

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Charakterizace lipolytických aktivit ve střevě klíštěte *Ixodes
ricinus***

Bakalářská práce

Ondřej Kousal

Školitelka: RNDr. Tereza Kozelková

Školitel specialista: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

České Budějovice 2024

Bakalářská práce

Kousal O., 2024: Charakterizace lipolytických aktivit ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus*. [Characterization of lipolytic activities in the gut of tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Lipids are essential substances in the life of ticks. They are a crucial source of energy used in various physiological processes or even play an important role in the development and transmission of a wide range of pathogens. This work deals with the characterization of the lipolytic system in the midgut of the hard tick *Ixodes ricinus*. Using a fluorescent substrate, the lipolytic activity of ticks was measured during feeding on their host. The lipolytic activity reaches its maximum on the third and fifth day of feeding on the host. In fully-fed stage and after detachment, the activity decreased rapidly. Further investigations of the lipolytic system of ticks were carried out with commercially available lipase inhibitors.

Tato práce byla financována z grantu – *GACR 21-08826S (PI: Petr Kopáček)*

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích,

dne: 9.4. 2024

Podpis studenta

Poděkování:

Děkuji své školitelce doktorce Tereze Kozelkové za vedení mé bakalářské práce, za její nesmírnou trpělivost, čas, který mi věnuje a ochotu, se kterou mi v laboratoři i nadále pomáhá. Dále bych chtěl poděkovat doktoru Petru Kopáčkovi za přijetí do jeho výzkumného týmu, cenné rady a odbornou korekci této práce. Děkuji i celému kolektivu laboratoře za neustálou přátelskou atmosféru a ochotu pomáhat mi každého z nich. V neposlední řadě bych chtěl obzvlášť poděkovat mé rodině a přátelům za jejich motivaci a neustálou psychickou podporu při studiu i v osobním životě. Moc všem děkuji.

Seznam použitých zkratek

MUF	4-methylumbelliferyl oleát
DMF	dimethylformamid
ORL	Orlistat
LAL	Lalistat
BAPTA	1,2-bis(<i>o</i> -aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
URB	URB597 – inhibitor hydrolázy amidů mastných kyselin
PZ	PF-06424439 – inhibitor acyltransferáz
VAR	Varespladib
CAY	CAY10499 – neselektivní inhibitor lipáz
RT	pokožová teplota
RFU/min	relativní fluorescenční jednotky za minutu
RFU/min/μg	relativní fluorescenční jednotky za minutu na μg proteinu v reakci
RFU/min (10-30)	relativní fluorescenční jednotky za minutu v časovém úseku reakce 10-30 minut
SD	směrodatná odchylka
B max	maximální lipolytická aktivita homogenátu/enzymu bez (přidaného inhibitoru)
B bez enzymu	kontrola (inhibitor + pufr) bez přidaného homogenátu/enzymu
DGAT	diacylglycerol acyltransferáza

Obsah

1. Úvod	- 1 -
1.1. Klíšťata.....	- 1 -
1.2. Argasidae (klíšťákovití)	- 1 -
1.3. Ixodidae (klíšťatovití)	- 1 -
1.3.1. Trávicí aparát	- 2 -
1.4. Klíšťe obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	- 3 -
1.4.1. Životní cyklus.....	- 3 -
1.4.2. Kontakt s hostitelem a sání krve	- 4 -
1.4.3. Trávení hostitelské krve	- 5 -
1.5. Lipidy	- 6 -
1.6. Lipázy.....	- 6 -
1.7. Lipidy a lipolytický systém bezobratlých	- 7 -
1.8. Lipidy a lipolytický systém klíšťat.....	- 8 -
1.8.1. Lipolytický systém klíšťete <i>I. ricinus</i>	- 9 -
2. Cíle bakalářské práce	- 10 -
3. Materiály a metody	- 11 -
3.1. Sběr klíšťat a pokusná zvířata	- 11 -
3.2. Pitva střevní tkáně	- 11 -
3.3. Homogenizace střevní tkáně	- 11 -
3.4. Stanovení koncentrace proteinů Bradford metodou	- 12 -
3.5. Fluorescenční měření lipolytických aktivit v průběhu sání klíšťete	- 12 -
3.5.1. Ověření komerčně dostupných inhibitorů	- 14 -
3.5.2. Měření lipolytických aktivit za použití komerčně dostupných inhibitorů.....	- 15 -
3.6. Vyhodnocení výsledků.....	- 15 -
4. Výsledky	- 16 -
4.1. Optimalizace aktivitních esejí	- 16 -
4.2. Měření lipolytických aktivit klíšťat v různých časových bodech sání	- 17 -
4.3. Použití komerčně dostupných inhibitorů.....	- 17 -
4.3.1. Inkubace homogenátu s inhibitorem	- 18 -
4.3.2. Inhibice lipáz přítomných ve střevní tkáni	- 19 -
4.3.3. Stanovení hodnoty IC50.....	- 22 -
4.3.4. Souhrnné měření použitých inhibitorů	- 22 -
5. Diskuze	- 24 -
6. Závěr	- 27 -
7. Seznam referencí	- 28 -
8. Příloha	- 33 -

1. Úvod

1.1. Klíšťata

Klíšťata patří mezi ektoparazity, živící se krví svého hostitele. Hned po komárech jsou nejčastějšími vektory široké škály patogenů, mezi které patří viry, bakterie, prvoci či helminti (de la Fuente et al., 2008). Ty jsou původci život ohrožujících onemocnění, jako je například Lymeská borelióza či klíšťová encefalitida, která postihují člověka i ostatní obratlovce.

Klíšťata se taxonomicky dělí do 3 čeledí – Argasidae (také nazývána jako “soft ticks“, která čítá 193 druhů), Ixodidae (“hard ticks“, 702 druhů) a Nuttalliellidae (pouze jeden druh – je tedy monotypickou skupinou). Dohromady existuje okolo 900 jednotlivých druhů klíšťat (Guglielmone et al., 2010). Tento počet se však může dle individuálních publikací lišit (Guglielmone et al., 2010; Horak et al., 2002). Jednotlivé čeledi se vyvinuly nezávisle na sobě. O tom vypovídá například jejich odlišná stavba těla, slinných žláz, ale i rozdíly ve stravovacích návycích (Mans, 2011).

1.2. Argasidae (klíšťákovití)

Sací ústrojí této čeledi se nachází na spodní straně těla a v porovnání s čeledí Ixodidae je výrazně menší velikosti. Povrch těla je kožovitý a na rozdíl od Ixodidae, hřbetní štítek (scutum) zde není přítomen (Boulanger et al., 2019). Larva je jediným stádiem, které má scutum alespoň částečně vyvinuté (Klompen, 1992). Právě jeho nepřítomnost umožňuje snadnější rozpínání těla a tím i rychlejší příjem hostitelské krve. K plnému nasátí dochází během pár hodin a krev sají samci i samice (Sonenshine and Roe, 2014; Boulanger et al., 2019).

Rozdílná je i délka životního cyklu, která může být oproti čeledi Ixodidae více než 6x delší. Důvodem je přítomnost většího počtu vývojových stupňů u nymf, který se pohybuje v rozmezí 2-8 v závislosti na druhu klíšťe (Sonenshine and Roe, 2014).

1.3. Ixodidae (klíšťatovití)

Tělo klíšťat je rozděleno na 3 části: capitulum (ústní ústrojí), idiosoma (tělo) a 4 páry končetin (Sonenshine and Roe, 2014). Sací ústní ústrojí čeledi Ixodidae se nachází před hlavou a dosahuje poměrně značné velikosti (zejména u rodu *Ixodes*). Dorzální část nese segmentovaného těla kryje tvrdé scutum, které je pro čeleď Ixodidae typické. U dospělých samic zaujímá pouze 1/3 těla, což jim umožňuje i několikanásobné zvětšení tělního objemu v průběhu sání. Samcům pokrývá scutum celé tělo, protože hostitelskou krev nesají

(Boulanger et al., 2019). Samice jsou schopny dosáhnout plného nasátí během několika dnů až týdnů. Končetiny jsou složeny ze 6 segmentů. Na koncích prvního páru končetin se nachází Hallerův orgán, pomáhající v hledání hostitele (Sonenshine and Roe, 2014).

1.3.1. Trávicí aparát

Trávicí aparát čeledi Ixodidae se skládá z perorálního kanálu a střeva, které je rozděleno na tři úseky: přední část (“foregut“), střední část (“midgut“) a zadní část (“hindgut“). Střevo nenasátého klíštěte je poměrně úzké, během krmení se však značně rozšiřuje. Největší částí je “midgut“, jenž je i největším orgánem celého těla. V těle je uloženo ventrálně, a větví se zde v početná ramena. Právě ta se v období sání výrazně zvětší a vyplní tak většinu tělní dutiny. “Midgut“ slouží nejen k trávení a vstřebávání hostitelské krve, ale také k jejímu skladování (Sonenshine and Roe, 2014).

Stěna orgánu je tvořena epitelem s vnější tenkou vrstvou svaloviny. Epitel se skládá především ze dvou typů buněk: nediferenciovaných a trávicích. Po započetí sání však dochází k rozsáhlým změnám v její struktuře. Nediferenciované buňky proliferují a přeměňují se v buňky trávicí nebo sekreční. Trávicí buňky obsahují velké množství endozomů. V bazálních částech buňky se začínají tvořit tzv. “lipid droplets“, které slouží jako zásobárna nově syntetizovaných lipidů. Trávicí buňky naplněné hematinem (kondenzovaný hem uvolněný z hemoglobinu) se uvolňují ze střevní stěny a volně se pohybují v oblasti lumenu (Sonenshine and Roe, 2014).

“Midgut“ pokračuje v “hindgut“, který ústí jako rektální sáček s rektem uloženými na dorsální straně těla. Jím jsou odváděny odpadní látky, nestrávené zbytky potravy či úlomky odumřelých buněk (Sonenshine and Roe, 2014).

1.4. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Ixodes ricinus patří mezi klopítkatce řádu Ixodida (klíšťákovci), čeledi Ixodidae (klíšťatovití) a rodu *Ixodes*. Řadí se mezi nejzkoumanější druhy klíšťat a je nejzastoupenějším druhem nejen v České republice, ale i v celé střední Evropě (Gray et al., 2021).

Klíště obecné obývá listnaté a smíšené lesy (jen zřídka kdy lesy jehličnaté) se značnou vrstvou lesní podestýlky a spadaného listí. Vyskytuje se také například na vřesovištích, pastvinách či v městských parcích (Zajac et al., 2021). Samotný výskyt však ovlivňuje kromě lokality také několik dalších faktorů, mezi které patří teplota, klima, počet hostitelů, které mohou klíšťata na daném území napadat, nebo již zmíněná vlhkost. Právě vlhkost je pro výskyt nadevše důležitá, vzhledem k jejich velké náchylnosti ke ztrátě vody. Z tohoto důvodu hrají velkou roli ve výskytu také stromy, jako jsou například duby či buky, jejichž spadané listí dokáže zadržet vlhkost i po velice dlouhou dobu (Gray et al., 2021; Kahl and Gray, 2023).

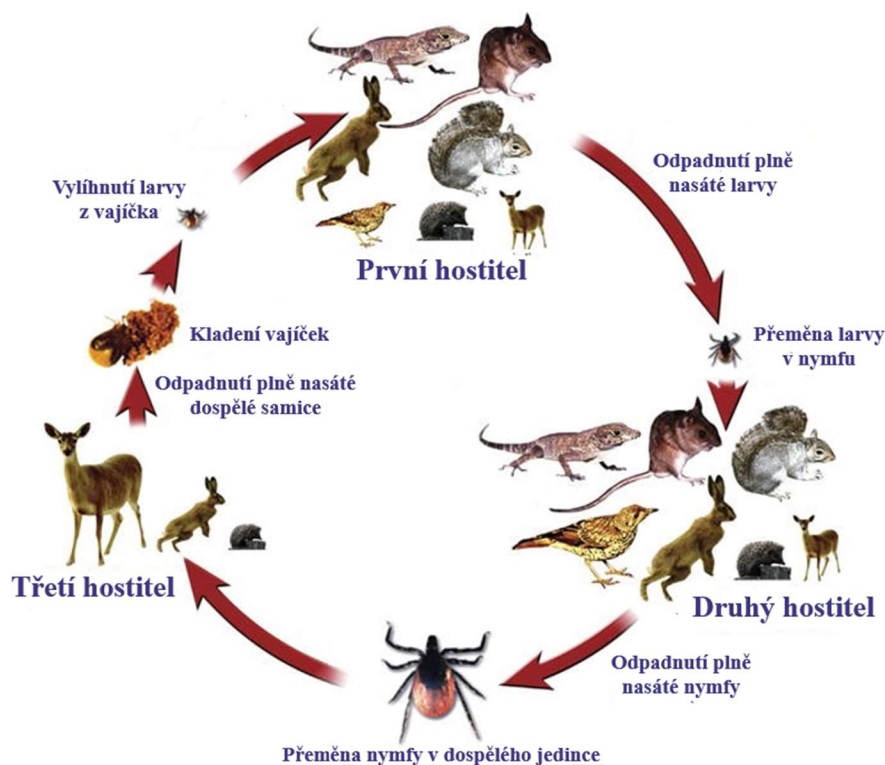
Specifita hostitele je u tohoto druhu klíštěte velice nízká, což dokazuje fakt, že *I. ricinus* napadá více než 300 jednotlivých druhů obratlovců. Mezi nejdůležitější hostitele však jednoznačně patří sudokopytníci, kteří jsou zejména pro dospělé jedince nemálo důležití. Na výběru hostitele pak mají vliv spíše některé nesespecifické stimuly, jako jsou například lokální gradient oxidu uhličitého či vibrace způsobené samotnými hostiteli (Gray et al., 2021).

1.4.1. Životní cyklus

Klíště obecné je typické tří-hostitelské klíště. Během svého života každý jedinec prochází třemi vývojovými stádii. Těmi jsou larva, nymfa a dospělý jedinec. Nymfy a dospělí jedinci mají 4 páry nohou, na rozdíl od larev, které mají páry nohou pouze 3. Larva volí za svého hostitele primárně malé savce. Nymfa dává přednost plazům, ptákům a středně velkým savcům. Dospělý jedinec parazituje na středně velkých a velkých savcích (Gray et al., 2021).

Po plném nasátí se krví každého ze stádií dochází k odpadnutí z hostitele. Následuje ekdyse, po které si nově vzniklé vývojové stádium hledá dalšího hostitele. Vývoj končí po odpadnutí dospělé, plně nasáté oplozené samičky, která následně naklade až tisíce vajíček a záhy umírá. Samci rodu *Ixodes* krev nesají vůbec, kdežto samci ostatních “hard ticks“ v malé míře sát mohou. Jejich úkolem je především oplození samice (Boulanger et al., 2019). Celý životní cyklus trvá přibližně 4-6 let (na jižní polokouli dokonce jen okolo 2-3 let). Fáze sání hostitelské krve přesto tvoří jen okolo 1 % z celého životního cyklu, což odpovídá asi 2-3

týdnům (Kahl and Gray, 2023). Celý životní cyklus klíštěte *I. ricinus* je znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1: Životní cyklus klíštěte *I. ricinus* (převzato, upraveno a přeloženo do češtiny z Gray et al., 2016)

1.4.2. Kontakt s hostitelem a sání krve

Hematofágní způsob života se u roztočů vyvinul před méně než 100 miliony let (Mans, 2011). *I. ricinus* na svého hostitele čeká na vrcholcích trav či větví malých stromků ve výšce do jednoho metru se vztyčeným předním párem nohou. K nalézání hostitele je dobře uzpůsoben specializací některých orgánů, jako je například senzoričský Hallerův orgán na předních končetinách, pomocí něhož snímá vlhkost a koncentraci oxidu uhličitého v okolí, či četné množství chloupků a štětin. Ve chvíli, kdy se hostitel přiblíží k dosahu, klíště se přichytí a hledá teplé a vlhké místo na pokožce. Poté, pomocí svého sacího ústního aparátu, pronikne pokožkou hostitele a pevně se k němu přichytí. Během sání, samice dokáže pozřít množství krve, které odpovídá až stonásobku její hmotnosti v nenasátém stavu (Boulanger et al., 2019).

Ústní ústrojí (capitulum) se skládá z hypostomu, párových chelic a pedipalpů. Hypostom je ventrálním prodloužením hlavičky. Nechtěnému uvolnění se z hostitele zabraňuje četné množství trnů, nacházejících se na jeho ventrální straně. Párové chelicery slouží zejména k prořezání pokožky až k dermis. Dorzální a ventrální části hypostomu společně tvoří prostor, kterým protéká krev přímo do pharynxu. Tímto kanálem jsou také

vyměšovány sliny, jejichž sekrece se pravidelně střídá se sáním krve. Sliny obsahují látky, které potlačují hemostatické procesy, tlumí bolest a svědění místa přichycení parazita nebo zprostředkovávají pevnější přichycení a přilnutí sajícího aparátu k hostiteli produkcí cementu (Vancová et al., 2020).

Proces sání se skládá ze 3 fází: “attachment“ (přichycení se k hostiteli), “slow-feeding phase“ (fáze pomalého sání) a “rapid engorgement“ (rychlé sání). Celý proces trvá přibližně 8 dní - “slow-feeding phase“ (1. - 6. den), “rapid engorgement“ (6. – 8. den) (Horn et al., 2009). Během přichycení a pomalé fáze sání samice klíštěte proniká svým ústním ústrojím pokožkou hostitele, produkuje cement a pevně se k němu přichytí. Dále připravuje střevo a jeho architektiku na zvýšený přísun krve a začne pomalu sát. Po předchozím oplodnění nebo oplodnění v průběhu sání následuje rychlé sání, při kterém samice přijímá zvýšené množství krve (Sonenshine and Roe, 2014).

1.4.3. Trávení hostitelské krve

Pro *I. ricinus* je hostitelská krev jediným zdrojem živin. Hlavními proteinovými složkami krve jsou albumin a hemoglobin, který je uvolněn z erytrocytů prostřednictvím enzymově katalyzované hemolýzy. Uvolněný hemoglobin je následně transportován do lumenu střeva, kde může tvořit drobné krystalky, a pohlcen diferenciovanými trávicími buňkami. Uvnitř se nacházejí lysozomy (obsahující aktivní hemoglobinázy), které fúzí s endozomy (obsahující hemoglobin) za vzniku kyselého endozomálního trávicího váčku. V něm dochází k proteolytickému štěpení hemoglobinu (Sojka et al., 2013).

Samotné štěpení hemoglobinu probíhá v jednotlivých, na sobě navazujících fázích. Nejprve je hemoglobin štěpen na velké fragmenty globinu (o délce přibližně 8 – 11 kDa), následně je štěpen na menší fragmenty (2 – 7 kDa) a v poslední fázi dochází k degradaci těchto fragmentů na dipeptidy a volné aminokyseliny. Každá z těchto fází je zprostředkována různými druhy enzymů (některé enzymy jsou pro jednotlivé fáze stejné) (Sojka et al., 2013; Horn et al., 2009). Volné aminokyseliny následně putují do cytoplazmy, kde setrvávají až do jejich využití (Sojka et al., 2013). Celý proces je doprovázen detoxifikací uvolněného hemu v hemozomech (Horn et al., 2009).

Trávení krve je zprostředkováno několika endopeptidázami zejména aspartové a cysteinové třídy. Jejich funkce a obecně degradace hemoglobinu probíhá v kyselém pH v rozmezí 3,5 – 4,5. Toto pH zároveň odpovídá prostředí endozomálních trávicích váčků. Během rané fáze sání (1. - 4. den) je hemoglobinolytická aktivita nízká (období tzv. “lag phase“). Ke konci pomalé fáze sání (4. – 6. den) dochází k jejímu prudkému nárůstu. Aktivita nadále roste během celé fáze “rapid engorgement“, která nastane na základě

předchozího oplodnění nebo oplodnění během sání. V této fázi trávení hemoglobinu dosahuje svého maxima. Celý proces je navíc regulovaný sáním hostitelské krve (Horn et al., 2009; Sojka et al., 2013).

1.5. Lipidy

Lipidy jsou rozmanitou skupinou přírodních látek typickou svým hydrofobním charakterem a nízkou rozpustností ve vodném prostředí. Diverzita jejich struktury je nejvyšší ze všech biomolekul. V organismech plní řadu životně důležitých, biologických ale i strukturních funkcí. Mezi ně patří zejména tvorba biomembrán, uchovávání energie a jejich účast v mnoha signálních drahách. Tvoří širokou škálu přírodních látek, jako jsou oleje, tuky, vitamíny a hormony (Voet et al., 2006).

Lipidy jsou klasifikovány zejména na základě jejich struktury a funkce. Podle stavby je můžeme dělit na lipidy jednoduché a složené. Někdy je uváděna také třetí skupina lipidů – lipidy odvozené (Fahy et al., 2011). Voet a kolektiv (Voet et al., 2006) dělí lipidy do 6 základních skupin: mastné kyseliny, triacylglyceroly, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroidy a ostatní lipidy.

Mastné kyseliny jsou základní složkou všech lipidů. Triacylglyceroly (také nazývané jako triglyceridy) tvoří tuky a oleje rostlin a živočichů. Představují tak významnou zásobárnu energie a jsou i nejzastoupenější skupinou lipidů zprostředkávající její uchovávání. K syntéze a ukládání triacylglycerolů dochází v adipocytech, tvořících tukovou tkáň. Glycerofosfolipidy, sfingolipidy a steroidy jsou hlavními složkami biomembrán. Glycerofosfolipidy (fosfoglycerolipidy) jsou charakteristické svou strukturou. Skládají se ze dvou částí: polární hlavičky a nepolárního konce (tzv. „ocas“). Sfingolipidy se účastní mnoha signálních drah. Steroidy jsou převážně eukaryotického původu – jsou tvořeny živočichy, rostlinami, ale i houbami. V organismu jsou důležité především pro jejich schopnost tvořit hormony (steroidní hormony). Mezi ostatní lipidy spadají zejména látky, které netvoří biomembrány, ale na základě svých vlastností jsou také klasifikovány jako lipidy. Mezi ně patří například izoprenoidy či eikosanoidy (Voet et al., 2006).

1.6. Lipázy

Lipázy jsou skupinou ve vodě nerozpustných enzymů katalyzující hydrolýzu esterů. Jedná se tedy o esterové hydrolázy (Lennarz and Lane, 2004). Mohou být také charakterizovány jako skupina enzymů katalyzující hydrolýzu triacylglycerolu. Ten se za jejich přítomnosti rozkládá na konečný produkt glycerol a mastné kyseliny. Tato reakce je reverzibilní a je základním mechanismem lipolýzy, prostřednictvím které získávají

živočiškové energii z tuků. Jsou tak důležité nejen pro metabolismus tuků ale i k udržení lipidové homeostázy (Lennarz and Lane, 2004).

Kvůli velkému počtu a obrovské diverzitě struktury lipidů existuje četné množství lipáz. Každá z nich má však odlišnou substrátovou specifitu. O té rozhoduje zejména aktivní místo lipáz. Obecně však lipázy vykazují preferenci k nepolárním, ve vodě nerozpustným esterovým substrátům (Lennarz and Lane, 2004).

Struktura lipáz je poměrně rozličná. Obecně jsou tvořeny zejména β skládanými listy, celou řadou α helixů a aktivním místem. Řada z nich má aktivní místo kryté takzvaným lipidickým víčkem. Lipázy mohou disponovat celou řadou lipidických víček, na druhou stranu nemusí mít žádné. Pro funkčnost lipáz je často nezbytně nutná jejich aktivace. Ta je zprostředkována pohybem lipidického víčka (nebo i několika víček). Aktivace může být i velice komplexní (Svendsen, 2000).

1.7. Lipidy a lipolytický systém bezobratlých

Řada fyziologických dějů hmyzu vyžaduje velké množství energie. Mezi ně patří svlékání, létání, oogeneze, či stresové situace jako jsou například hladovění či hypoxie. Kvůli jejich obrovským energetickým požadavkům je nutno energii skladovat. U hmyzu je energie skladována především v tukovém tělese, kde dochází k ukládání proteinů, glykogenu nebo právě k ukládání lipidů (zejména ve formě triacylglycerolu) (Azeez et al., 2014).

Tukové těleso je orgán rozšířený po celém těle a je v úzkém kontaktu s ostatními orgány těla hmyzu. Skládá se především z adipocytů, u hmyzu známých také jako trofocyty. Lipidy jsou ukládány v cytoplazmě těchto adipocytů, konkrétně ve strukturách známých jako lipidové kapénky ("lipid droplets") (Toprak et al., 2020).

Lipidové kapénky nehrají roli pouze v ukládání tuků. Podílejí se také na syntéze, transportu a degradaci lipidů, ale i na celkovém energetickém metabolismu. Co se týče jejich syntetické funkce, jsou schopny tvořit také proteiny a sacharidy. U hmyzu jsou jediným typem buněk s touto schopností (Toprak et al., 2020).

Z hlediska zpracovávání tuků má hmyz obecně dva mechanismy štěpení triacylglycerolu. Ty se liší v konečných produktech hydrolýzy. Triacylglycerol může být hydrolyzován buď na monoacylglycerol a mastné kyseliny, nebo na glycerol a mastné kyseliny. U hematofágů však převládá druhý způsob hydrolýzy (Gondim et al., 2018).

U hematofágního způsobu života se vyvinul vysoce aktivní metabolismus tuků, zejména kvůli období čekání na hostitele. Jejich lipolytický systém (a obecně i lipolytický systém hmyzu) je již poměrně dobře prozkoumán, obzvláště u několika jeho zástupců. Například u čeledi Reduviidae (konkrétně u zástupců *Panstrongylus megistus* a *Rhodnius prolixus*) bylo

zjištěno, že triacylglycerol je hydrolyzován v lumenu střeva. U stejných zástupců byla ve střevě také pozorována zvýšená lipolytická aktivita v prvních dnech sání krve (Gondim et al., 2018).

Jak již bylo zmíněno dříve, lipidy a jejich metabolismus nemálo ovlivňují mnohé energeticky náročné fyziologické procesy bezobratlých, jako je zejména oogeneze či létání. U komára *Aedes aegypti* bylo zjištěno, že při snižování zásob triacylglycerolu současně dochází k růstu oocytů (Gondim et al., 2018). Celá oogeneze je velmi závislá na zásobách lipidů. Lipidy tvoří 30-40 % sušiny hmyzího vajíčka a u komára *Culex quinquefasciatus* mohou lipidy představovat až 90 % energie poskytnuté pro vývoj embrya. U krevsající plošnice *R. prolixus* byla pozorována změna v lipidovém transportu při létání, kdy docházelo k poklesu lipidových zásob u ovarii, u létacích svalů byl však pozorován jejich nárůst. Při frekventovanějších letech tak dokonce docházelo i k poklesu kladení vajíček (Gondim et al., 2018).

1.8. Lipidy a lipolytický systém klíšťat

Klíšťata, podobně jako hmyz, skladují lipidy také ve formě lipidových kapének tukového tělesa. To se vyskytuje u larev, nymf i dospělých jedinců všech druhů. Není však vyvinuto do takové míry jako u hmyzu. Nachází se po celém těle ve spojení s tracheami v blízkosti vnitřních orgánů. Jeho velikost se zvětšuje během sání hostitelské krve (zejména u řádu Ixodida). Fyziologie a metabolismus tukového tělesa na rozdíl od hmyzu nejsou stále dostatečně prozkoumány (Sonenshine and Roe, 2014; Urbanová et al., 2024).

Lipidy u klíšťat neplní pouze roli uchovávání energie. Mohou hrát i významnou roli ve vývoji a přenosu patogenů. Celá řada patogenů vycytává lipidy hostitele a využívá je k replikaci, skrývání se před imunitním systémem či k tvorbě membrán. Například u bakterií rodu *Borrelia*, *Anaplasma* a *Ehrlichia* bylo prokázáno, že shromažďují cholesterol hostitele v jejich membránách (O'Neal et al., 2020). Tvorba membrán je důležitým krokem při proliferaci těchto mikrobů. Celá řada z nich však není schopna tvorby cholesterolu a dalších lipidů potřebných pro její tvorbu. Využívají tedy lipidů svého hostitele, mezi které spadají také klíšťata (O'Neal et al., 2020).

U hmyzu je hlavním lipidem triacylglycerol, který zaujímá až 90 % všech jejich lipidů. U klíštěte *Rhipicephalus microplus* však velké množství lipidů zaujímá také cholesterol. Tento objev naznačuje, že pro lepší pochopení lipolytického systému klíšťat, ale i členovců obecně je třeba další výzkum (Angelo et al., 2013).

1.8.1. Lipolytický systém klíštěte *I. ricinus*

Zatímco proteolytický systém a trávení bílkovin u klíštěte *I. ricinus* jsou poměrně dobře prozkoumány (Horn et al. 2009; Sojka et al., 2013; Sonenshine and Roe, 2014), o lipidech, jejich zpracování a celkově o metabolismu lipidů víme jen velice málo. Z lipidů obsahuje hostitelská krev zejména triacylglyceroly, fosfolipidy, estery cholesterolu a mastné kyseliny (Quehenberger and Dennis, 2011). Ty jsou, podobně jako u ostatních klíšťat, ukládány v tukových kapénkách tukového tělesa. Tukové kapénky se zde skládají zejména z perilipinů (= strukturní proteiny), triacylglycerolů a esterů cholesterolu obklopených fosfolipidy. Samotné tukové těleso však hraje roli také v imunitním systému tohoto druhu klíštěte. Společně s hemocyty totiž syntetizuje některé imunitní proteiny a peptidy působící proti infekcím a různým druhům patogenů (Urbanová et al., 2024).

U nymf klíštěte *I. ricinus* Kozelková a kolektiv identifikovali celkem 88 proteinů účastnících se metabolismu lipidů, mezi které spadá i četné množství lipáz. Jednalo se zejména o pankreatickou lipázu a sfingomyelin fosfodiesterázu (zastoupené pouze u nymf, které sáli dva dny na svém hostiteli), alfa/beta hydrolázu (zastoupenou jak u plně nasátých nymf, tak u nymf, které již odpadli ze svého hostitele) či několik isoform fosfolipázy B přítomných během celého průběhu sání (Kozelková et al., 2023). Co se týče lipolytického systému dospělého jedince, Perner a kolektiv pomocí RNA sekvenování střeva *I. ricinus* identifikovali četné množství lipáz různých tříd a druhů. Zjistili také, že v raných fázích sání hostitelské krve jsou ve střevním transkriptomu nejzastoupenější fosfolipáza A2, kyselá sfingomyeláza a lipáza pankreatického typu (Perner et al., 2016). Urbanová a kolektiv při studii transkriptomu tukového tělesa dospělého jedince odhalili některé další lipázy (zejména fosfolipázu B) a lipolytické enzymy dalších tříd (například lysofosfolipázu D či diacylglycerol lipázu- α) (Urbanová et al., 2024). Lipolytický systém klíšťat však nebyl doposud funkčně charakterizován, což je důvodem naší snahy v jeho zmapování.

2. Cíle bakalářské práce

- Základní testování lipolytických aktivit ve střevních homogenátech pomocí vhodného fluorescenčního substrátu
- Stanovení pH-optima lipolytických aktivit
- Stanovení lipolytické aktivity v průběhu sání a trávení hostitelské krve
- Charakterizace lipolytických enzymů pomocí specifických inhibitorů

3. Materiály a metody

3.1. Sběr klíšťat a pokusná zvířata

Dospělé samice klíštěte *I. ricinus* byly sbírány vlnkovací metodou. Sbírány byly v těchto lokalitách: Branišovský les u Českých Budějovic, okolí města Zliv, okolí obce Včelná, lesy města Písek. Sběr byl prováděn v rozmezí od jara do podzimu v letech 2022 a 2023. Se všemi laboratorními zvířaty bylo zacházeno v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. a etickým schválením č. 25/2018.

3.2. Pitva střevní tkáně

Střevní tkáň dospělých samic *I. ricinus* byla vypitvána za použití stereomikroskopu (Stemi DV4, ZEISS). Klíšťata byla pitvána v různých časových intervalech hladovění, sání a po odpadnutí z hostitele. Konkrétně se jednalo o nenasáté samice hladovějící po dobu jedenácti měsíců (UF 11 měsíců), nenasáté samice hladovějící po dobu jednoho měsíce (UF 1 měsíc), tři dny sající samice (3D), pět dní sající samice (5D), plně nasáté samice (FF), samice čtyři dny po odpadnutí z hostitele (4AD), samice šest dní po odpadnutí (6AD) a samice jedenáct dní po odpadnutí (11AD). Klíšťata sála na laboratorních morčatech. Pitvání střev bylo provedeno v přítomnosti 1x PBS. Střeva 3D, 5D, FF, 4AD, 6AD a 11AD samic byla následně promývána v 1x PBS a tím tak zbavena střevního obsahu. Vypitvaná střeva byla umístěna do 1,5 ml mikrozkuvek a skladována při -80°C .

3.3. Homogenizace střevní tkáně

Do mikrozkuvek obsahujících vypitvanou střevní tkáň bylo přidáno odpovídající množství vychlazeného pufru (0,1M-kyselina citronová + 0,2M- Na_2HPO_4 + 0,1 % Triton X-100, pH 4.0) podle Tabulky I. Střevní tkáň byla následně rozmělněna plastovým homogenizátorem a zmrazena v kapalném dusíku. Tento proces byl proveden celkem 3x. Plastový homogenizátor byl nad mikrozkuvkou opláchnut 100 μl pufru, abychom zamezili případné ztrátě vzorku. Tímto způsobem bylo tedy množství přidaného pufru doplněno na jeho konečný objem zobrazený v Tabulce I. Takto vzniklé homogenáty byly přeneseny na blokovou třepačku (Eppendorf, Thermomixer comfort) (1 400 rpm, 4°C , 30 min). Následně byly homogenáty stočeny na předchlazené centrifuze (Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R Centrifuge) ($12\,000 \times g$, 4°C , 20 min). Z mikrozkuvek byl odebrán supernatant, který sloužil jako výsledný vzorek pro měření. Byl kladen důraz na odebrání supernatantu od hladiny (aby byly přeneseny i tuky plavoucí na hladině). Pomocí

Bradford činidla byla změřena výsledná koncentrace homogenátů. Homogenáty byly rozpipetovány do 125 μ l alikvotů a skladovány při -80° C.

Tabulka I: Počty střev a množství přidaného pufru. Celkový objem přidaného pufru zahrnuje i 100 μ l pufru na opláchnutí plastových homogenizátorů.

Homogenát	Počet střev v mikrozkuhavce	Celkový objem přidaného pufru (μl)
UF	20	500
3D	5	500
5D	5	1000
FF	1,5	1000
4AD	1,5	1000
6AD	1,5	1000
11AD	2,5	1000

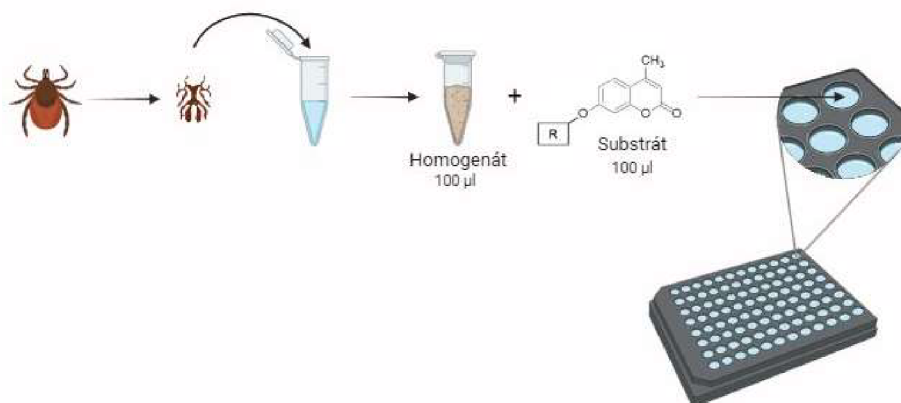
3.4. Stanovení koncentrace proteinů Bradford metodou

Koncentrace proteinu v homogenátech byla stanovena pomocí metody Bradfordové ihned po jejich zhotovení. V Eppendorf mikrozkuhavce bylo 50 μ l příslušně zředěného homogenátu smícháno s 500 μ l Bradford činidla. Koncentrace tohoto vzorku byla změřena na spektrofotometru (Eppendorf BioPhotometer) a následně vynásobena ředěním homogenátu. Jako kontrola sloužilo 50 μ l pufru s 500 μ l Bradford činidla (Bradford, 1976).

3.5. Fluorescenční měření lipolytických aktivit v průběhu sání klíštěte

Relativní lipolytická aktivita ve všech homogenátech byla měřena za použití vhodného fluorescenčního substrátu. Tím byl 4-methylumbelliferyl oleát (MUF; Sigma Aldrich, #75164), který byl vybrán především na základě publikací Gilham and Lehner, 2005 a Gupta et al., 2003. V průběhu přípravy reagentů byly všechny vzorky a chemikálie uchovávány na ledu, aby se zabránilo jejich samovolné degradaci. MUF substrát byl nejprve naředěn v dimethylformamidu (DMF) na jeho 2,5 mM koncentraci a následně v reakčním pufru (0,1M-kyselina citronová + 0,2M- Na_2HPO_4 + 0,1 % Triton X-100, pH 4.0) na jeho výslednou 100 μ M koncentraci. Před samotným měřením byl uchováván ve tmě při pokojové teplotě. Nezředěný 2,5 mM MUF byl uchováván ve tmě při -20° C. Měření byla prováděna v mikrodestičkovém fluorimetru (Infinite M200 PRO, TECAN) s dvojitým monochromátorem (excitace 327, emise 449, 37° C, 30 min) (Santana et al., 2017). Měřeno bylo v programu iControl. Fluorescence byly měřeny v černých 96-jamkových

mikrodestičkách (Nunc). Přípravu reakce a schéma pipetování do mikrodestičky znázorňuje Obrázek 2. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l příslušně zředěného střevního homogenátu/enzymu a 100 μ l 100 μ M substrátu (jehož finální koncentrace v reakci byla 50 μ M).



Obrázek 2: Příprava reakce a schéma pipetování pro optimalizaci esejí a orientační měření. Byla vypitvána střeva z různých časových úseků sání a následně byla zhomogenizována v reakčním pufru. Střevní homogenáty byly v různém ředění pipetovány do 96-jamkové destičky. Do stejných jamek byl připipetován fluorescenční substrát a reakce byla změřena v mikrodestičkovém fluorimetru.

Prvně bylo provedeno orientační měření relativních aktivit střevních enzymů pro všechny střevní homogenáty dospělých samic *I. ricinus*. Výsledná ředění, při kterých bylo u jednotlivých homogenátů naměřeno přibližně 1500 relativních fluorescenčních jednotek za minutu (RFU/min) byla použita jako výchozí ředění těchto homogenátů (Tab. II) pro všechna následující měření. Měřeno bylo vždy v triplicátech. Jejich průměrné hodnoty RFU/min byly následně přepočítány na RFU/min/ μ g proteinu v reakci.

Tabulka II: Výchozí ředění střevních homogenátů z odlišných dob sání. UF 11 měsíců – nenasátá klíšťata hladovějící po dobu jedenácti měsíců, UF 1 měsíc – nenasátá klíšťata hladovějící po dobu jednoho měsíce, 3D – tři dny sající dospělá klíšťata, 5D – pět dní sající klíšťata, FF – plně nasátá klíšťata, 4AD – klíšťata čtyři dny po odpadnutí z hostitele, 6AD – klíšťata šest dní po odpadnutí z hostitele, 11AD – klíšťata jedenáct dní po odpadnutí z hostitele.

Typ homogenátu	UF 11 měsíců	UF 1 měsíc	3D	5D	FF	4AD	6AD	11AD
Ředění	10x	20x	20x	100x	100x	20x	20x	20x

3.5.1. Ověření komerčně dostupných inhibitorů

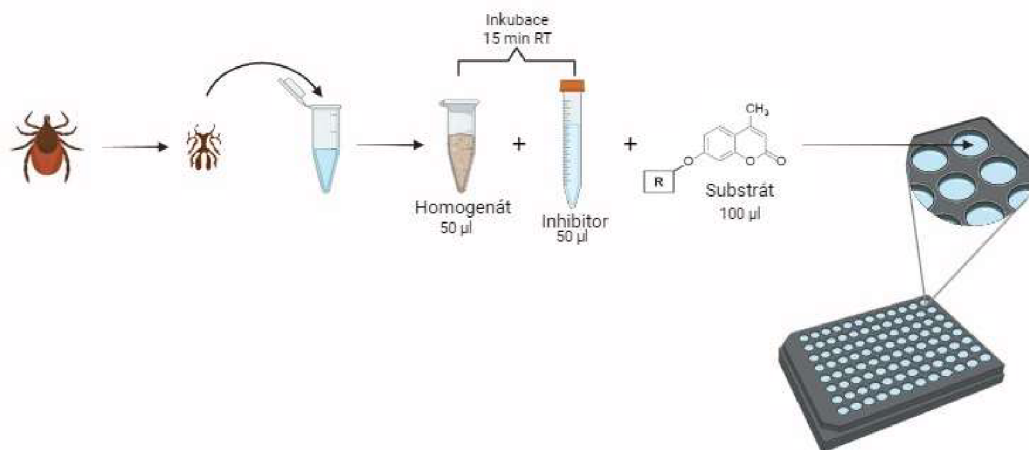
Pro charakterizaci lipolytického systému klíštěte *I. ricinus* bylo při měření použito specifických komerčně dostupných inhibitorů různých koncentrací. Názvy inhibitorů a jejich použité koncentrace jsou zobrazeny v Tabulce III. Na příslušné koncentrace byly ředěny reakčním pufrům (0,1M-kyselina citronová + 0,2M-Na₂HPO₄ + 0,1 % Triton X-100, pH 4.0) v 1,5 ml mikrozkuvkách ještě před napipetováním do destičky. Inhibitory byly skladovány při -20 °C.

Tabulka III: Názvy inhibitorů a jejich použité koncentrace

Název inhibitoru	Zkratka	Katalogové číslo (Sigma Aldrich)	Výsledné koncentrace inhibitoru v reakci
Orlistat	ORL	#O4139	250 μM; 25 μM; 5 μM; 2,5 μM; 0,5 μM; 0,25 μM; 50 nM; 25 nM; 2,5 nM; 0,25 nM; 25 pM; 2,5 pM; 0,25 pM; 25 fM
Lalistat	LAL	#SML2053	500 μM; 350 μM; 250 μM; 25 μM; 2,5 μM; 1,25 μM; 0,625 μM; 0,313 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM
BAPTA	BAPTA	#196418	250 μM; 25 μM; 2,5 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM; 0,25 nM; 25 pM; 2,5 pM; 0,25 pM; 25 fM
URB597	URB	#U4133	1000 μM; 500 μM; 250 μM; 25 μM; 2,5 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM
Varespladib	VAR	#13402	500 μM; 350 μM; 250 μM; 100 μM; 25 μM; 2,5 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM
CAY10499	CAY	#B7841-5	350 μM; 250 μM; 25 μM; 10 μM; 5 μM; 2,5 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM
PF-06424439	PZ	#PZ0233	25 μM; 10 μM; 5 μM; 2,5 μM; 0,25 μM; 25 nM; 2,5 nM

3.5.2. Měření lipolytických aktivit za použití komerčně dostupných inhibitorů

Předem zředěné inhibitory byly po dobu přípravy reakce udržovány na ledu. Inhibitor (50 μ l) o daných koncentracích byl společně s homogenátem (50 μ l) napipetován do 96-jamkové mikrodestičky. Následovala jejich společná inkubace (15 min, pokojová teplota (RT)). Po inkubaci byl přidán 100 μ M substrát (100 μ l) a reakce byla změřena na mikrodestičkovém fluorimetru. Přípravu reakce a schéma pipetování reagensů do mikrodestičky znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3: Příprava reakce a schéma pipetování měření za použití inhibitoru. Byla vypitvána střeva UF a 5D klišťat. Střeva byla následně zhomogenizována v reakčním pufru. Střevní homogenáty byly po zředění pipetovány do 96-jamkové destičky. Do stejných jamek byl připipetován inhibitor o příslušné koncentraci. Následovala společná inkubace homogenátu s inhibitorem (15 minut, pokojová teplota). Poté byl přidán fluorescenční substrát a reakce byla změřena v mikrodestičkovém fluorimetru.

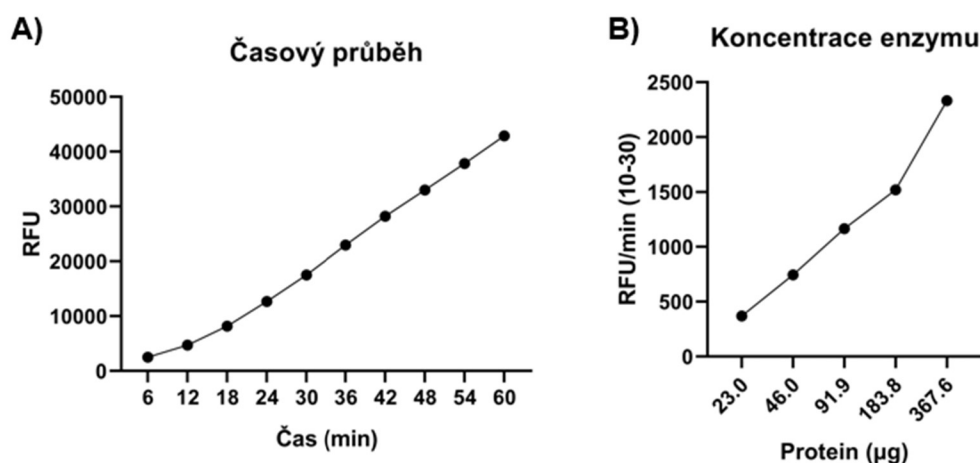
3.6. Vyhodnocení výsledků

Veškerá měření stanovující hodnoty lipolytických aktivit byla vyhodnocena v programu iControl. Výsledky byly následně převedeny do programu Microsoft excel a zde i přepočítány, jak bylo již zmíněno výše. Veškeré grafy objevující se v této práci byly zkonstruovány v programu GraphPad Prism 8. Ve stejném programu byla zároveň provedena statistická úprava dat a stanovena hodnota IC_{50} pro všechny použité inhibitory.

4. Výsledky

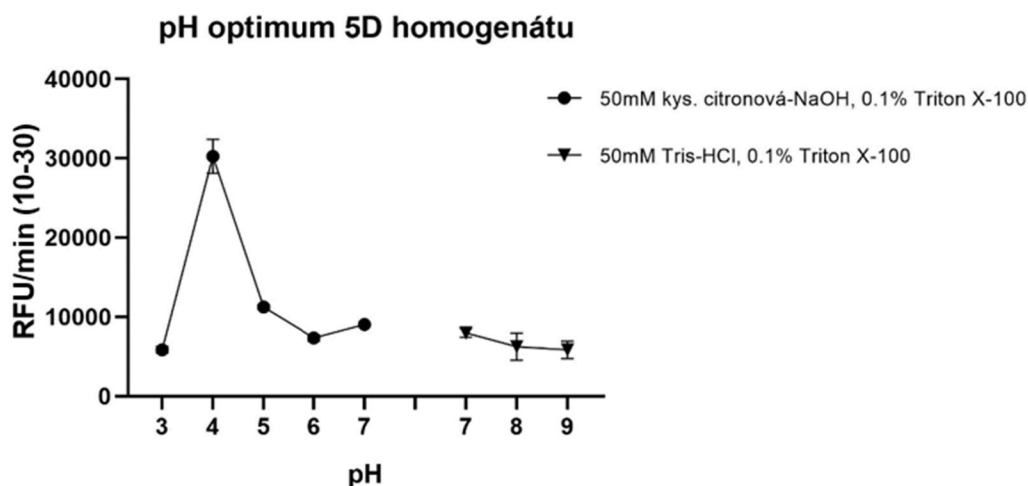
4.1. Optimalizace aktivitních esejí

Před samotným měřením lipolytických aktivit bylo třeba aktivitní esej optimalizovat. Na Obrázku 4A lze vidět, že se vzrůstajícím časem narůstá množství uvolněného oleátu nebo methylumbelliferonu. Byla sledována závislost mezi koncentrací proteinu a lipolytickou aktivitou v 5D střevním homogenátu klíštěte *I. ricinus* (Obr. 4B). Při tomto měření se vycházelo z lineární oblasti v časovém rozmezí 10 - 30 min. Hodnoty lipolytických aktivit rostly lineárně se zvyšující se koncentrací proteinu. Lineární hodnoty aktivit naznačují, že podmínky, které byly pro měření stanoveny, byly vhodně zvolené.



Obrázek 4: A: Lineární časový průběh MUF substrátu a B: Koncentrace enzymů lipolytických aktivit střevních homogenátů 5D klíštěte *I. ricinus*. RFU – relativní fluorescenční jednotky, RFU/min (10-30) – relativní fluorescenční jednotky za minutu v časovém úseku reakce 10-30 minut.

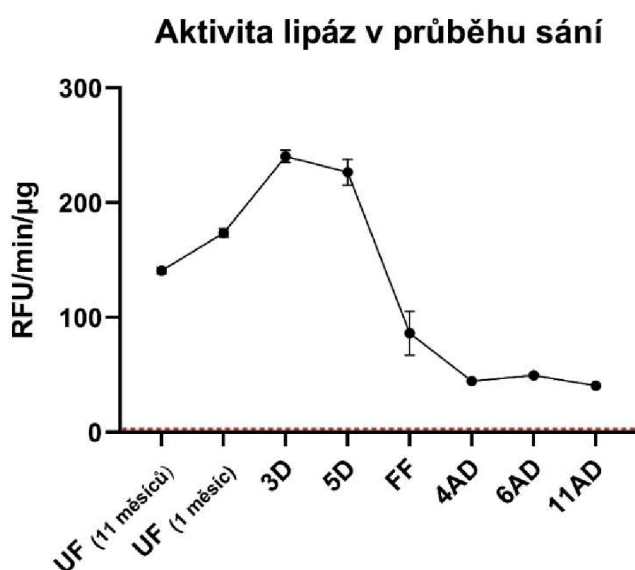
Dalším krokem k optimalizaci lipolytických esejí bylo stanovení optimálního pH. Nejvyšší lipolytické aktivity u 5D střevních homogenátů bylo dosaženo v prostředí o pH4 (Obr. 5).



Obrázek 5: pH optimum 5D homogenátu. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku (SD), RFU/min (10-30) – relativní fluorescenční jednotky za minutu v časovém úseku reakce 10-30 minut.

4.2. Měření lipolytických aktivit klíšťat v různých časových bodech sání

Pro prozkoumání lipolytické aktivity u klíštěte obecného byla měřena aktivita v průběhu hladovění, sání a po odpadnutí u dospělých samiček (Obr. 6). Celkem bylo měřeno osm skupin klíšťat v triplicátech. Lipolytická aktivita vzrůstá od nenasátého (hladovějícího) stádia až po pátý den sání. Lipolytická aktivita je nejvyšší třetí a pátý den sání klíštěte. V plně nasátém stádiu hodnota lipolytických aktivit rapidně klesá. Po odpadnutí z hostitele je aktivita nejnižší a blíží se bazální aktivitě lipáz v hostitelské krvi. U nenasátých klíšťat hladovějících jeden měsíc (UF 1 měsíc) byla pozorována vyšší lipolytická aktivita (174 RFU/min/ μ g) než u klíšťat, která hladověla jedenáct měsíců (141 RFU/min/ μ g) (Obr. 6).



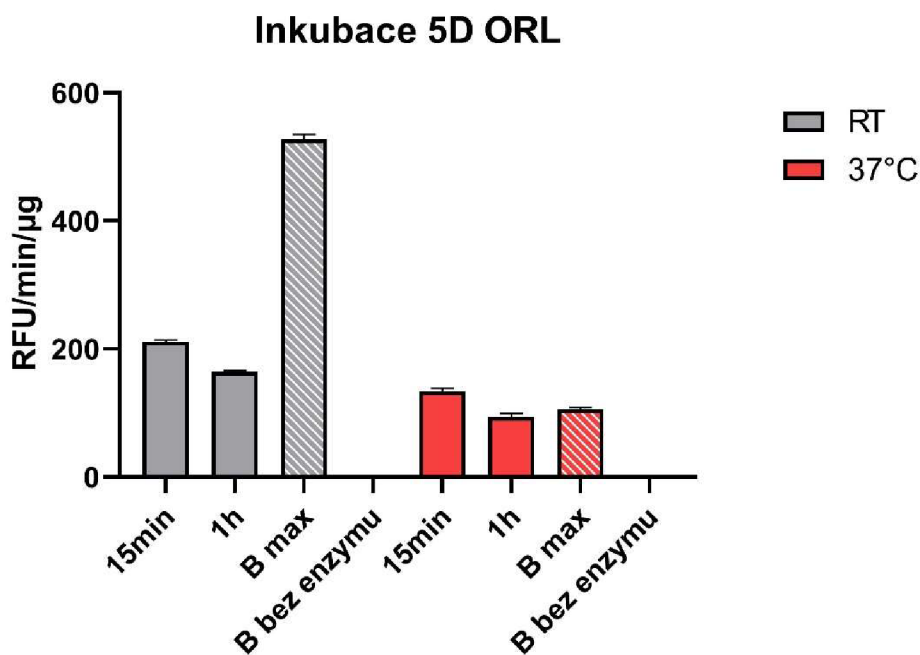
Obrázek 6: Aktivita lipáz střevních homogenátů v průběhu sání klíštěte *I. ricinus*. UF (11 měsíců) – nenasátá klíšťata hladovějící jedenáct měsíců, UF (1 měsíc) – nenasátá klíšťata hladovějící jeden měsíc, 3D – klíšťata sající tři dny na laboratorním morčeti, 5D – klíšťata sající pět dní, FF – plně nasátá klíšťata, 4AD – klíšťata čtyři dny po odpadnutí z laboratorního morčete, 6AD – klíšťata šest dní po odpadnutí, 11AD – klíšťata jedenáct dní po odpadnutí. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Červená přerušovaná čára představuje bazální aktivitu lipáz v krvi hostitele. RFU/min/ μ g – relativní fluorescenční jednotky za minutu na mikrogram proteinu v reakci.

4.3. Použití komerčně dostupných inhibitorů

Pro charakterizaci lipolytického systému klíštěte *I. ricinus* byly použity komerčně dostupné inhibitory sloužící k inhibici lipáz různých druhů a tříd. Na jejich základě bylo možné určit, jaké druhy lipáz jsou přítomny ve střevě tohoto druhu klíštěte.

4.3.1. Inkubace homogenátu s inhibitorem

Před samotným použitím inhibitorů bylo testováno, jakým způsobem (pokud vůbec) ovlivňuje hodnotu lipolytických aktivit inkubace homogenátu s inhibitorem (Obr. 7). Celkem byly testovány dva vlivy – teplota a doba inkubace. Pro testování byly zvoleny dvě teploty a dva časové úseky. Za testovaný inhibitor byl zvolen univerzální lipázový inhibitor Orlistat, za homogenát byl zvolen 5D homogenát. Jako kontrola byly použity Orlistat s pufrem bez přítomnosti homogenátu (B bez enzymu) a 5D homogenát s pufrem bez přítomnosti inhibitoru (B max). Měřeno bylo v triplicátech. Výsledky ukazují, že nejvhodnější je inkubace homogenátu s inhibitorem při pokojové teplotě. Jelikož při 37 °C nebyl vzorek B max (samotný homogenát) stabilní a nedosáhl na maximální aktivitu ~500 RFU/min/μg (Obr. 7). Dále bylo prokázáno, že časový interval inkubace nemá takový vliv na účinnost inhibitoru. Proto bylo v dalších měřeních přistoupeno k inkubaci homogenátu a inhibitoru v pokojové teplotě (RT) po dobu 15 minut.



Obrázek 7: Inkubace střevního homogenátu s inhibitorem. Srovnání inkubace za pokojové teploty (RT) a 37 °C v různých časových intervalech (15 min a 1 h). B max – maximální lipolytická aktivita 5D homogenátu bez přidaného inhibitoru, B bez enzymu – kontrola bez enzymu za přítomnosti inhibitoru ORL. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. RFU/min/μg – relativní fluorescenční jednotky za minutu na mikrogram proteinu v reakci.

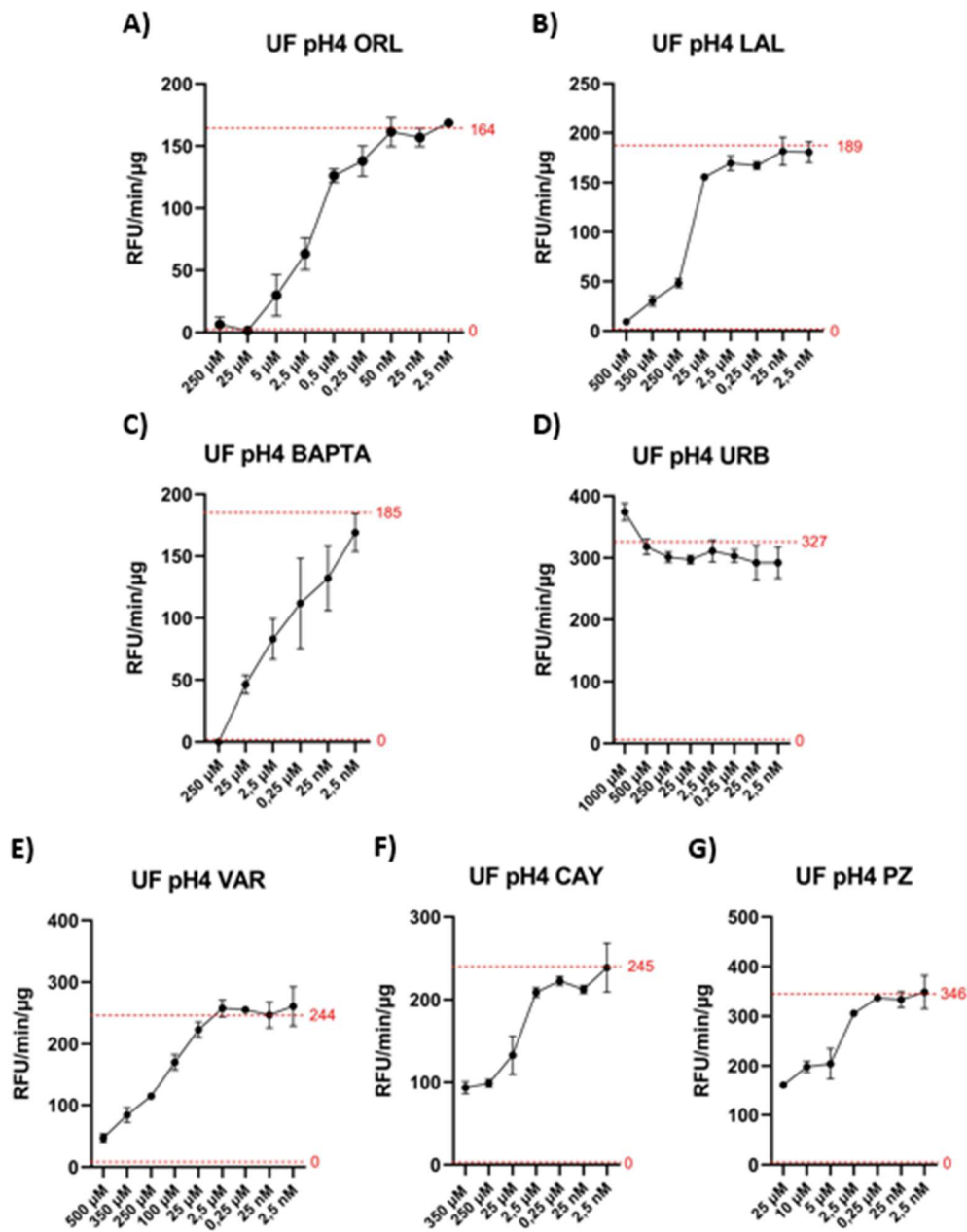
4.3.2. Inhibice lipáz přítomných ve střevní tkáni

Pro měření inhibice lipolytických aktivit bylo celkem použito sedm druhů inhibitorů. Přehled inhibitorů, jejich funkce a případné reference jsou uvedeny v Tabulce IV. Použité inhibitory byly různých koncentrací, abychom zjistili účinnost jejich působení. Koncentrace inhibitorů byly vybírány tak, aby lipázy střevního homogenátu v jejich přítomnosti dosahovaly své minimální i maximální aktivity (pokud takové nařazení inhibitor umožňoval). Byl kladen důraz na hyperbolický průběh měření pro pozdější výpočet IC_{50} . Měřeny byly dvě skupiny klíš'at – UF klíš'ata (Obr. 8) a 5D klíš'ata (Obr. 9). U obou těchto skupin byly použity stejné inhibitory. Byly použity dvě kontroly: kontrola bez inhibitoru (maximální lipolytická aktivita) a kontrola bez homogenátu/enzymu (nulová lipolytická aktivita). Měřeno bylo v triplikátech.

Tabulka IV: Inhibitory a jejich funkce

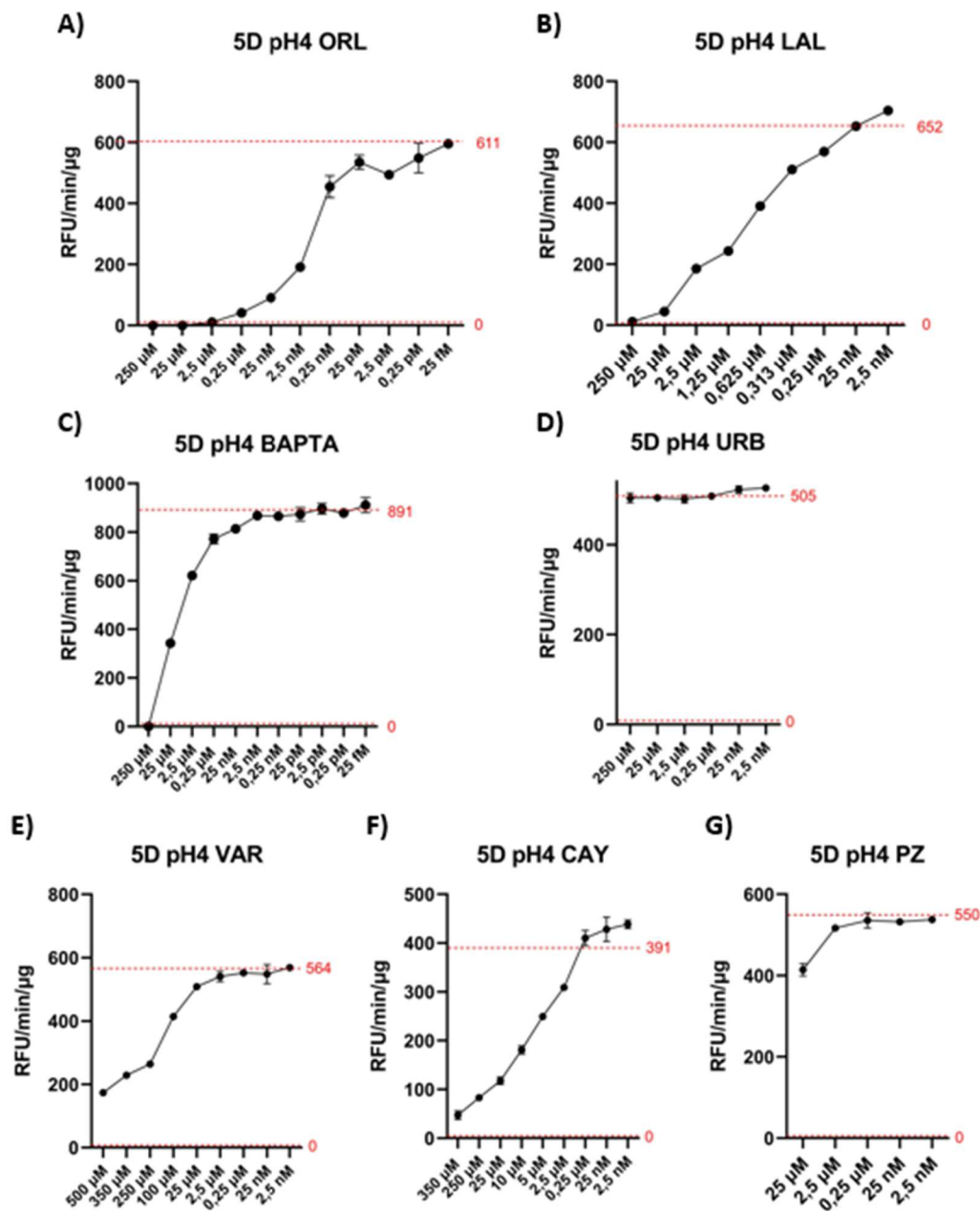
Inhibitor	Zkratka	Funkce	Reference
Orlistat	ORL	Univerzální inhibitor žaludečních a pankreatických lipáz, využívá se jako lék proti obezitě, snižuje absorpci tuků z potravy, snižuje hladinu cholesterolu, může ovlivnit i preferenci ve výběru potravy	Heck et al., 2000 Hvizdos and Markham, 1999
Lalistat	LAL	Specifický inhibitor lyzozomální kyselé lipázy, zvyšuje hladinu triacylglycerolu, způsobuje degradaci lipidových kapének	Tuohetahuntila et al., 2017
BAPTA	BAPTA	Vysoce účinný chelátor vápníku	Dieter et al., 1993
URB597	URB	Silný inhibitor amidové hydrolázy mastných kyselin	Clapper et al., 2006
Varespladib	VAR	Inhibitor sekreční fosfolipázy A2	De Luca et al., 2012
CAY10499	CAY	Inhibitor hormon senzitivní lipázy (monoacyl glycerol lipázy)	Muccioli et al., 2008
PF-06424439	PZ	Inhibitor diacylglycerol acyltransferázy, snižuje syntézu triacylglycerolu, snižuje hladinu triacylglycerolu krevní plasmy	Futatsugi et al., 2015

Následujících grafy (Obr. 8) znázornují hodnoty lipolytických aktivit UF klíčůat. ORL inhibuje při poměrně nízkých koncentracích (Obr. 8A). U inhibitorů VAR, CAY a PZ nebylo dosaženo nulové lipolytické aktivity (Obr. 8E, 8F, 8G). Inhibitor URB neinhiboval vůbec (8D).



Obrázek 8: Inhibice lipolytických aktivit UF klíčůat za použití inhibitorů. Orlistat (A), Lalistat (B), BAPTA (C), URB597 (D), Varespladib (E), CAY10499 (F), PF-06424439 (G). Horní přerušovaná červená čára značí lipolytickou aktivitu bez přítomného inhibitoru, spodní přerušovaná červená čára značí lipolytickou aktivitu bez přidaného homogenátu (kontrolu). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. RFU/min/μg – relativní fluorescenční jednotky za minutu na mikrogram proteinu v reakci.

Následující grafy (Obr. 9) znázorňují hodnoty lipolytických aktivit 5D klíšťat. ORL (Obr. 9A) a LAL (Obr. 9B) inhibují již při nízkých koncentracích. U inhibitorů VAR, CAY a PZ nebylo dosaženo nulové lipolytické aktivity (Obr. 9E, 9F, 9G). Inhibitor PZ inhiboval i při jeho vyšších koncentracích jen velmi málo (Obr. 9G). Inhibitor URB neinhiboval vůbec (Obr. 9D).



Obrázek 9: Inhibice lipolytických aktivit 5D klíšťat za použití inhibitorů. Orlistat (A), Lalistat (B), BAPTA (C), URB597 (D), Varespladib (E), CAY10499 (F), PF-06424439 (G). Horní přerušovaná červená čára značí lipolytickou aktivitu bez přítomného inhibitoru, spodní přerušovaná červená čára značí lipolytickou aktivitu bez přidaného homogenátu (kontrolu). Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. RFU/min/μg – relativní fluorescenční jednotky za minutu na mikrogram proteinu v reakci.

4.3.3. Stanovení hodnoty IC₅₀

Pro lepší interpretaci výsledků byla stanovena polovina maximální inhibiční koncentrace (tzv. IC₅₀). Její hodnota byla vypočtena u všech použitých inhibitorů obou skupin klíšťat (Příloha, Obr. 1 a 2). Veškeré výpočty včetně statistické úpravy dat byly provedeny v programu GraphPad Prism 8.

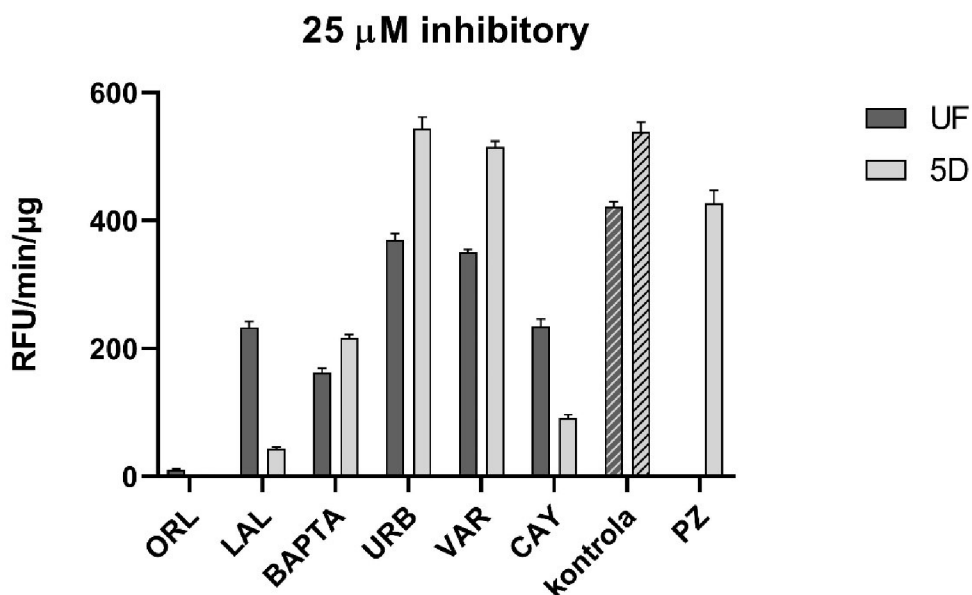
Pro větší přehlednost byla zhotovena tabulka (Tab. V) zobrazující jednotlivé hodnoty IC₅₀ u UF a 5D klíšťat všech použitých inhibitorů. U UF klíšťat byly nejlepšími inhibitory ORL, PZ a BAPTA. U 5D klíšťat byl zdaleka nejlepším inhibitorem ORL, při jehož použití dosáhneme inhibice o 50 % za použití pouze jeho 0,003 μM koncentrace. U 5D klíšťat byly ale také velmi účinné inhibitory LAL a PZ. Inhibitor URB neinhiboval vůbec ani u jedné měřené skupiny klíšťat.

Tabulka V: Hodnoty IC₅₀ různých druhů inhibitorů

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)	
	UF	5D
ORL	2,107	0,003
LAL	75,406	1,263
BAPTA	3,226	10,230
URB	neinhiboval	neinhiboval
VAR	114,256	118,359
CAY	9,026	5,390
PZ	2,928	2,624

4.3.4. Souhrnné měření použitých inhibitorů

Pro porovnání jednotlivých inhibitorů mezi sebou bylo provedeno souhrnné měření všech použitých inhibitorů (Obr. 10). Lipolytická aktivita u UF a 5D klíšťat byla měřena u obou skupin současně v jednom měření. Použité inhibitory byly stejné koncentrace - 25 μM. Měřeno bylo v triplicátech.



Obrázek 10: Souhrnné měření inhibitorů 25 μ M koncentrace. Jako kontrola byl použit homogenát bez přidaného inhibitoru. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. RFU/min/ μ g – relativní fluorescenční jednotky za minutu na mikrogram proteinu v reakci.

Z hodnot uvedených na Obrázku 10 byla pro lepší interpretaci výsledků zhotovena tabulka procentuální inhibice 25 μ M inhibitorů obou skupin klíšťat (Tab. VI).

Za použití inhibitoru ORL bylo dosaženo téměř 100 % inhibice lipolytických aktivit u obou skupin klíšťat. Inhibitor LAL inhibuje více u 5D klíšťat, u kterých způsobuje ~ 92 % inhibici. U nenasátých (UF) klíšťat inhibuje přibližně o polovinu méně. Podobně tomu bylo i u inhibitoru CAY. PZ způsobuje u nenasátých klíšťat 100 % inhibici. U 5D homogenátů však způsobuje pouhou ~ 21 % inhibici. BAPTA u obou skupin klíšťat způsobuje mírně nadpoloviční inhibici. VAR podobně jako URB jsou při jejich 25 μ M koncentraci špatnými inhibitory lipáz. U nenasátých klíšťat inhibují jen velice málo a u 5D klíšťat téměř vůbec (v případě URB bylo dosaženo dokonce 0 % inhibice).

Tabulka VI: Procentuální inhibice celkové lipolytické aktivity 25 μ M inhibitory

Inhibitor	Inhibice lipolytických aktivit u jednotlivých homogenátů (%)	
	UF	5D
ORL	97,54	99,67
LAL	44,76	91,96
BAPTA	61,61	59,68
URB	12,40	0,00
VAR	16,97	4,37
CAY	44,53	83,17
PZ	100,00	20,59

5. Diskuze

V této práci byla zkoumána lipolytická aktivita ve střevě klíštěte *I. ricinus* prostřednictvím aktivitních esejí. Byla stanovena lipolytická aktivita v průběhu hladovění a sání dospělých samic *I. ricinus* na jejich hostiteli. Díky využití komerčně dostupných inhibitorů lipáz, a látek s hydrolyzou tuků spjatých, bylo možné částečně charakterizovat lipolytický systém tohoto druhu klíštěte. Při aktivitních esejích se využívalo fluorescenčního substrátu 4-methylumbelliferyl oleátu, který se při podobných esejích běžně užívá.

Před samotným měřením lipolytické aktivity ve střevech klíšťat bylo zapotřebí lipolytické esejě optimalizovat. Lineární hodnoty aktivit z výsledků optimalizačních měření naznačují, že podmínky, které byly pro měření stanoveny, byly vhodné. Při stanovení optimálního pH lipolytických esejí bylo zjištěno, že nejvyšší lipolytické aktivity je dosaženo při pH 4. Toto pH odpovídá pH optimu aktivity proteáz naměřenému taktéž ve střevě *I. ricinus*, které sálo na hostiteli stejně dlouhou dobu jako v případě našeho experimentu (Sojka et al., 2008). Je tedy pravděpodobné že trávení proteinů a lipidů klíštěte probíhá za stejných podmínek. pH 4 odpovídá prostředí v trávicích lysozomech na rozdíl od lumenu střeva, kde je pH 6,3 – 6,5. (Horn et al., 2009; Miyoshi et al., 2007). Dle výsledků se tedy můžeme domnívat, že hydrolyza lipidů probíhá (stejně jako degradace proteinů) vnitrobuněčně ve střevní tkáni.

Při stanovování lipolytických aktivit v časovém průběhu sání klíštěte *I. ricinus* bylo celkem měřeno osm skupin klíšťat odlišných dob hladovění a sání hostitelské krve. Lipolytická aktivita tohoto druhu klíštěte nebyla dosud měřena a tato práce je první, zabývající se právě aktivitou lipáz. Trávicí mechanismus proteinů však již podrobně popsán byl. Bylo prokázáno, že aktivita proteáz je do druhého dne sání dospělé samice sotva měřitelná. Exponenciální růst aktivity většiny proteáz nastává mezi čtvrtým a šestým dnem sání. Maximální aktivita pak byla pozorována u plně nasátých samic (Franta et al., 2010; Horn et al., 2009). Výsledky této bakalářské práce ukazují, že aktivita lipáz *I. ricinus* roste do třetího a pátého dne sání, kdy dosahuje svého maxima. Lipolytická aktivita je tak částečně v souladu s proteázovými aktivitami, přičemž lipázy jsou ve střevě klíštěte aktivní dříve (již u nenasátých samic) a dosahují svého maxima rychleji (třetí až pátý den sání). Výjimkou u hemoglobinové degradace je cysteinová peptidáza cathepsin L, která jako jediná vybočuje z trendu. Svého aktivitního maxima dosahuje již pátý den sání a poté prudce klesá, což je plně v souladu s námi naměřenými lipolytickými aktivitami (Franta et al., 2010).

Pro měření lipolytických aktivit s inhibitory byly použity dvě skupiny klíšťat – nenasáté dospělé samice (UF) a dospělé samice sající na svém hostiteli (laboratorním morčeti) po dobu pěti dnů (5D). Tyto skupiny klíšťat byly vybrány za účelem porovnání rozdílu mezi

klíšťaty hladovějícími a klíšťaty, u kterých byla pozorována maximální lipolytická aktivita. Pro charakterizaci lipolytických aktivit bylo dohromady vybráno 7 komerčně dostupných inhibitorů lipáz a látek, které s metabolismem tuků úzce souvisejí nebo jej mohou ovlivňovat. Před jejich použitím nás zajímala samotná inkubace inhibitoru s enzymem (střevním homogenátem). Aktivita některých inhibitorů (např. CAY10499 nebo PF-06424439) totiž roste po společné preinkubaci s enzymem (Muccioli et al., 2008; Pabst et al., 2018). Pro inkubaci je teplota 37 °C nevhodná, jelikož dochází ke snižování lipolytické aktivity. Jak však bylo u inhibitoru Orlistat zjištěno, doba inkubace nemá na hodnotu lipolytických aktivit velký vliv. Pro měření tak byla vybrána inkubace enzymu s inhibitorem za pokojové teploty po dobu patnácti minut.

Díky vysoké specifitě většiny z použitých inhibitorů bylo možné částečně charakterizovat lipolytický systém klíšťete *I. ricinus*. Inhibitor Orlistat byl vybrán na základě jeho vlastností univerzálního a hojně používaného inhibitoru lipáz, zejména žaludečního a pankreatického typu. Používá se také jako komerčně dostupný lék proti obezitě. Snižuje hydrolýzu a tím i absorpci požitého tuku z potravy. Nestrávené lipidy jsou následně vyloučeny stolicí. Tímto způsobem může zabránit vstřebání až 30 % tuků. Při jeho použití bylo za jeden rok (při současné nízkokalorické dietě) dosaženo snížení hmotnosti pacientů až o 10 %. Orlistat může ovlivnit i samotný výběr stravy. Konzumace pokrmů s vysokým obsahem tuku za současného používání tohoto léku totiž může vést k závažným gastrointestinálním problémům (Heck et al., 2000; Hvizdos and Markham, 1999). Zjistili jsme, že Orlistat je vysoce účinný v inhibici klíšťecích lipáz už při jeho nízkých koncentracích a s téměř 100 % účinností inhiboval lipázy jak UF tak u 5D klíšťat. Další inhibitor, Lalistat, je taktéž hojně používaný. Je specifickým inhibitorem lyzosomální kyselé lipázy. V klinických studiích je používán jako vhodný kandidát pro stanovení aktivity lyzosomální kyselé lipázy z krve pacientů, přičemž se zdá, že pro tyto účely funguje s vysokou účinností již při jeho pouhé 1 μ M koncentraci. Toho lze využít při diagnostice chorob spjatých právě s nedostatkem tohoto enzymu (Hamilton et al., 2012). Při našich měřeních byl inhibitor Lalistat stejně účinný jako Orlistat s výjimkou u nenasátých klíšťat. Můžeme se tak domnívat, že nenasátá klíšťata mají menší zastoupení v aktivitě lyzosomální kyselé lipázy, než je tomu u 5D klíšťat. Ke zjištění, zda-li jsou ve střevě klíšťat přítomné kalcium-dependentní lipázy jsme použili silný chelátor vápníku BAPTA (Dieter et al., 1993). Na základě našich výsledků se domníváme, že u nenasátého stádia klíšťete je aktivních více kalcium-dependentních fosfolipáz než u 5D stádia. Pro stanovení jednotlivých druhů lipáz byly použity specifické inhibitory URB597, Varespladib a CAY10499. URB je silný inhibitor amidové hydrolázy mastných kyselin. Při jeho použití

nebylo dosaženo žádné inhibice lipolytických aktivit, i přes to, že v jaterní tkáni u myši URB inhiboval amidovou hydrolázu mastných kyselin velmi dobře už při jeho nanomolární koncentraci (Clapper et al., 2006). To naznačuje, že amidová hydroláza mastných kyselin není u klíšťat aktivní (nebo jen ve velmi malé míře). Varespladib je inhibitor fosfolipázy A2. Při jeho použití jsme jak u UF, tak u 5D klíšťat dosáhli jen velmi malé inhibice lipolytických aktivit. Proto se domníváme, že fosfolipáza A2 nepřispívá ve velké míře k celkové lipolýze u klíšťat. To potvrzuje i fakt, že Orlistat není inhibitorem fosfolipázy A2, i přes to jsme však při jeho použití dosáhli téměř 100% inhibice lipáz (Hvizdos and Markham, 1999). CAY10499 je inhibitor monoacyl glycerol lipázy, která má podle výsledků na celkové lipolytické aktivitě u obou skupin klíšťat nemalý podíl, zejména u 5D klíšťat. Jediným inhibitorem, který neovlivňuje přímo lipázy, ale naopak slouží k inhibici diacylglycerol acyltransferázy (DGAT) je PF-06424439. DGAT je enzym katalyzující tvorbu triacylglycerolu (z diacylglycerolu a acyl-CoA). Jeho aktivita má přímý vliv na množství triacylglycerolu v organismu a tím tak značně ovlivňuje celý jeho energetický metabolismus. Inhibitory DGAT by mohly mít potenciál v léčbě obezity a diabetu mellitu u lidí (Yen et al., 2008). Některé inhibitory DGAT již byly dokonce v klinických studiích testovány. Obecně byly velmi účinné ve snižování syntézy triacylglycerolu a jeho množství v krevní plazmě. Při jejich používání byly však současně pozorovány závažné gastrointestinální vedlejší účinky, které znemožnili jejich další klinické využití (Chen et al., 2022). Vzhledem k výsledkům této práce se můžeme domnívat, že pro klíšťata je DGAT pravděpodobně velmi důležitá v UF stádiu, kdy bylo za použití 25 μ M inhibitoru PZ dosaženo její 100% inhibice. Tudíž je možné, že u nenasátých klíšťat v hojné míře probíhá syntéza triacylglycerolu.

6. Závěr

Tato práce se jako první zabývá charakterizací lipolytického systému a lipolytických aktivit klíštěte obecného – *Ixodes ricinus*. Byly optimalizovány lipolytické eseje pro měření střevních homogenátů klíšťat za použití univerzálního fluorescenčního substrátu. Bylo stanoveno optimální pH pro lipolytické aktivity. Byly změřeny aktivity lipáz ve střevních homogenátech v průběhu hladovění, sání a po odpadnutí klíšťat z hostitele. Pro bližší charakterizaci lipolytického systému byly použity komerčně dostupné inhibitory lipáz a látek, které lipolytický systém ovlivňují nebo s ním úzce souvisejí. Účinnost jednotlivých inhibitorů byla stanovena výpočtem hodnoty IC_{50} každého z nich.

7. Seznam referencí

Angelo I. C., Gôlo P. S., Perinotto W. M., Camargo M. G., Quinelato S., Sá F. A., Pontes E. G., & Bittencourt V. R. (2013). Neutral lipid composition changes in the fat bodies of engorged females *Rhipicephalus microplus* ticks in response to fungal infections. *Parasitology research*, *112*(2), 501–509.

Azeez O. I., Meintjes R., & Chamunorwa J. P. (2014). Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids in health and disease*, *13*, 71.

Boulangier N., Boyer P., Talagrand-Reboul E., & Hansmann Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. *Medecine et maladies infectieuses*, *49*(2), 87–97.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248–254.

Chen G., Harwood J. L., Lemieux M. J., Stone S. J., & Weselake R. J. (2022). Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Properties, physiological roles, metabolic engineering and intentional control. *Progress in lipid research*, *88*, 101181.

Clapper J. R., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., & Piomelli D. (2006). The fatty-acid amide hydrolase inhibitor URB597 does not affect triacylglycerol hydrolysis in rat tissues. *Pharmacological research*, *54*(5), 341–344.

de la Fuente J., Estrada-Pena A., Venzal J. M., Kocan K. M., & Sonenshine D. E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in bioscience*, *13*, 6938–6946.

De Luca D., Minucci A., Trias J., Tripodi D., Conti G., Zuppi C., Capoluongo E., & Study Group on Secretory Phospholipase in Pediatrics (2012). Varespladib inhibits secretory phospholipase A2 in bronchoalveolar lavage of different types of neonatal lung injury. *Journal of clinical pharmacology*, *52*(5), 729–737.

Dieter P., Fitzke E., & Duyster J. (1993). BAPTA induces a decrease of intracellular free calcium and a translocation and inactivation of protein kinase C in macrophages. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, *374*(3), 171–174.

Fahy E., Cotter D., Sud M., & Subramaniam S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta*, *1811*(11), 637–647.

- Franta Z., Frantová H., Konvičková J., Horn M., Sojka D., Mareš M., & Kopáček P. (2010). Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & vectors*, 3, 119.
- Futatsugi K., Kung D. W., Orr S. T., Cabral S., Hepworth D., Aspnes G., Bader S., Bian J., Boehm M., Carpino P. A., Coffey S. B., Dowling M. S., Herr M., Jiao W., Lavergne S. Y., Li Q., Clark R. W., Erion D. M., Kou K., Lee K., Pabst B. A., Perez S. M., Purkal J., Jorgensen C. C., Goosen T. C., Gosset J. R., Niosi M., Pettersen J. C., Pfefferkorn J. A., Ahn K., & Goodwin B. (2015). Discovery and optimization of imidazopyridine-based inhibitors of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). *Journal of medicinal chemistry*, 58(18), 7173–7185.
- Gilham D., & Lehner R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2), 139–147.
- Gondim K. C., Atella G. C., Pontes E. G., & Majerowicz D. (2018). Lipid metabolism in insect disease vectors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 101, 108–123.
- Gray J., Kahl O., & Zintl A. (2021). What do we still need to know about *Ixodes ricinus*?. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(3), 101682.
- Gray J. S., Kahl O., Lane R. S., Levin M. L., & Tsao J. I. (2016). Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 992–1003.
- Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada Peña A., Horak I. G., Shao R., & Barker S. C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1-28.
- Gupta R., Rathi P., Gupta N., & Bradoo S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(Pt 1), 63–71.
- Hamilton J., Jones I., Srivastava R., & Galloway P. (2012). A new method for the measurement of lysosomal acid lipase in dried blood spots using the inhibitor Lalistat 2. *Clinica chimica acta*, 413(15-16), 1207–1210.
- Heck A. M., Yanovski J. A., & Calis K. A. (2000). Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy*, 20(3), 270–279.

- Horak I. G., Camicas J. L., & Keirans J. E. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental & applied acarology*, 28(1-4), 27–54.
- Horn M., Nussbaumerová M., Sanda M., Kovárová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C. R., Kopáček P., & Mares M. (2009). Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry & biology*, 16(10), 1053–1063.
- Hvizdos K. M., & Markham A. (1999). Orlistat: a review of its use in the management of obesity. *Drugs*, 58(4), 743–760.
- Kahl O., & Gray J. S. (2023). The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(2), 102114.
- Klompen J. S. H. (1992). Comparative morphology of Argasid larvae (Acari: Ixodida: Argasidae), with notes on phylogenetic relationships. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(5), 541-560.
- Kozelková T., Dyčka F., Lu S., Urbanová V., Frantová H., Sojka D., Šíma R., Horn M., Perner J., & Kopáček P. (2023). Insight into the dynamics of the *Ixodes ricinus* nymphal midgut proteome. *Molecular & cellular proteomics:MCP*, 22(11), 100663.
- Lennarz W. J., & Lane M. D. (2004). Encyclopedia of biological chemistry (Vol. 2). *Academic Press*.
- Mans B. J. (2011). Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of innate immunity*, 3(1), 41–51.
- Miyoshi T., Tsuji N., Islam M. K., Huang X., Motobu M., Alim M. A., & Fujisaki K. (2007). Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of insect physiology*, 53(2), 195–203.
- Muccioli G. G., Labar G., & Lambert D. M. (2008). CAY10499, a novel monoglyceride lipase inhibitor evidenced by an expeditious MGL assay. *Chembiochem*, 9(16), 2704–2710.
- O'Neal A. J., Butler L. R., Rolandelli A., Gilk S. D., & Pedra J. H. (2020). Lipid hijacking: a unifying theme in vector-borne diseases. *eLife*, 9, e61675.

- Pabst B., Futatsugi K., Li Q., & Ahn K. (2018). Mechanistic characterization of long residence time inhibitors of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). *Biochemistry*, *57*(51), 6997–7010.
- Perner J., Provazník J., Schrenková J., Urbanová V., Ribeiro J. M., & Kopáček P. (2016). RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific reports*, *6*, 36695.
- Quehenberger O., & Dennis E. A. (2011). The human plasma lipidome. *The New England journal of medicine*, *365*(19), 1812–1823.
- Santana C. C., Barbosa L. A., Júnior I. D. B., Nascimento T. G. D., Dornelas C. B., & Grillo L. A. M. (2017). Lipase activity in the larval midgut of *Rhynchophorus palmarum*: biochemical characterization and the effects of reducing agents. *Insects*, *8*(3), 100.
- Sojka D., Franta Z., Horn M., Caffrey C. R., Mareš M., & Kopáček P. (2013). New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in parasitology*, *29*(6), 276–285.
- Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdusek O., Caffrey C. R., Mares M., & Kopáček P. (2008). Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasites & vectors*, *1*(1), 7.
- Sonenshine D. E., & Roe R. M. (Eds.). (2014). Biology of ticks (Vol. 1). *Oxford University Press, USA*.
- Svensden A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochimica et biophysica acta*, *1543*(2), 223–238.
- Toprak U., Hegedus D., Doğan C., & Güney G. (2020). A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of insect biochemistry and physiology*, *104*(2), e21682.
- Tuohetahunttila M., Molenaar M. R., Spee B., Brouwers J. F., Wubbolts R., Houweling M., Yan C., Du H., VanderVen B. C., Vaandrager A. B., & Helms J. B. (2017). Lysosome-mediated degradation of a distinct pool of lipid droplets during hepatic stellate cell activation. *The Journal of biological chemistry*, *292*(30), 12436–12448.
- Urbanová V., Lu S., Kalinová E., Martins L., Kozelková T., Dyčka F., Ribeiro J. M., Hajdušek O., Perner J., & Kopáček P. (2024). From the fat body to the hemolymph: Profiling tick immune and storage proteins through transcriptomics and proteomics. *Insect biochemistry and molecular biology*, *165*, 104072.

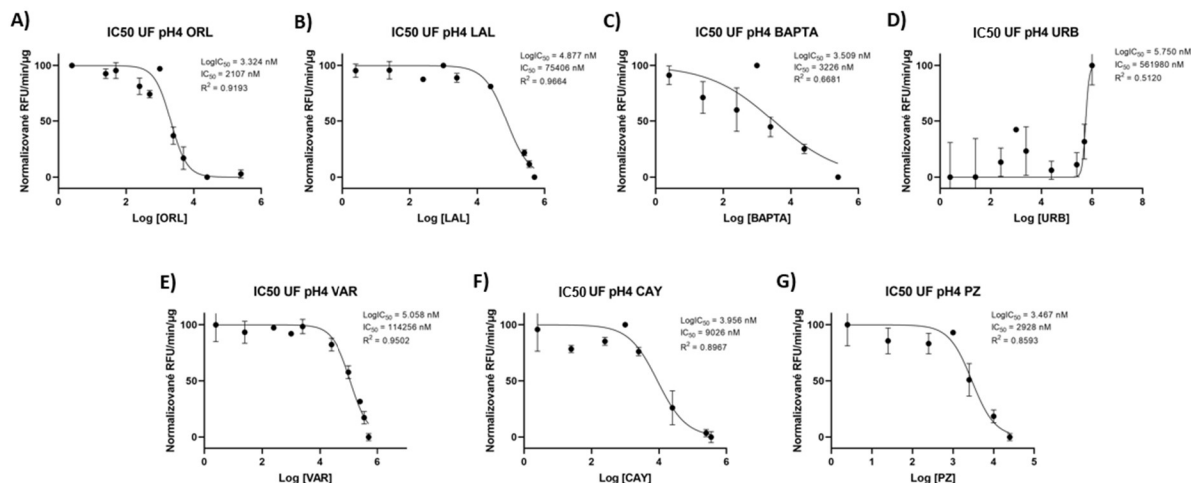
Vancová M., Bílý T., Šimo L., Touš J., Horodyský P., Růžek D., Novobilský A., Salát J., Strnad M., Sonenshine D. E., Grubhoffer L., & Nebesářová J. (2020). Three-dimensional reconstruction of the feeding apparatus of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): a new insight into the mechanism of blood-feeding. *Scientific reports*, *10*(1), 165.

Voet D., Voet J. G., & Pratt C. W. (2006). Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. *John Wiley & Sons*.

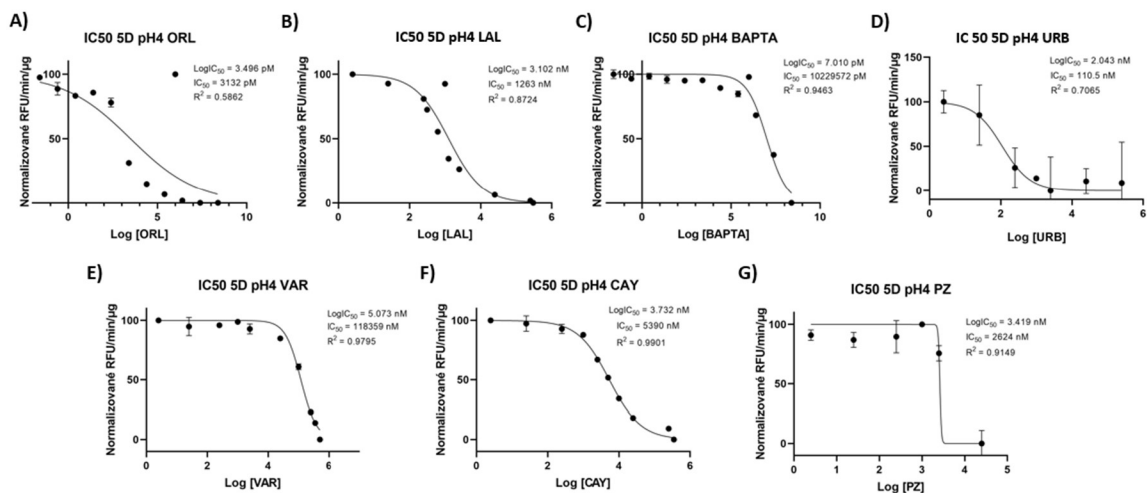
Yen C. L., Stone S. J., Koliwad S., Harris C., & Farese R. V. Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research*, *49*(11), 2283–2301.

Zajac Z., Kulisz J., Bartosik K., Woźniak A., Dzierżak M., & Khan A. (2021). Environmental determinants of the occurrence and activity of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of tick-borne diseases in eastern Poland. *Scientific reports*, *11*(1), 15472.

8. Příloha



Obrázek 1: Stanovení hodnoty IC_{50} UF střevních homogenátů. Veškeré výpočty včetně statistické úpravy dat byly provedeny v programu GraphPad Prism 8.



Obrázek 2: Stanovení hodnoty IC_{50} 5D střevních homogenátů. Veškeré výpočty včetně statistické úpravy dat byly provedeny v programu GraphPad Prism 8.