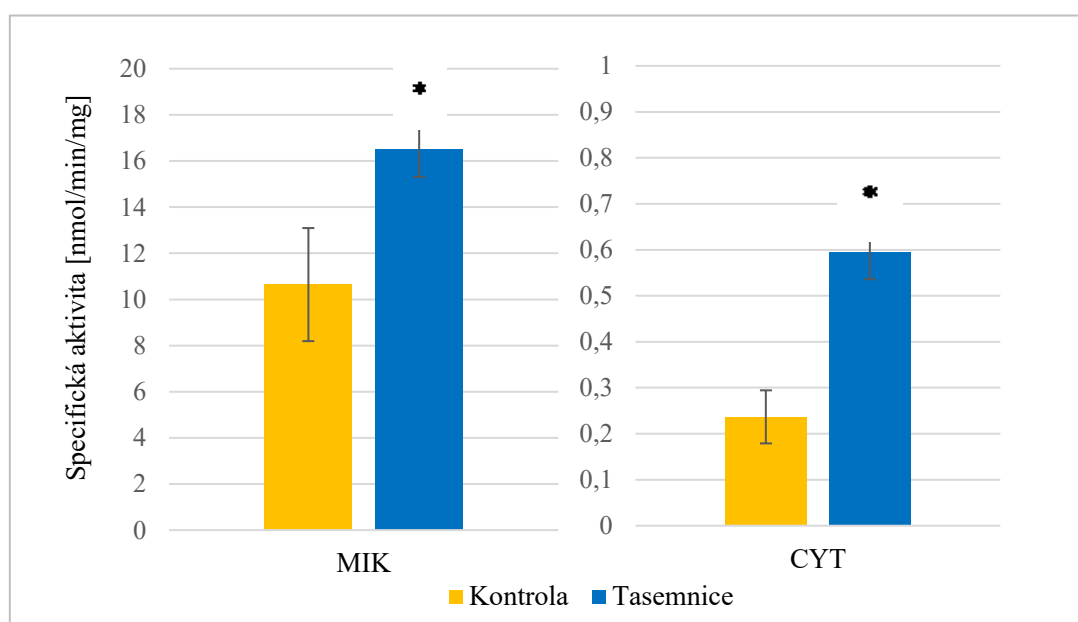
Při stanovení aktivity peroxidas byl použit substrát anilin-pyrokatechol a bylo postupováno dle metodiky uvedené v kapitole 4.10.1. Hodnoty získané enzymatické aktivity pak byly dále přepočítány na miligram bílkoviny ve vzorku, a tak byly získány hodnoty specifické enzymatické aktivity [nmol/min/mg]. Níže uvedené výsledky

(Tab. 12) vyjadřují průměrnou hodnotu specifické aktivity celkem ze 3 experimentálních měření.

Tab. 12 *Specifická aktivita peroxidasy v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.*

Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]			
MIK Kontrola	MIK Tasemnice	CYT Kontrola	CYT Tasemnice
10,64 ± 2,45	16,52 ± 1,20 *	0,24 ± 0,06	0,60 ± 0,06 *

* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$).



Obr. 20 *Znázornění specifické aktivity peroxidasy ve frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. * označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$).*

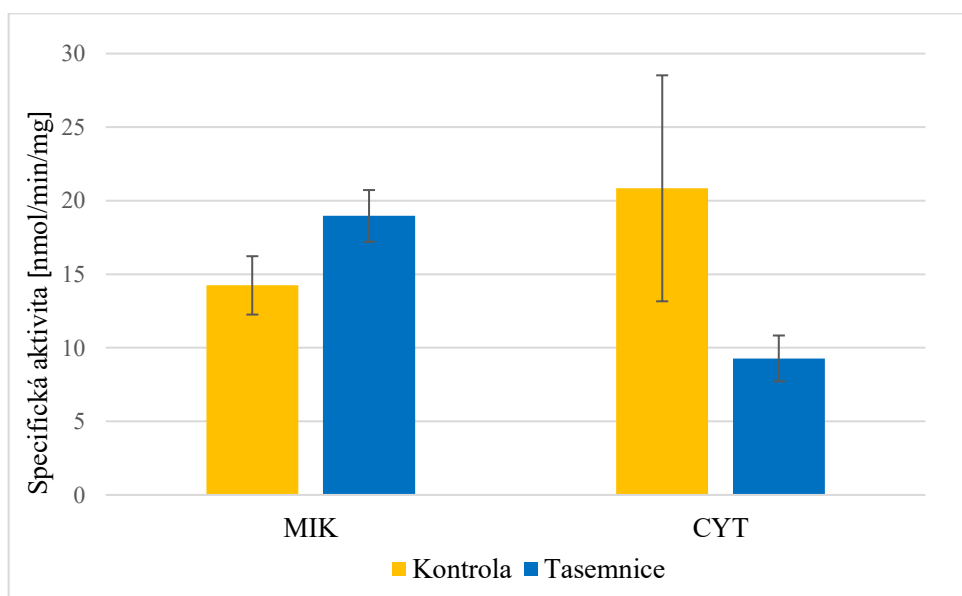
Z naměřených výsledků je patrný signifikantní nárůst enzymatické aktivity peroxidasy u obou frakcí skupiny potkanů ovlivněných tasemnicí (Obr. 20). Vyšší hodnoty byly obecně naměřeny v mikrosomech. Co se týká cytosolu, i zde došlo k nárůstu enzymatické aktivity, avšak aktivita v porovnání s mikrosomy dosahovala nižších hodnot.

5.4.2. Aktivita glutathionperoxidasy

Při stanovení aktivity glutathionperoxidasy (GPx) blíže uvedeném v kapitole 4.10.2 byla naměřená absorbance použita k výpočtu enzymatické aktivity. Z její hodnoty pak dále byla vypočítána specifická enzymatická aktivita. Výsledky v tabulce 13 zahrnují průměrné hodnoty celkem ze 3 experimentálních měření.

Tab. 13 Specifická aktivita glutathionperoxidasy v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]			
MIK Kontrola	MIK Tasemnice	CYT Kontrola	CYT Tasemnice
14,24 ± 1,98	18,96 ± 1,75	20,84 ± 7,68	9,27 ± 1,55



Obr. 21 Znáznornění specifické aktivity glutathionperoxidasy ve frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

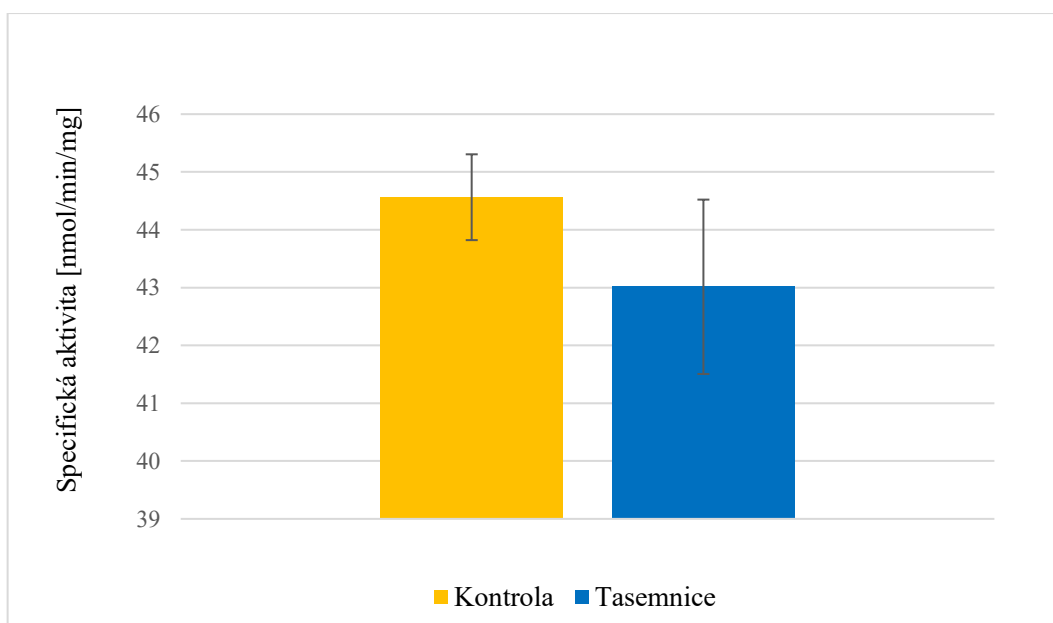
Z výsledků (Obr. 21) vyplývá, že přítomnost tasemnice statisticky významně neovlivnila aktivitu glutathionperoxidasy.

5.4.3. Aktivita glutathionreduktasy

Glutathionreduktasa (GR) byla stanovena dle kapitoly 4.10.3. Hodnoty enzymatické aktivity poté byly vztaženy na miligram proteinu, čímž byla získána hodnota specifické enzymatické aktivity. Níže uvedené výsledky (Tab. 14) vyjadřují průměrnou hodnotu specifické aktivity a směrodatnou odchylku celkem ze 3 experimentálních měření.

Tab. 14 *Specifická aktivita glutathionreduktasy v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.*

Frakce - cytosol	Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]
Kontrola	44,56 ± 0,74
Tasemnice	43,01 ± 1,51



Obr. 22 *Znázornění specifické aktivity glutathionreduktasy v cytosolu kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.*

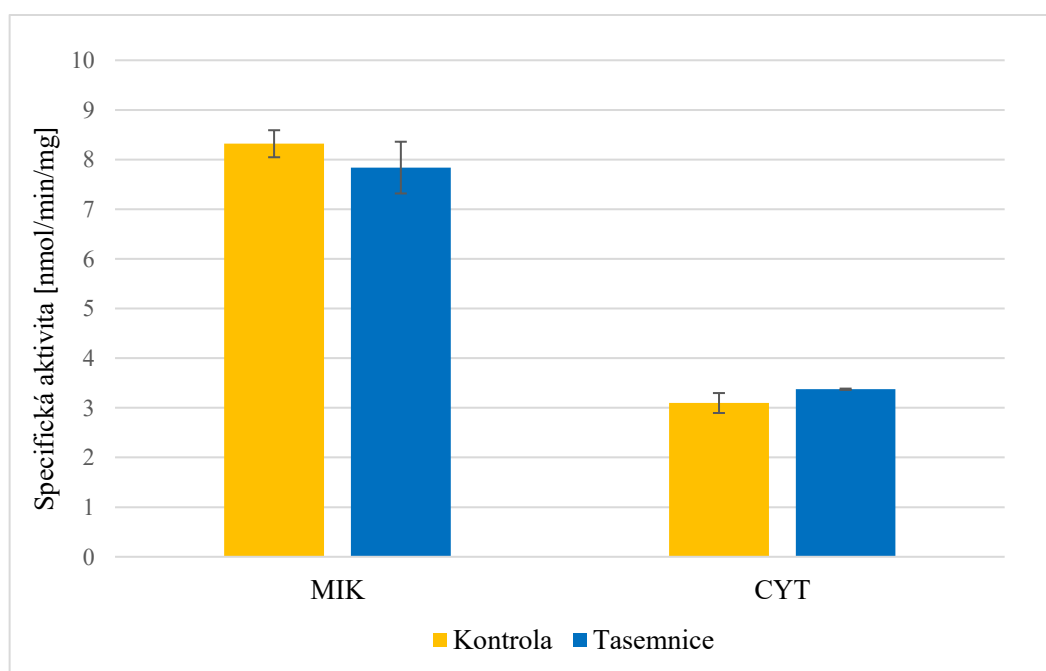
Výsledky (Obr. 22) ukazují, že nedošlo ke statisticky významné změně specifické enzymatické aktivity u skupiny potkanů ovlivněných tasemnicí oproti kontrolní skupině.

5.4.4. Aktivita thioredoxinreduktasy

Při stanovení enzymatické aktivity thioredoxinreduktasy (TrxR) bylo postupováno dle kapitoly 4.10.4. Vypočítaná enzymatická aktivita byla dále pomocí koncentrace bílkoviny převedena na specifickou enzymatickou aktivitu. Níže uvedené hodnoty (Tab. 15) byly získány ze 3 experimentálních měření.

Tab. 15 Specifická aktivita TrxR v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

Specifická enzymatická aktivita [nmol/min/mg]			
MIK Kontrola	MIK Tasemnice	CYT Kontrola	CYT Tasemnice
8,32 ± 0,27	7,83 ± 0,52	3,10 ± 0,20	3,37 ± 0,01



Obr. 23 Znárodnění specifické aktivity TrxR ve frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.

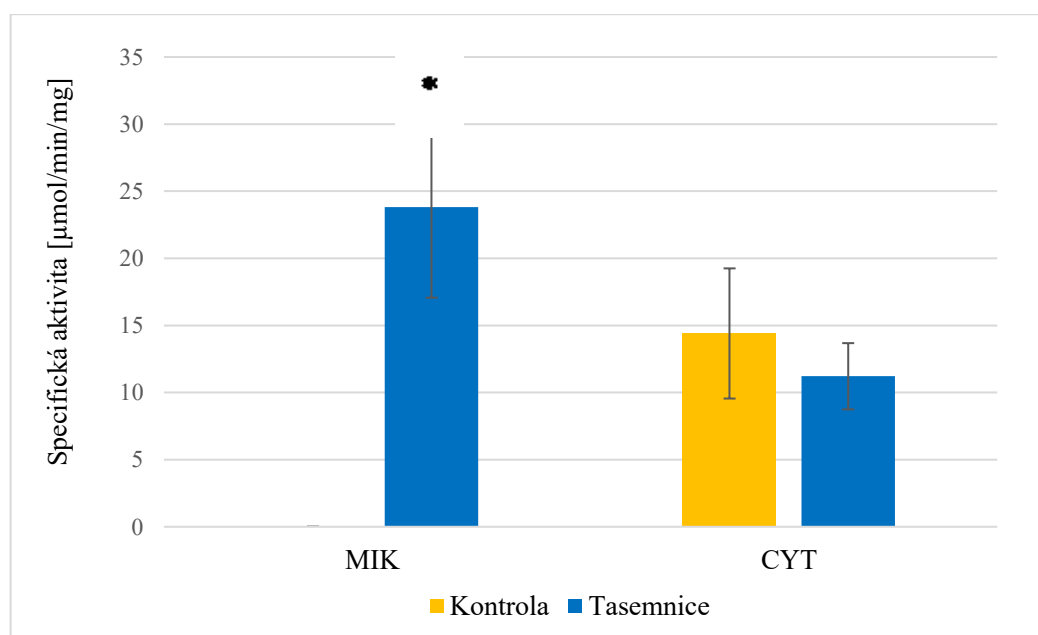
Z výše uvedených výsledků (Obr. 23) lze konstatovat, že přítomnost tasemnice výrazně neovlivnila aktivitu thioredoxinreduktasy oproti kontrole.

5.4.5. Aktivita katalasy

Při stanovení aktivity katalasy byla zvolena metoda s molybdenanem amonným (viz kapitola 4.10.5). Získané hodnoty absorbance byly využity pro výpočet enzymatické aktivity a tyto hodnoty byly dále převedeny na miligram proteinu. Tím byla získána hodnota specifické enzymatické aktivity [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]. V tabulce 16 jsou zaznamenány průměrné hodnoty ze 3 experimentálních měření.

Tab. 16 *Specifická aktivita katalasy v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů.*

Specifická enzymatická aktivita [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]			
MIK Kontrola	MIK Tasemnice	CYT Kontrola	CYT Tasemnice
Nenalezena	$23,81 \pm 6,73$ *	$14,40 \pm 4,85$	$11,22 \pm 2,47$



Obr. 24 *Znázornění specifické aktivity katalasy v jednotlivých frakcích kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. * označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ($p < 0,05$).*

Výsledky (Obr. 24) ukazují statisticky významný nárůst aktivity katalasy v mikrosomech skupiny s tasemnicí oproti kontrolní skupině, v níž aktivita tohoto antioxidantního enzymu

nebyla nalezena. Tento nárůst byl ve Studentově t-testu prokázán jako statisticky významný ($p < 0,05$).

V cytosolu nebyl rozdíl naměřených hodnot aktivity katalasy statisticky významný oproti kontrole.

6. DISKUZE

Tasemnice krysí, *Hymenolepis diminuta*, v poslední době budí značný zájem v různých oblastech vědy. Osvědčila se pro studium metabolismu anthelmintik a dalších xenobiotik. Jak uvádí Cvilink et al. (2009) či Bartíková et al. (2012), u *Hymenolepis diminuta* dochází ke změnám hladin detoxikačních enzymů v reakci na různá xenobiotika. Tím se tento parazit může chránit jak před účinnými anthelmintiky, tak i před obrannými mechanismy svého hostitele.

Hymenolepis diminuta je v současné době intenzivně studována i z hlediska imunologického, neboť bylo zjištěno, že vykazuje imunomodulační efekt na hostitelský organismus. Ten spočívá v indukci Th2 imunitní odpovědi spolu se zvýšenou produkcí protizánětlivých cytokinů IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 (McKay 2010, Persaud et al. 2007). To vede k inhibici Th1 imunitní odpovědi a následnému potlačení zánětlivých procesů, které jsou známy například u střevních autoimunitních chorob (Hunter et al. 2005, Hernandez et al. 2013, Weinstock & Elliott 2014). Tento fakt vedl k myšlence využití parazita *Hymenolepis diminuta* v helmintoterapii.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký je vliv parazita *Hymenolepis diminuta* na aktivitu biotransformačních a antioxidantních enzymů hostitele. Zdroje o této problematice byly do této doby omezené, neboť zájmem doposud publikovaných prací byl vliv různých exogenních látek a xenobiotik na parazita *Hymenolepis diminuta* (Kundu et al. 2012, Chai 2013). Pokud byl studován vliv na hostitelský organismus infikovaný parazitem *H. diminuta*, pak bylo ovlivnění hostitele zkoumáno především z imunologického hlediska (McKay 2010, Weinstock & Elliott 2014, Heylen et al. 2014, Smyth et al. 2017). Tato diplomová práce tedy přináší rozšíření znalostí o tom, jak *Hymenolepis diminuta* může ovlivnit svého hostitele i z hlediska biochemického, konkrétně jak ovlivní specifické enzymatické aktivity některých detoxikačních enzymů ve střevní mukóze hostitele.

K dosažení hlavního cíle této diplomové práce bylo zapotřebí splnit některé dílčí úkoly. Nejdříve byli konzumací trusu s obsahem vajíček tasemnice *Hymenolepis diminuta* infikováni mezihostitelé. Jednalo se o 10 brouků (*Tenebrio molitor*). I přesto, že mezihostitelem může být také potemník skladištní (*Tribolium confusum*), byl v naší práci vybrán brouk potemník moučný (*Tenebrio molitor*), protože je počet vyvinutých infekčních cysticerkoidů u *Tenebrio molitor* vyšší (Voge 1956). Anderassen et al. (1999)

popisuje, že k vyvinutí infekčních cysticerkoidů dochází po 10 dnech. V naší práci byly cysticerkoidy odebrány po 12 dnech, aby byl zajištěn čas k jejich dostatečnému vývinu.

Jako definitivní hostitel byl v této práci zvolen potkan. Některé studie zabývající se životním cyklem či imunologickými vlivy *Hymenolepis diminuta* proběhly i na myších coby definitivních hostitelích, avšak dle Anderssena et al. (1999) je právě potkan původním přirozeným hostitelem. Každému ze 6 potkanů kmene Wistar bylo podáno žaludeční sondou 12 cysticerkoidů ve fyziologickém roztoku. Tento počet by měl být pro infekci a dozrání *Hymenolepis diminuta* adekvátní. Dle Hesselberga & Andreassena (1975) je při nákaze 1–20 cysticerkoidy výtěžnost dospělců *H. diminuta* 100–65 %. V případě infekce vyšším počtem cysticerkoidů (20–40) klesá průměrná výtěžnost na 13–2 %. Kontrolní skupině dalších 6 potkanů byl podán za stejných podmínek pouze fyziologický roztok. Důvodem bylo podrobení kontrolní skupiny stejnému stresu a tím zamezení nepřesnosti výsledků.

Těchto celkem 12 potkanů bylo chováno ve viváriu po dobu 2 měsíců. Jak popisuje Smyth et al. (2017), už po 3 týdnech dochází k dozrání tasemnice v dospělé jedince, protože je možné ve stolici potkana pomocí mikroskopu detekovat vajíčka *Hymenolepis diminuta*. Ta mohou být produkována pouze dospělcem *H. diminuta*. V naší studii byla infekce úspěšná a ve stolici všech 6 infikovaných potkanů byla po 4 týdnech inkubace nalezena vajíčka tasemnice *H. diminuta*. Uvádí se, že jeden dospělý jedinec *H. diminuta* může produkovat více než 250 000 vajíček denně. Důvodem tohoto obrovského počtu je i fakt, že je v přírodě velmi nízká šance, aby každé vajíčko dosáhlo reprodukční zralosti (Dewey 2001). Ačkoli bylo již po prvním měsíci inkubace prokázáno, že u všech 6 potkanů došlo k vyvinutí v dospělé jedince *Hymenolepis diminuta*, bylo všech 12 potkanů chováno ještě další měsíc. A to proto, aby byla zajištěna dostatečná doba k tomu, aby se u skupiny potkanů s *Hymenolepis diminuta* projevil vliv parazita na svého hostitele.

Po uplynutí této doby a následném usnutí a usmrcení potkanů bylo ze všech 12 potkanů získáno tenké střevo. Střevní obsah byl vymyt fyziologickým roztokem, čímž u 6 potkanů s tasemnicí došlo zároveň i k uvolnění jedinců tasemnic ze střeva. Jak publikoval Read (2000), u tasemnic se uplatňuje tzv. crowding efekt, který popisuje, že s vyšším počtem tasemnic ve střevě jsou tasemnice menší. To bylo možné pozorovat i v naší studii, kdy u pěti potkanů došlo k vyvinutí více jedinců (8–12) *Hymenolepis diminuta* a u jednoho

potkana došlo k vyvinutí tasemnice sice jediné, ale výrazně větší než u potkanů s vyšším počtem tasemnic.

Dalším dílčím úkolem bylo získání střevní mukózy a následná příprava subcelulárních frakcí, konkrétně cytosolu a mikrosomů. Poté již byly stanovovány specifické enzymatické aktivity vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů u kontrolní a tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. Vzhledem k tomu, že vliv *H. diminuta* na aktivitu biotransformačních enzymů 1. i 2. fáze metabolismu u hostitele nebyl doposud ve větší míře studován, poskytují výsledky této práce rozšíření znalostí o dané problematice.

Z enzymů první fáze metabolismu byl studován vliv *H. diminuta* na hladinu některých cytochromů P450. Značná změna byla zaznamenána u isoformy CYP1A1, kde ve střevě potkanů ovlivněných *Hymenolepis diminuta* došlo k výraznému poklesu specifické enzymatické aktivity. Jak uvádí Zhang et al. (1997), inhibice isoformy CYP1A1 by znamenala potlačení aktivace prekarcinogenů jako jsou např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), což vede ke snížení toxicity a karcinogenity. U isoformy CYP1A2 nebyla aktivita ve střevě nalezena ani u jedné skupiny potkanů, protože, jak dokládá Stiborová et al. (1999), tato isoforma je exprimována pouze v játrech.

U cytochromu P450 podrodiny 3A a 2B byl v naší práci zaznamenán nárůst specifické enzymatické aktivity u potkanů ovlivněných *Hymenolepis diminuta* oproti kontrolní skupině. Zastoupení podrodiny 2B je v lidském organismu i u potkana nižší než podrodiny 3A. Podrodina 3A konkrétně isoforma 3A4 se v lidském organismu podílí na biotransformaci přes 50 % léčiv a 30 % všech xenobiotik (Skálová et al. 2011). Nárůst aktivity této isoformy tak vede k zásadním změnám metabolismu léčiv, jako mohou být například antihypertenziva, anthelmintika či léčiva užívaná u terapie autoimunitních chorob. Dle Martignoniho et al. (2006) se i u potkana podrodina 3A významně podílí na metabolismu, avšak nejvíce zastoupena isoforma u samců je 3A2 a 3A18. I z tohoto důvodu by bylo dále vhodné prostudovat vliv parazita přímo na lidskou isoformu CYP3A4. Významný nárůst enzymatické aktivity u potkanů ovlivněných tasemnicí byl patrný i u CYP2C9. Tato isoforma se u člověka zásadně podílí na metabolismu warfarinu. Dle Stiborové et al. (1999) steroidní látky včetně endogenních kortikosteroidů působí jako induktory CYP2C9 a CYP2B6.

Z enzymů 1. fáze biotransformace byly dále studovány reduktasy karbonylové skupiny. Při stanovení aktivity reduktas metyraponu, na které se podílejí převážně AKR1C9 a

CBR1, byl patrný nárůst enzymatické aktivity u skupiny potkanů ovlivněných helmintem *Hymenolepis diminuta*. Vzhledem k následnému změření aktivity AKR1C9 pomocí acenaftenolu lze předpokládat, že zvýšení specifické enzymatické aktivity je i u stanovení reduktas metyraponu pravděpodobně způsobeno enzymem AKR1C9. U aktivity karbonylreduktasy 1 (CBR1), měřené pomocí menadionu, došlo totiž k poklesu specifické enzymatické aktivity ve střevě potkanů ovlivněných *Hymenolepis diminuta*. Jak dokládá Forrest & Gonzales (2000), změna hladiny CBR1 vede ke snížení metabolismu léčiv s karbonylovou skupinou. Následkem může být prodloužení účinnosti antiparazitik (mebendazolu, prazikvantelu a niklosamidu) nebo dále antracyklinů (doxorubicin, daunorubicin).

Z enzymů 2. fáze metabolismu byla zjišťována aktivita UDP-glukuronosyltransferas (UGT), sulfottransferas (SULT) a glutathion-S-transferas (GST). Z těchto enzymů bylo patrné zvýšení specifické aktivity UGT, avšak tato změna nebyla statisticky významná. U GST rovněž nedošlo k výrazné změně. Oproti kontrolní skupině došlo ke statisticky významnému k nárůstu aktivity sulfottransferas u potkanů ovlivněných *Hymenolepis diminuta*. Sulfottransferasy jsou významné při metabolizaci katecholaminů, steroidních a thyroïdních hormonů. Důvodem nárůstu enzymatické aktivity sulfottransferas může být i fakt, že exprese sulfottransferas je indukována glukokortikoidy (Runge-Morris & Kocarek 2005). Glukokortikoidy jsou ve zvýšené míře produkovány při stresové reakci, kterou může být právě i přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) v organismu.

V této diplomové práci byly studiu podrobeny i některé antioxidační enzymy, jejichž úloha spočívá v ochraně tkání před reaktivními formami kyslíku (ROS) jako je peroxid vodíku, superoxidové a hydroxylové radikály. Tyto reaktivní formy kyslíku způsobují poškození buněk, proteinů i DNA a napomáhají vzniku lipidových peroxidačních produktů (LPO), což vede k poškození membránové integrity a nepříznivým změnám metabolismu buněk (Kosik-Bogacka et al. 2011). Kosik-Bogacka et al. (2011) dále uvádí, že výskyt *Hymenolepis diminuta* ve střevě vyvolává oxidační stres u hostitele, neboť v jejich studii bylo zaznamenáno zvýšení lipidových peroxidačních produktů ve střevě potkana infikovaného *H. diminuta*.

Výrazná změna aktivity byla z antioxidačních enzymů zjištěna u peroxidas. Jak v mikrosomální, tak i v cytosolické frakci byl prokázán nárůst specifické enzymatické aktivity u potkanů ovlivněných *H. diminuta*. Na zvýšení peroxidasové aktivity

v mikrosomech by se mohla podílet i glutathionperoxidasa, u níž byla aktivita v této frakci lehce zvýšena. Obecně se ale v případě zvýšené hladiny peroxidas může jednat i o myeloperoxidasu či jiné nespecifické peroxidasy. Nicméně lze konstatovat, že zvýšení peroxidasové aktivity by mohlo souviset se zvýšeným oxidačním stresem vyvolaným přítomností parazita *Hymenolepis diminuta*. V případě glutathionreduktasy nebo thioredoxinreduktasy nedošlo k výrazným změnám hladin specifických enzymatických aktivit mezi kontrolní a tasemnicí ovlivněnou skupinou. Lze usoudit, že parazit *Hymenolepis diminuta* se tak nepodílí na jejich regulaci.

Přítomnost tasemnice ve střevě potkana vedla také ke zvýšení specifické aktivity katalasy. Jak uvádí Zámocky et al. (1998), katalasa je enzym, který slouží k ochraně buněk před toxickým vlivem hlavně vysokých koncentrací peroxidu vodíku. V rámci této práce bylo naměřeno signifikantní zvýšení enzymatické aktivity katalasy v mikrosomech, kde aktivita u kontrolní skupiny byla prakticky nulová. To podporuje myšlenku, že přítomnost parazita *Hymenolepis diminuta* vede u hostitele k oxidačnímu stresu, protože jak publikovali Racek & Holeček (1999), katalasa hraje důležitou roli při získávání tolerance k oxidativnímu stresu a adaptivní buněčné odpovědi.

Celkově z výsledků této práce vyplývá, že tasemnice krysí, *Hymenolepis diminuta*, je opravdu schopná ovlivnit aktivitu některých biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevě hostitele. To může hrát roli v souvislosti s metabolismem léčiv i endogenních látek. Závěrem lze konstatovat, že výsledky této práce by mohly být použity i v případě studia a potenciálního uplatnění *Hymenolepis diminuta* v helmintoterapii.

7. ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit, jak přítomnost tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) ovlivní aktivitu vybraných biotransformačních a antioxidačních enzymů ve střevech potkana. Dílčí výsledky, které vedly k hlavnímu cíli, lze na závěr shrnout v následujících bodech:

- Mezihostitelé (brouci *Tenebrio molitor*) byli úspěšně nakaženi vajíčky tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) a po 12 dnech z nich byly odebrány cysticerkoidy (larvální stádia).
- Následná infekce potkanů (konečných hostitelů) byla úspěšná u všech 6 potkanů. Z toho lze usuzovat, že počet 12 cysticerkoidů použitých v této studii je adekvátní pro úspěšnou infekci potkanů (definitivních hostitelů). Ze získané střevní mukózy kontrolní i tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů byly připraveny subcelulární frakce, v nichž byla měřena specifická enzymatická aktivita.
- Z enzymů 1. fáze metabolismu bylo zjištěno, že *Hymenolepis diminuta* má vliv na specifickou enzymatickou aktivitu některé podrodiny či konkrétní isoformy cytochromu P450 (CYP1A1, CYP2C9, CYP2B, CYP3A). Z reduktas došlo ke změně aktivity u CBR1 či AKR1C9. Ovlivnění těchto enzymů může vést ke změnám metabolismu léčiv i eobiotických substrátů.
- Z enzymů 2. fáze metabolismu byl zjištěn signifikantní nárůst aktivity sulfotransferas (SULT) u tasemnicí ovlivněné skupiny potkanů. Toto zvýšení lze předpokládat i proto, že glukokortikoidy (vyplavované při stresové reakci, kterou může být i přítomnost parazita) jsou induktory SULT.
- Z antioxidačních enzymů došlo ve střevě potkanů ovlivněných *Hymenolepis diminuta* k nárůstu aktivity peroxidas a katalasy. Zvýšení aktivity těchto antioxidačních enzymů tak pravděpodobně souvisí se zvýšeným oxidačním stresem vyvolaným přítomností parazita *Hymenolepis diminuta*.

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
AKR	aldo-ketoreduktasa
BROD	benzyloxyresorufin-O-dearylasa
CBR	karbonylreduktasa
CYP	cytochrom P450
CYT	cytosol
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DTB	5,5'-dinitrobenzoová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylasa
FMO	flavinová monooxygenasa
GPx	glutathion peroxidasa
GR	glutathion reduktasa
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
<i>H. d.</i>	<i>Hymenolepis diminuta</i>
IL	interleukin
MFC	7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin
MIK	mikrosomy
MIK K	mikrosomy kontrolní skupiny
MIK Tas	mikrosomy potkanů ovlivněných tasemnicí <i>H. d.</i>
MROD	methoxyresorufin-O-demethylasa
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAP	3'-fosfoadenosin-5'-fosfát
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
p-NF	p-nitrofenol

pNFS	p-nitrofenylsulfát
PROD	pentoxyresorufin-O-dealkylasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
TB	thiobenzamid
TBSO	S-oxid thiobenzamidu
TCA	trichloroctová kyselina
Th	pomocné lymfocyty
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrxR	thioredoxinreduktasa
UDP-GA	UDP-glukuronová kyselina
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
<i>var.</i>	<i>varietas</i>

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Monografie:

Arai H. P. (1980): Biology of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, 1. vydání, Academic Press, New York.

Bureš J., Horáček J., & Malý J. (2014): Vnitřní lékařství, 2. vydání, Galén, Praha.

Dostálek M., Juřica J., Janoščíková E., & Zahradníková L. (2006): Farmakokinetika, 1. vydání, Grada, Praha.

Garcia L. S. (2007): Diagnostic medical parasitology, 5. vydání, ASM Press, Washington.

Jíra J. (1998). Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci, 1. vydání, Galén, Praha.

Martínková J., Chládek J., Mičuda S., & Chládková J. (2007): Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, 1. vydání, Grada, Praha.

Skálová L., Boušová I., Machala M., Pávek P., Podlipná R., Souček P., Szotáková B., Vondráček J., & Wsól V. (2011): Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, 1. vydání, Karolinum, Praha.

Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., & Votýpka J. (2007): Paraziti a jejich biologie, 1. vydání, Triton, Praha.

Časopisy:

Ahmad F.A., Ngui R., Ong J., Sarip F., Hafiz W., Ismal W., Omar H., Nor Z. M., Amir A., Lim Y. A. L., & Mahmud R. (2017): A symptomatic case of *Hymenolepis diminuta* infection in an urban-dwelling adult in Malaysia, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(1), 163–165.

Al-Quraishy S., Gewik M. M., & Abdel-Baki A. A. S. (2014): The intestinal cestode *Hymenolepis diminuta* as a lead sink for its rat host in the industrial areas of Riyadh, Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(4), 387–390.

Andreassen J., Bennet-Jenkis E. M., & Bryant C. (1999): Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*, *Advances in Parasitology*, 42, 223–275.

Barski O. A., Tipparaju S. M., & Bhatnagar A. (2008): The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metabolism Reviews*, 40, 553–624.

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.

Bolla R. I., & Roberts L. S. (1971): Developmental physiology of cestodes: cytological characteristics of the germinative region of *Hymenolepis diminuta*, *Journal of Parasitology*, 57, 267–277.

Bonilla M., Denicola A., Novoselov S. V., Turanov A., Protasio A., Izmedi D., Gladyshev V. N., & Salinas G. (2008): Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 898–907.

Carlberg I., & Mannervick B. (1985): Glutathion reductase, *Methods in Enzymology*, 113, 484–490.

Cashman J. R., & Hanzlik R. P. (1981): Microsomal oxidation of thiobenzamid. A photometric assay for the flavine-containing monooxygenase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 98, 147–153.

- Croese J. A.** (2006): A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors, *Gut*, 55(1), 136–137.
- Cvilink V., Lamka J., Skálová L.** (2009): Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths, *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 8–26.
- Djordjevic V. B.** (2004): Free radicals in cell biology, *International Review of Cytology Volume*, 237, 57–89.
- Fleming J. O., & Weinstock J. V.** (2015): Clinical trials of helminth therapy in autoimmune diseases: rationale and findings, *Parasite Immunology*, 37(6), 277–292.
- Flockhart D. A., & Desta Z.** (2009): Pharmacogenetics of drug metabolism. in clinical and translational science, *Clinical Pharmacology*, 17, 301–317.
- Flohé L., & Günzler W. A.** (1984): Assays of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114–121.
- Forrest G. L., & Gonzalez B.** (2000): Carbonyl reductase, *Chemico-Biological Interactions*, 129(1–2), 21–40.
- Frame L. T., Ozawa S. A., Nowell S. A., Chou H. C., DeLongchamp R. R., Doerge D. R., Lang N. P., & Kaldubar F. F.** (2000): A simple colorimetric assay for phenotyping the major human thermostable phenol sulfotransferase (SULT1A1) using platelet cytosols, *Drug Metabolism and Disposition*, 28(9), 1063–1068.
- Gamage N., Bernett A., Hempel N., Duggleby R. G., Windmill K. F., Martin L. J., & Manus M. E.** (2006): Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism, *Toxicological Sciences*, 90(1), 5–22.
- Gazi U., & Taylan O. A.** (2017): Helminthotherapy, *Flora Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology*, 22(3), 91–106.

- Goodchild C. G., & Harrison D. L.** (1961): The growth of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta* during the first five days in the final host, *Journal of Parasitology*, 47 (5), 819–829.
- Góth L.** (2003): A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clinica Chemica Acta*, 196, 143–152.
- Gwatkin, D. R., Guillot, M., & Heuveline, P.** (1999): The burden of disease among the global poor, *Lancet*, 354(9178), 586–589.
- Hara A., Endo S., Matsunaga T., El-Kabbani O., Miura T., Nishinaka T., & Terada T.** (2017): Human carbonyl reductase 1 participating in intestinal first-pass drug metabolism is inhibited by fatty acids and acyl-CoAs, *Biochemical Pharmacology*, 138, 185–192.
- Hartenstein V., & Jones M.** (2003): The embryonic development of the bodywall and nervous system of the cestode flatworm *Hymenolepis diminuta*, *Cell and Tissue Research*, 311(3), 427–435.
- Hawari Y. A., Favia E., Pilka S., Kisiela M., Oppermann U., Martin H. J., & Maser E.** (2009): Analysis of the substrate-binding site of human carbonyl reductases CBR1 and CBR3 by site-directed mutagenesis, *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3), 234-241.
- Helmbly H.** (2015): Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand?, *Biomedical Immunology*, 16(1), 12–16.
- Hernandez J. R., Leung G., & McKay D. M.** (2013): Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases, *International Journal for Parasitology*, 43, 233–243.
- Hesselberg C. A., & Andreassen J.** (1975): Some influences of population density on *Hymenolepis diminuta* in rats, *Parasitology*, 71, 517–523.

Heylen M., Ruysers N. E., Gielis E. M., Vanhomwegen E., Pelckmans P. A., Moreels T. G., Man J. G., & Winter B. Y. (2014): Of worms, mice and man: an overview of experimental and clinical helminth-based therapy for inflammatory bowel disease, *Pharmacology & Therapeutics*, 143(2), 153–167.

Hines R. (2007): Phase I biotransformation reactions-flavin monooxygenase, *The Comprehensive Pharmacology Reference*, 10(1), 1–11.

Holeček V., Racek J., & Rokyta R. (2004): Thioredoxinreduktasa – významný antioxidant, *Klinická biochemie a metabolismus*, 12(4), 211–214.

Hollman A., Tchounwou P., & Huang H. (2016): The association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with SNP variants, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4), 379–385.

Hopkins, C., Subramanian, G., & Stallard, H. (1972): The development of *Hymenolepis diminuta* in primary and secondary infections in mice, *Parasitology*, 64(3), 401–412.

Hunter M. M., Wang A., Hirota C. L., & McKay D. M. (2005): Neutralizing anti-IL-10 antibody blocks the protective effect of tapeworm infection in a murine model of chemically induced colitis, *The Journal of Immunology*, 174, 7368–7375.

Hurd H., & Fogo S. (1991): Changes induced by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in the behaviour of the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Canadian Journal of Zoology*, 69(9), 2291–2294.

Chai J. Y. (2013): Praziquantel treatment in *Trematode* and *Cestode* Infections: An Update, *Infection & Chemotherapy*, 45(1), 32–43.

- Chiumiento L., & Brushi F.** (2009): Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites, *Parasitology Research*, 105(3), 593–603.
- Jakoby W. B., & Ziegler D. M.** (1990): The enzymes of detoxication, *Journal of Biological Chemistry*, 265(34), 715–718.
- Josephy D. P., Guengerich P., & Miners J. O.** (2008): Phase I and phase II of drug metabolism: terminology that we should phase out?, *Drug Metabolism Reviews*, 37(4), 575–580.
- Kawamura M., Eisenhofer G., Kopin I. J., Kador P. F., Lee Y. S., Tsai J. Y., Fujisawa S., Lizak M. J., Sinz A., & Sato S.** (1999): Aldose reductase, a key enzyme in the oxidative deamination of norepinephrine in rats, *Biochemical Pharmacology*, 58, 517–524.
- Kelsoe G. H., Ubelaker J.E., & Allison V.F.** (1977): The fine structure of spermatogenesis in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) with a description of the mature spermatozoon. *Parasitology Research*, 54, 175–187.
- Kilincel Ö., Öztürk C. E., Gün E., Öksüz S., Uzun H., Şahin I., & Kilic N.** (2015): A rare case of *Hymenolepis diminuta* infection in a small child, *Mikrobiyoloji Bulteni*, 49(1), 135–138.
- Kosik-Bogacka D. I., Baranowska-Bosiacka I., Nocen I., Jakubowska K., & Chlubek D.** (2011): *Hymenolepis diminuta*: activity of anti-oxidant enzymes in different parts of rat gastrointestinal tract, *Experimental Parasitology*, 128(3), 265–271.
- Kundu S., Roy S., & Lyndem L. M.** (2012): Cassia alata L: potential role as anthelmintic agent against *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology Research*, 111, 1187-1192.

Kuntz A. N., Davidoud-Charvet E., Sayed A., Califf L., Dessolin J., Arnér E. S. J., & Williams D. L. (2007): Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target, *Plos Medicine*, 4, 206–215.

Letelier M. E., Pimentel A., Pino P., Lepe A. M., Fúndez M., Aracena P., & Speisky H. (2005): Microsomal UDP-glucuronyltransferase in rat liver: oxidative activation, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96 (6), 480–486.

Linster C. L., & Van Schaftingen E. (2007): Vitamin C. biosynthesis, recycling and degradation in mammals, *The Febs Journal*, 274, 1–22.

Lukeš J., Kuchta R., Scholz T., & Pomajbíková K. (2014): (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present, *Trends in Parasitology*, 30(8), 377–385.

Martignoni M., Groothuis G. M., & Kanter R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2(6), 875–89.

Maser E., & Opperman U. C. (1997): Role of type-11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in detoxification processes, *European Journal of Biochemistry*, 24, 365–369.

Maté L., Virkel G., Lifschitz A., Ballent M., & Lanusse C. (2008): Hepatic and extrahepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep, *Biochemical Pharmacology*, 76, 773–783.

Matsunaga T., Shintani S., & Hara A. (2006): Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21, 1–18.

McKay D. M. (2010): The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology*, 137, 385–394.

- Molaei R. A., Ghourcian H., Moosavi-Movahedi A. A., Hong J., & Nazari K.** (2007): Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrokatechol-aniline coupling hydrogen donor, *Analytical Biochemistry*, 362, 38–43.
- Mustacich D., & Powis G.** (2000): Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346(1), 1–8.
- Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., & Hara A.** (1995): Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochemical Pharmacology*, 50, 221–227.
- Paine M. F., Heather L., Hart S., Ludington R., Haining L., Rettie A. E., & Darryl C. Z.** (2006): The human intestinal cytochrome p450 “pie“, *Drug Metabolism and Disposition*, 34 (5), 880–886.
- Penning T. M.** (2015): The aldo-keto reductases (AKRs): overview, *Chemico-Biological Interactions*, 234, 236–246.
- Persaud R., Wang A., Reardon C., & Mckay D. M.** (2007): Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the nonpermissive mouse host, *International Journal for Parasitology*, 37, 393–403.
- Petanová J.** (2007): Vliv prostředí na imunitní systém, *Medicína pro praxi*, 4 (6), 256–258.
- Price R. J., Surry D., Renwick A. B., Meneses-Lorente G., Lake B. G., & Evans D. C.** (2000): CYP isoform induction screening in 96 - well plates: use of 7 -benzyloxy- 4 -trifluoromethylcoumarin as a substrate for studies with rat hepatocytes. *Xenobiotica*, 30, 781–795.
- Racek J., & Holeček V.** (1999): Enzymy a volné radikály, *Chemické listy*, 93(1), 774–780.

Read C. P. (2000): The “crowding effect” in tapeworm infections, *Journal of Parasitology*, 86(2), 206–208.

Robb T., & Reid M. L. (1996): Parasite-induced changes in the behaviour of cestode-infected beetles: adaptation or simple pathology?, *Canadian Journal of Zoology*, 74(7), 1268–1274.

Rodrigues J.A., Acosta S. A., Aebi M., Ferguson M. A. J., Routier F.H., & Schiller I. (2015): Parasite glycobiology: a bittersweet symphony, *Plos Pathogens*, 11(11), 288–308.

Rook G. A. W. (2010): 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Darwinian medicine and the ‘hygiene’ or ‘old friends’ hypothesis. *Clinical & Experimental Immunology*, 160, 70–79.

Rozario T., & Newmark P.A. (2015): A confocal microscopy-based atlas of tissue architecture in the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Experimental Parasitology*, 158, 31–41.

Runge-Morris M., & Kocarek T. (2005): Regulation of sulfotransferases by xenobiotic receptors, *Current Drug Metabolism*, 6(4), 299–307.

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., & Dowd C. A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochemical Journal*, 360, 1–16.

Siew N.G., Shi H. Y., & Hamidi N. (2017): Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies, *The Lancet*, 390, 2769–2778.

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., & Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85.

- Smyth K., Morton C., Mathew A., Karuturi S., Haley C., Zhang M., & Parker, W.** (2017): Production and use of *Hymenolepis diminuta* cysticercoids as anti-inflammatory therapeutics, *Journal of Clinical Medicine*, 6(10), 98–105.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., & Frei, E.** (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chemické listy*, 93, 229–237.
- Stradowski M.** (1994): Effects of inbreeding in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Acta Parasitologica*, 39, 146–149.
- Strachan D. P.** (1989): Household size, hay fever, hygiene, and household size, *British Medical Journal*, 299, 1259–60.
- Ubelaker J. E., Allison V. F., & Specian R. D.** (1973): Surface topography of *Hymenolepis diminuta* by scanning electron microscopy, *The Journal of Parasitology*, 59(4), 667–678.
- Voge M.** (1956): Studies on the life history of *Hymenolepis citelli*, *Cestoda: Cyclophyllidea*, *The Journal of Parasitology*, 42(5), 485.
- Warr E., Meredith J. M., Nimmo D. D., Basu S., Hurd H., & Eggleston, P.** (2006): A tapeworm molecule manipulates vitellogenin expression in the beetle *Tenebrio molitor*. *Insect Molecular Biology*, 15(4), 497–505.
- Weinstock J. V., & Elliott D. E.** (2009): Helminths and the IBD hygiene hypothesis, *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(1), 128–133.
- Weinstock J. V., & Elliott, D. E.** (2014): Helminth infections decrease host susceptibility to immune-mediated diseases, *The Journal of Immunology*, 193, 3239–3247.
- Wiwanitkit V.** (2004): Overview of *Hymenolepis diminuta* infection among thai patients, *Medscape General Medicine*, 6(2), 7–14.

Wolff M. J., Mara J. B., & P'ng L. (2012): Helminthic therapy: improving mucosal barrier function, *Trends in Parasitology*, 28(5), 187–194.

Wsól V., Szotáková B., Martin H., & Maser E. (2007): Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man, *Toxicology*, 238(2-3), 111–118.

Xie W., Racz G., Terry B., & Gardner S. (2017): A method for measuring the attachment strength of the cestode *Hymenolepis diminuta* to the rat intestine, *Journal of Helminthology*, 91(6), 762–766.

Yang Y. S., Marshall A. D., McPhie P., Guo W. X., Xie X., Chen X., & Jakoby W. B. (1996): Two phenol sulfotransferase species from one cDNA: nature of the differences. *Protein Expression and Purification*, 8 (4), 423–429.

Ye L., & Zhang Q. Y. (2001): Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes, *Carcinogenesis*, 22, 1987–1992.

Zámocký M. (1998): Spektroskopické a enzymologické vlastnosti kvasinkovej peroxidázovej katalázy, *Chemické listy*, 92, 875–882.

Zhang Q. Y., Wikoff J., Dunbar D., Fasco M., & Kaminsky L. (1997): Regulation of cytochrome P450 1A1 expression in rat small intestine, *Drug Metabolism and Disposition*, 25 (1), 21–26.

Internetové zdroje:

3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase, Uniprot [on-line databáze], [cit. 2018-06-28].
Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P23457>

Dewey S. (2001): *Hymenolepis diminuta*, Animal Diversity Web [on-line], [cit. 2018-07-08]. Dostupné z: http://animaldiversity.org/accounts/Hymenolepis_diminuta

Difference Between Crohn's and Ulcerative Colitis, Sehat [on-line], [cit. 2018-07-11].
Dostupné z: <https://www.sehat.com/difference-between-crohns-and-ulcerative-colitis>

Hymenolepiasis, Standford University [on-line], [cit. 2018-07-01]. Dostupné z:
<https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2002/hymenolepsis/transmission.htm>

Zima T. (2003): Antioxidační ochrana organismu, Edukafarm [on-line], [cit. 2018-07-02]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/c160-antioxidacni-ochrana-organismu>