

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Vplyv albendazolu na expresiu vybraných enzýmův

Haemonchus contortus

Diplomová práce

Vedúca diplomovej práce:

doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Martina Božíková

PREHLÁSENIE:

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Každá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

Dátum:

Podpis:

Pod'akovanie:

Týmto by som chcela poďakovať školiteľke doc. Ing. Petre Matouškovej, Ph.D. za jej odborné vedenie, ochotu, trpezlivosť, cenné poznatky, rady a pripomienky potrebné pri riešení tejto diplomovej práce. Taktiež by som chcela poďakovať pracovníkom Katedry biochemických vied za možnosť vypracovania diplomovej práce na tejto katedre a za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Martina Božiková

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vplyv albendazolu na expresiu vybraných enzýmův *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus je dominantný gastrointestinálny patogén malých prežúvavcov, ktorý môže spôsobiť oslabenie až smrť hostiteľského organizmu. Straty sú zaznamenávané hlavne u mladých jedincov, čo sa následne odzrkadľuje aj na samotnej ekonomike chovu. Z toho dôvodu prevencia a terapia stále zohrávajú najvýznamnejšiu úlohu. Avšak na druhej strane, zvýšená schopnosť červov prežiť túto liečbu predstavuje závažný problém. Jednou z možností vzniku rezistencie je zvýšená aktivita enzýmův, ktoré sú zodpovedné za metabolizmus xenobiotik. Cieľom diplomovej práce bolo sledovať vplyv albendazolu (ABZ) na expresiu vybraných génův biotransformačných enzýmův UDP-glykozyltransferáz (UGTs). Pre tento účel boli vybrané dva kmene *H. contortus* – citlivý na anthelmintiká ISE (*Inbred Susceptible Edinburgh*) a rezistentný na anthelmintiká WR (*White River*). Jedna časť parazitov bola kultivovaná v médiu s obsahom albendazolu po dobu dvanásť hodín, druhá časť, ktorá slúžila ako kontrola bola kultivovaná v médiu bez obsahu liečiva. Následne bola meraná génová expresia dvanásťich vybraných UGTs pomocou kvantitatívnej PCR. Výsledky ukázali signifikantné zvýšenie génovej expresie u dvoch vzoriek rezistentného WR kmeňa po ovplyvnení ABZ, a to: u samíc pre gén kódujúci UGT365B6 a u samcov pre gén kódujúci enzým UGT365B3.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martina Božíková

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of albendazol on the expression of selected enzymes in *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus is the dominant gastrointestinal pathogen of small ruminants that can cause weakening or even death of the host organism. Losses are mainly recorded in young animals, which subsequently reflects on the farm economy itself. Therefore, prevention and therapy still play the most important role. On the other hand, the increased ability of worms to survive this treatment poses a serious problem. One of the possibilities that might be causing this problem is the increased activity of enzymes responsible for the metabolism of xenobiotics. The aim of this master's thesis was to investigate the effect of albendazole (ABZ) on the gene expression of selected biotransformation enzymes; UDP-glycosyltransferases (UGTs). For this purpose, two strains of *H. contortus* – anthelmintics-susceptible ISE (*Inbred Susceptible Edinburgh*) and anthelmintics-resistant WR (*White River*) were selected. One group of the parasites was cultivated for 12 hours in a media containing albendazole, the other group, which served as control, was cultivated in a drug-free medium. Subsequently, the gene expression of 12 selected UGT enzymes was measured by quantitative PCR. The results showed a significantly increased gene expression in 2 samples of the resistant WR strain after ABZ treatment, namely: in the females the gene encoding UGT365B6 and in the males the gene encoding UGT365B3 were affected by ABZ.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická časť	11
2.1	Haemonchus contortus	11
2.1.1	Základná charakteristika.....	11
2.1.2	Vývoj.....	12
2.1.3	Patogenéza	13
2.1.4	Klinické príznaky	14
2.1.5	Diagnóza.....	15
2.1.5.1	Koprologické vyšetrenie.....	15
2.1.5.2	<i>Post-mortem</i> diagnostika	15
2.1.5.3	FAMACHA© test	16
2.1.5.4	Biochemické a imunologické testy	17
2.1.5.5	Molekulárna diagnostika	17
2.2	Terapia helmintóz.....	17
2.2.1	Úvod do terapie.....	17
2.2.2	Anthelmintika	18
2.2.2.1	Benzimidazoly	20
2.2.2.1.1	Albendazol.....	21
2.3	Rezistencia.....	22
2.3.1	Mechanizmus rezistencie.....	22
2.3.2	Haemonchus contortus ako modelový organizmus.....	23
2.3.3	Rezistencia na benzimidazoly.....	24
2.3.4	Diagnostika rezistencie.....	25
2.3.4.1	<i>In vivo</i> test rezistencie	25
2.3.4.2	<i>In vitro</i> testy rezistencie.....	25

2.3.4.2.1	Test liahnutia vajčok	26
2.3.4.2.2	Test vývinu lariev.....	26
2.3.4.3	Molekulárne testy rezistencie	26
2.4	Metabolizmus xenobiotík	27
2.4.1.1	Metabolizmus xenobiotík u helmintov.....	28
2.4.2	Enzýmy 1. fázy biotrasformácie	28
2.4.3	Enzýmy 2. fázy biotrasformácie	30
2.4.4	Membránové efluxné transportéry	31
2.4.5	Biotrasformácia albendazolu	32
3	Cieľ štúdie	34
4	Experimentálna časť	35
4.1	Biologický materiál, použité chemikálie a prístrojové vybavenie.....	35
4.1.1	Biologický materiál.....	35
4.1.2	Použité chemikálie	35
4.1.3	Prístrojové vybavenie	36
4.1.4	Pracovné pomôcky	37
4.2	Pracovné postupy	37
4.2.1	Izolácia RNA TRI reagentom	37
4.2.2	Meranie koncentrácie RNA	39
4.2.3	Ošetrenie DNázou I.....	39
4.2.4	Reverzná transkripcia	39
4.2.5	Real-time PCR	41
4.2.5.1	Kvantifikácia PCR	41
4.2.5.2	Fázy PCR.....	42
4.2.6	Analýza dát	45
4.2.6.1	Štatistická analýza dát	46

5	Výsledky	47
5.1	Koncentrácia a čistota RNA	48
5.2	Konštitutívna génová expresia.....	49
5.2.1	Porovnanie expresie medzi pohlaviami citlivého kmeňa	49
5.2.2	Porovnanie konštitutívnej expresie medzi kmeňmi	50
5.3	Expresia vybraných enzýmov po ovplyvnení albendazolom	51
5.3.1	Porovnanie expresie po ovplyvnení albendazolom u citlivého kmeňa	51
5.3.2	Porovnanie expresie po ovplyvnení albendazolom u rezistentného kmeňa	52
6	Diskusia.....	54
7	Záver	58
8	Zoznam skratiek	59
9	Zdroje	61

1 Úvod

Helmintózy sú ochorenia spôsobené parazitickými červami. Tieto ochorenia postihujú nielen ľudí, ale aj voľne žijúce, domáce i hospodárske zvieratá. Jedným z pôvodcov ochorenia je aj vlasovka slezová, lat. *Haemonchus contortus*. *H. contortus* sa radí medzi jedných z najdôležitejších parazitov malých prežúvavcov, a to predovšetkým vďaka vysokej patogénnosti a rozšírenému výskytu, najmä v tropickom, subtropickom a miernom klimatickom pásme. Živí sa krvou z kapilár v sliznici žalúdka a spôsobuje hemoragickú gastritídu, anémiu a často vedie až k smrti postihnutých zvierat. Tento nematód každoročne spôsobuje farmárom veľké ekonomické straty.¹

Na prevenciu a liečbu helmintóz sa už dlhé roky používajú anthelmintiká. Jednou zo skupín týchto liečiv sú benzimidazoly, medzi ktoré patrí aj, v štúdiu používaný, albendazol. Jeho mechanizmus účinku spočíva v inhibícii polymerácie tubulínu, čo vedie k poruche metabolizmu parazita a následne jeho smrti.²

Nadmerné a často neopodstatnené používanie antihelmintik vyústilo do vzniku rozsiahlej a závažnej odolnosti nematód voči týmto liečivám. V súčasnej dobe sú hlásene rôzne stupne rezistencie voči všetkým skupinám anthelmintík. Skutočnosť, že rezistencia na monepantel, najnovšie anthelmintikum, sa vyskytla v priebehu menej ako štyroch rokov od uvedenia lieku na trh, je určite znepokojujúcim varovným signálom. Závažnosť tohto javu dokladá aj fakt, že na niektorých farmách v južnej Afrike a v Austrálii už nie je naďalej možný chov oviec z dôvodu rezistencie. V kontexte rýchleho šírenia a ekonomického dopadu anthelmintickej rezistencie je naliehavé pochopiť mechanizmy a genetiku jej vzniku, monitorovať ju a navrhnúť účinné stratégie na minimalizáciu vplyvu anthelmintickej rezistencie.^{3,4,5}

Možnosti vzniku rezistencie sa dajú chápať ako genetické zmeny v cieľovom mieste anthelmintika, zmeny v transporte alebo zmeny v metabolizme liečiv v rámci parazita. Helminty disponujú tzv. enzýmami metabolizujúce xenobiotiká, ktoré ich potenciálne chránia pred toxickými xenobiotikami, akými sú aj anthelmintiká, čím sa znižuje účinnosť anthelmintickej terapie a môžu prispieť k rozvoju rezistencie na liečivá. Viaceré štúdie ukázali priamy vzťah medzi zvýšenou expresiou transformačných enzýmov a rezistenciou na anthelmintiká u *H. contortus*. Medzi tieto enzýmy patria aj enzýmy druhej metabolizačnej fázy UDP-glykozytransferázy (UGTs).^{5,6,7}

Keďže rezistencia má genetický základ, môže byť detegovaná aj ako zmena v génovej expresii. Táto diplomová práca skúma expresiu vybraných dvanástich biotransformačných enzýmov UGTs v rámci kmeňov *H. contortus* citlivých a multirezistentných na anthelmintika. Najskôr sa porovnávali rozdiely v konštitutívnej expresii medzi pohlaviami u citlivého kmeňa a zmeny v konštitutívnej expresii medzi citlivým a multirezistentným kmeňom u samíc a samcov. V druhej časti diplomovej práce sa skúmal vplyv albendazolu na génovú expresiu vybraných enzýmov medzi samicami a samcami citlivého a multirezistentného kmeňa.

2 Teoretická časť

2.1 Haemonchus contortus

Klasifikácia:

Vlasovka slezová patrí do kmeňa Hlístovce (Nematoda), triedy Secernentea, radu Strongylida, čeľade Trichostongylidae a rodu *Haemonchus*.⁸

2.1.1 Základná charakteristika

Červy sú nitkovitého tvaru. Na prednom konci majú rudimentálnu ústnu kapsulu, ktorá obsahuje kyjovitý zub, ktorým narušujú stenu ciev. Jedince *H. contortus* sú oddeleného pohlavia. Samice dorastajú do dĺžky 20 – 30 mm a majú charakteristické sfarbenie (Obr. 1 vpravo), ktoré pozostáva z krvou naplneného čreva a nápadných bielych reprodukčných orgánov, ktoré sa vinú okolo čreva. Samce majú telo obecnne menšie a tenšie. Dorastajú zväčša do dĺžky okolo 20 mm. Na Obr. 1 vľavo môžeme vidieť kopulačné orgány samcov, ktoré sa nazývajú *bursa copulatrix*. *H. contortus* je jeden z najplodnejších nematód z radu Strongylida. Patogénne sú predovšetkým larvy (L₄) a dospelý jedinci. Jednotlivé samice produkujú tisíce vajícok denne, čo môže viesť k rýchlej kontaminácii pasienkov a k prepuknutiu hemonchózy. Jedna hlística je schopná odsasť svojmu hostiteľovi až 50 µl krvi. *H. contortus* produkuje vápnik a látku viažucu faktor zrážanlivosti známu ako kalretikulín, čo uľahčuje parazitovi živenie sa krvou hostiteľa.^{7,8,9,10}



Obr. 1 Pohlavný dimorfizmus *H. contortus*.¹¹

Samček (vľavo) s výraznými kopulačnými orgánmi, tzv. *bursa copulatrix*. Samička (vpravo) s charakteristickým sfarbením.

2.1.2 Vývoj

Vývoj je priamy, teda bez medzihostiteľa. Sexuálne dimorfní dospelí jedinci sa nachádzajú v tráviacom trakte, kde oplodnená samička kladie 5000 až 10 000 vajíčok denne, ktoré sa trusom dostávajú von z hostiteľského organizmu. Priebeh vývoja a liahnutia vajíčok závisí na vlhkosti a teplote prostredia. Za optimálnych podmienok sa z vajíčok vyliahnú larvy za 1 až 2 dni. Vývoj *H. contortus* pozostáva zo štyroch štádií lariev (označených ako L₁ – L₄). Prvé tri stupne sa vyvíjajú mimo hostiteľský organizmus. Štádia L₁ a L₂ nie sú infekčné. Po vyliahnutí sa larvy živia baktériami prítomnými vo výkaloch alebo inými mikroorganizmami. Prekonávajú dve zvliekania. Výsledok druhého zvliekania je larva L₃, ktorá je už infekčná pre hostiteľa. Larvy L₃ kutikulu predchádzajúceho štádia neodvrhujú, ale vytvoria si na nej novú vrstvu. Nová kutikulárna vrstva chráni larvu pred meniacimi sa vonkajšími podmienkami, ale na druhej strane zabraňuje kŕmeniu. Larvy aktívne migrujú z výkalu, alebo sú z neho pasívne odstránené. Zvieratá sa nakazia orálnym požitím lariev L₃. Tie prechodom cez žalúdok hostiteľa stratia kutikulárnu vrstvu. Po požití sa parazit musí dostať cez tri žalúdky, aby sa dostal do abomasu, kde sa v mukóze vyvíja štvrté larválne štádium L₄. Z larválneho štádia L₄ sa vyvíjajú dospelí jedinci, ktorí žijú pomerne krátko, prežívajú v hostiteľovi iba niekoľko mesiacov.^{7,9,12}

Dĺžka vývoja lariev závisí od podmienok okolia, a to predovšetkým od teploty a vlhkosti (Tab. 1). Larvy neinfekčného štádia v nepriaznivých podmienkach, ktorými sú sucho a vysoké alebo nízke teploty, rýchlo hynú. Akonáhle parazit dosiahne infekčného štádia, vplyv teploty a vlhkosti je menej výrazný. Larvy L₃ štádia v nepriaznivom prostredí prejdú do tzv. latentného stavu – hypobiózy. Podstatou tohto stavu je pozastavenie endogénneho vývoja parazita v hostiteľovi, ako reakcia na vonkajšie faktory. Hypobiózne štádia majú minimálny metabolizmus, čo má aj dopad na citlivosť tohto štádia k farmakoterapii. V tomto stave vykazuje parazit minimálnu patogenitu, avšak ho nejde pomocou dospelých známych intravitálnych diagnostických metód dokázať. Vďaka hypobióze vedia larvy L₃ prežiť nepriaznivé podmienky vonkajšieho okolia, ktoré by mohlo negatívne ovplyvniť ich larválny vývoj. Parazity môžu zotrvať aj niekoľko rokov v tomto štádiu. V našich geografických šírkach sa *H. contortus* nachádza v tomto štádiu prevažne v zimných mesiacoch.^{7,9,10}

Ako už bolo spomínané, vývoj larválnych štádií je určený predovšetkým teplotou a množstvom zrážok. Ak je niektorá z podmienok nepriaznivá (teplota a/alebo vlhkosť), dôjde k prerušeniu vývoja parazita. Zatiaľ čo oba faktory, teda teplota a aj množstvo zrážok, hrajú dôležitú úlohu

v regulácii vývoja v oblastiach mierneho pásma, v trópoch a subtrópoch sú zrážky jediným determinujúcim parametrom, pretože teplota v týchto oblastiach je vždy dostatočne vysoká pre tento proces. Z toho dôvodu, sú vo vlhkých trópoch/subtrópoch priaznivé podmienky viac menej celoročne. V miernom podnebí sa často objaví prekážka, ktorá nielen zníži vývoj lariev ale môže byť využitá v programoch na kontrolu parazita.¹³

Tab. 1 Vplyv teploty a vlhkosti na životaschopnosť jednotlivých vývojových štádií *H. contortus*.⁷

Vývojové štádium <i>Haemonchus contortus</i>			
Vajíčka		Larválne štádium	
Neembryované	Embryované	Neinfekčné L₁ a L₂	Infekčné L₃
Vysoká citlivosť na sucho a chlad.	Citlivé na chlad a sucho.	Vysoká citlivosť na chlad a sucho.	Optimálne podmienky sú teplo a vlhkosť.
Vysoká mortalita pri teplote <10°C.	Nízke liahnutie pri nedostatku vlhkosti a pri teplote < 10°C.		Nepriaznivá prognóza prežitia v suchom prostredí a pri teplotách pod bodom mrazu.

2.1.3 Patogenéza

H. contortus patrí doposiaľ medzi najpatogénnejšie parazity malých prežúvavcov. Význam hemonchózy je možné vysvetliť schopnosťou parazita produkovať veľké množstvo vajíčok, čo vedie k rozsiahlej kontaminácii pasienkov, ďalej jeho hematofágnou aktivitou, ktorá spôsobuje variabilné stupne anémie, straty produkcie a úmrtnosti jahniat a jeho schopnosťou prežiť nepriaznivé klimatické podmienky prostredníctvom hypobiózy. Priebeh ochorenia závisí od viacerých faktorov hostiteľa (vek, pohlavie, druh, imunitný stav), parazita (vývoj, adaptácia na nepriaznivé vonkajšie podmienky, produkcia toxických produktov) a prostredia (klíma, počasie, vegetácia). Patofyziológia hemonchózy a pridružené klinické prejavy sú predovšetkým spojené s anémiou, ktorá vzniká ako dôsledok straty krvi z hematofágnej aktivity parazita. Straty krvi sa objavujú s vývojom lariev štvrtého štádia. Anémia býva prvý krát detekovateľná 10 – 12 dní po infekcii. Odhaduje sa, že jeden dospelý *H. contortus* spôsobí za deň stratu krvi okolo 30 – 50 µl. Závažnosť ochorenia je úzko spätá s množstvom infekčných lariev v organizme, pretože je tu silná spojitosť medzi stratou krvi a počtom dospelých jedincov v organizme. Výsledok hemonchovej infekcie preto závisí vo veľkej miere na prijme infekčných lariev, schopnosti hostiteľa ich odmietnuť a vyrovnat' sa so stratou krvi. V závislosti

od intenzity infekcie a reakcie hostiteľa bola hemonchóza kategorizovaná do troch skupín: hyperakútna, akútna a chronická.^{7,10,14}

V pomerne vzácnej hyperakútnej forme je infekcia spôsobená až vyše 30 000 jedincami *H. contortus*. Príznakom je masívna strata krvi hemoragickou gastritídou, ktorá sa objavuje spolu s terminálnou anémiou. Úmrtia sa objavia zrazu, bez predchádzajúcich sprievodných znakov. Diagnóza sa zvyčajne stanoví až po pitve a je zrejmá kvôli veľmi veľkému množstvu červov v rôznych vývojových štádiách a početných krvácaní na povrchu sliznice.¹⁴

Pri akútnej forme sa anémia rozvíja počas relatívne dlhšieho obdobia. Smrť sa môže objaviť 4 až 6 týždňov od nakazenia v závislosti od príjmu lariiev. Pri pitve je jedinec bledý s výrazným ascitom a submandibulárnym edémom, čo odráža hypoproteinémiu, ktorá je výsledkom parazitickej aktivity *H. contortus*. Krv môže byť vodnatá a zlyháva v zrážaní. Morfologické a fyziologické účinky parazitov lokalizovaných v abomase zahŕňa: vývoj uzlín, hyperpláziu slizníc, povrchové poškodenie epitelu, zníženú sekréciu kyseliny chlorovodíkovej, zvýšené sérové koncentrácie gastrínu a pepsinogénu a dôkaz bunkovej odpovede imunitného systému.^{10,14}

Chronická hemonchóza je charakteristická infekciou menším množstvom, ale v organizme perzistujúcimi červami. Toto štádium môže zostať bez povšimnutia alebo sa stane viditeľný len vtedy, ak nastane príjem nových infekčných lariiev, a tým sa zvýši zamorenie červami, poprípade ak zlé nutričné podmienky znížia schopnosť hostiteľa tolerovať patogénne účinky. Chronická hemonchóza je najčastejšia v prostrediach, ktoré sú medzné pre rozvoj voľne žijúcich etáp alebo v menej priaznivých obdobiach. V sezónne endemických zónach je hemonchóza zvyčajne sprevádzaná infekciami s ďalšími hlístami. Nutričný stav hraje dôležitú úlohu v odolnosti voči hemonchovej infekcii. Zhoršenie kvality krmiva môže urýchliť príznaky resp. priebeh hemonchózy.¹⁴

2.1.4 Klinické príznaky

Klinické príznaky infekcie *H. contortus* závisia od počtu hematofágnych dospelých a od počtu lariiev prítomných v abomasu. Podieľa sa na nich aj rozdielna odolnosť jednotlivých jedincov a ich nutričný stav. Medzi klinické príznaky akútnej hemonchózy patrí hemoragická gastritída, edém (submandibulárny edém je častým príznakom, hoci pre hemonchózu to nie je patognomonický znak), problémy s dýchaním (hyperpnoe alebo tachypnoe), meléna (tmavé sfarbenie stolice, spôsobené obsahom natrávanej krvi), znížená tvorba vlny alebo svalovej

hmoty a niekedy aj náhla smrť. U chronickej formy môžu byť príznaky hemonchózy podobné malnutriácii, ktorými sú úbytok hmotnosti alebo nedostatočný príbytok na váhe, určitý stupeň anémie a slabosť. Pokiaľ je napadnutá laktatujúca bahnica, môže byť príznakom spomalený rast jahniat z dôvodu poklesu produkcie mlieka. V závislosti na nutričnom stave, menej závažné infekcie by mali pokračovať dlhšie, kým dôjde k značnému vplyvu na živočíšnu produkciu. Na rozdiel od mnohých iných gastrointestinálnych (GI) parazitov, *H. contortus* nie je primárnou príčinou hnačky. Hemonchóza sa však môže vyskytnúť spolu s inou nematódovou infekciou a tak sa hnačka môže vyskytnúť.^{7,9,14}

2.1.5 Diagnóza

Stanovenie diagnózy zohráva dôležitú úlohu pri vyšetrowaní epidemiológie parazita. Narastajúca rezistencia na anthelmintiká spôsobila, že je nevyhnutné hľadať nové alternatívne spôsoby jej zníženia. Jeden z najslubnejších prístupov sa javí liečenie iba tých jedincov, ktorí sú neschopní vysporiadať sa s infekciou sami. Prvým krokom je rozpoznanie klinických príznakov, ktoré sú spojené s ochorením, nasleduje mikroskopické vyšetrenie výkalov, popri prípade sérologické alebo biochemické vyšetrenie. Medzi najnovšie a najmodernejšie možnosti diagnózy patrí molekulárna diagnostika.^{1,7,9,15}

2.1.5.1 Koprologické vyšetrenie

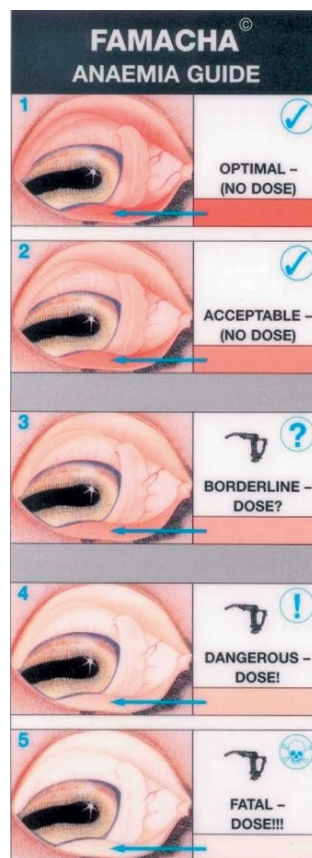
Pre účely diagnostiky infekcie parazitmi je jednou z najčastejších metód vo veterinárnej praxi práve vyšetrenie zvieracích výkalov (koprologické vyšetrenie). Je to neinvazívne, relatívne lacné a jednoduché vyšetrenie, ktoré dokáže odhaliť prítomnosť vajíčok a lariev helmintov. Okrem diagnostiky môže byť toto vyšetrenie použité aj napríklad pri stanovení intenzity infekcie, vyhodnotení účinnosti liečby alebo pri monitoringu zaťaženia stáda parazitmi. V týchto prípadoch sa využívajú kvantifikačné flotačné metódy. Princípom týchto metód je rozdiel hustoty medzi juvenilnými štádiami parazitov a flotačného roztoku, ktorý má vyššiu hustotu, a tým umožní vajíčkam a larvám smerovať k hladine, kde sú následne odobrané a podrobené mikroskopickému vyšetreniu.⁷

2.1.5.2 *Post-mortem* diagnostika

Postmortálne vyšetrenie predstavuje skupinu využívaných metód pri stanovení skutočného počtu nematód prítomných v určitej časti tráviaceho traktu hostiteľa. Nevýhodou tohto druhu vyšetrovacích metód je značná časová a personálna náročnosť.⁷

2.1.5.3 FAMACHA© test

H. contortus je pravdepodobne jediný helmintický parazit oviec a kôz, ktorý môže byť diagnostikovaný bez pomoci laboratórných testov. Príznaky anémie sú zrejmé. Práve tento klinický príznak sa využíva k diagnostike parazitárnej infekcie. Systém FAMACHA© poskytuje hodnotenie relatívnej anémie (akejkoľvek príčiny) a bol špeciálne vyvinutý na identifikáciu zvierat, ktoré potrebujú liečbu na individuálnom základe, na zníženie selekčného tlaku na anthelmintickú rezistenciu spôsobenú obvyklým (a častým) ošetrovaním všetkých zvierat v skupine. Tento jednoduchý diagnostický test je vhodný predovšetkým pre farmárov v rozvojových krajinách sveta, pre ktorých je laboratórne vyšetrenie príliš finančne náročné.^{1,7,15}



Obr. 2 FAMACHA© test.¹⁶

1-optimálny stav, 2-akceptovateľný stav, 3-hraničný stav, 4-stav ohrozenia, 5-stav fatálnej anémie

Iba FAMACHA© test bol dostatočne testovaný na použitie v praktických podmienkach hospodárstva. Na Obr. 2 môžeme vidieť ako FAMACHA© test vyzerá. Test pozostáva so série piatich obrázkov, ktoré vyšetrujú farbu spojivkového vaku prežúvavcov a vyhodnocujú ju pomocou piatich farieb od červeno-ružovej (štandardnej) po bielu (konečná anémia).¹⁵

2.1.5.4 Biochemické a imunologické testy

Podstatou biochemických metód je zmena hladiny proenzýmu pepsinogénu alebo hormónu gastrínu pri infekcií slezu GI parazitmi. Tieto metódy sú finančné náročnejšie, je potreba získať vzorku krvi a navyše ich využitie je obmedzené len na úzke spektrum GI parazitov, ktoré sa vyskytujú v sleze. Pričom netreba zabúdať, že existujú aj iné faktory, ktoré by mohli ovplyvniť hladinu gastrínu alebo pepsinogénu. Princípom imunologických metód je stanovenie antigénov parazita v krvi, krvnom sére alebo výkaloch, alebo stanovenie hladiny špecifických protilátok proti parazitom. Ale tak isto ako u biochemických metód tak aj u imunologických je ich využitie v rutínnej diagnostike relatívne obmedzené.⁷

2.1.5.5 Molekulárna diagnostika

Vývojom metód ktoré by na molekulárnej úrovni odhalili parazitárne ochorenie, sa zaoberá značné množstvo výskumných tímov po celom svete. A hoci boli vytvorené niektoré metódy, ktoré by boli schopné citlivo detegovať prítomnosť parazitov v organizme, ich rutinné celoplošné využitie pri diagnostike sa vidí v blízkej budúcnosti ako nereálne. Limitom je relatívne vysoká cena, potrebné prístrojové vybavenie, faktory, ktoré ovplyvňujú izoláciu a amplifikáciu DNA a ďalšie, ktoré preddefinujú využitie molekulárnych diagnostických metód predovšetkým na pracoviskách univerzitného a vedeckého typu.^{7,9}

2.2 Terapia helmintóz

2.2.1 Úvod do terapie

Gastrointestinálne parazity medzi, ktoré patrí aj *H. contortus*, môžu výrazným spôsobom negatívne ovplyvniť chov zvierat, preto je potrebné ich výskyt potlačiť na takú úroveň, aby bol dostatočne obmedzený ich negatívny dopad na zvieratá. Úspech opatrení závisí od včasného rozpoznania rizikových situácií, periodického monitorovania zaťaženia stáda parazitmi a od preventívnych programov, ktoré okrem anthelmintickej liečby zahŕňajú manažment pastvy a nechemické opatrenia. V súčasnej dobe tieto preventívne programy nie sú schopné úplne zastúpiť podávanie anthelmintík, znížia iba frekvenciu ich podávania. Z toho dôvodu je nevyhnutné, aby sme udržali účinnosť súčasných liečiv čo najdlhšie.^{2,3,7}

Aktivita liečiv závisí nielen od schopnosti viazať sa na špecifický receptor (farmakodynamika), ale tiež od ich schopnosti dosiahnuť vysoké a neprerušované koncentrácie v tkanivách, v ktorých sa parazit nachádza. Iba tak je umožnené dodanie účinnej koncentrácie liečiva

k receptoru v parazitickéj bunke a to v čase dostatočnom na vyvolanie terapeutického účinku. Existuje úzky vzťah medzi farmakokinetikou a farmakodynamikou (terapeutický účinok). Liečivo musí prejsť cez rozdielne bariéry, aby dosiahlo svoj špecifický cieľový receptor v rámci parazita. Disolúcia liečiva v GI tekutine je dôležitý jav pre liečivá vo forme suspenzií, ktoré sú podané orálne (napr. bezimidazoly, morantel/pyrantel). Disolúcia je kritický krok, pretože častice liečiva sa musia rozpustiť GI tekutine, aby mohli byť absorbované GI mukózou, a/alebo aby penetrovali cez vonkajší obal parazita. Nerozpustené častice liečiva prechádzajú cez trakt a sú vylúčené stolicou. Absorbcia liečiva je hlavný limitujúci faktor, ktorý determinuje množstvo liečiva, ktoré dosiahne systémovej cirkulácie. Reverzibilná výmena medzi krvou a tkanivami umožňuje liečivu dosiahnuť koncentrácie, ktoré sú anthelminticky aktívne v tkanivách, v ktorých je parazit lokalizovaný. Celkový farmakokinetický proces, zahrňujúci absorpciu, distribúciu do tkanív a transformáciu/elimináciu, je rozhodujúci na to, aby umožnil liečivu dosiahnuť cieľového parazita lokalizovaného v rôznych tkanivách v dostatočnej koncentrácii/čase na vyvolanie anthelmintického účinku. Nakoniec, prístup molekúl liečiva do intracelulárneho priestoru parazita závisí na ich schopnosti penetrovať cez vonkajšiu kutikulu u nematód alebo cez obal (tegumen) u cestód a trematód. Lipofilita, koncentrácia liečiva, fyzikálnochemické vlastnosti prostredia obklopujúce parazita a štruktúra v jeho vonkajšiemu povrchu sa radia medzi faktory, ktoré ovplyvňujú difúziu a akumuláciu aktívnej formy liečiva v cieľovom parazitovi. Konkrétny mechanizmus pôsobenia liečiv ovplyvní nástup a charakter anthelmintického účinku. Dohromady, tieto rozličné faktory určia konečnú anthelmintickú aktivitu.¹⁷

2.2.2 Anthelmintika

Za anthelmintika sú považované liečiva, ktoré odstránia helminta z hostiteľa, alebo tie ktoré zabránia infekcii po požití infekčných štádií parazita. Najrozšírenejšie helmintózy sú spôsobené tromi triedami červov – hlístovcami (Nematoda), motolicami (Trematoda) a pásomnicami (Cestoda). Liečivá možno rozdeliť podľa toho, na akú skupinu helmintov je ich účinok zameraný, na antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Mnohé anthelmintika môžu mať súčasne účinky proti viacerým triedam červov alebo aj proti pôvodcom vonkajších parazitóz (tzv. antiendoektoparazitika).^{7,18}

Tab. 2 predstavuje súhrn hlavných tried anthelmintík najčastejšie používaných na kontrolu ochorení spôsobených parazitickými červami, vrátane *H. contortus*. Účinnosť väčšiny anthelmintík závisí na ich afinite k špecifickým receptorom a na ich farmakokinetických

vlastnostiach, ktoré napomáhajú k dosiahnutiu účinnej koncentrácie liečiva v mieste pôsobenia.¹⁷

Tab. 2 Hlavné triedy antihelmintik používaných na liečbu nematódových infekcií u hospodárskych zvierat; ich spôsob účinku (ak je známy) a navrhované mechanizmy rezistencie.^{2,7,9,17}

Anthelmintická skupina	Mechanizmus účinku	Predpokladaný mechanizmus rezistencie
Benzimidazoly	Viažu sa na β -tubulin, a tým zabraňujú v tvorbe mikrotubulov. Spôsobujú inhibíciu v príjme glukózy, sekrécie proteínov a tvorbe mikrotubulov, čo vedie k vyhladovaniu parazita	Mutácia v géne pre β -tubulin vedie k štrukturálnym zmenám v β -tubulíne. Dôsledkom čoho sa liečivo nedokáže viac naviazať na cieľové miesto.
Imidazothiazoly/ tetrahydropyrimidíny	Obe skupiny fungujú ako agonisti nikotínových receptorov a spôsobujú spastickú paralýzu červov. Paralyzované červy sú vylúčené pomocou peristaltiky, čo vedie k rýchlemu odstráneniu prítomných červov.	Mechanizmus nie je známy. Možné zapojenie štrukturálnych zmien nikotínových acetylcholínových receptorov zabraňujúce navedeniu liečiva. Iná možnosť je zmena citlivosti receptora k acetylcholínu, čo môže viesť ku skříženej rezistencii s organofosfátmi.
Makrocyclické laktony (avermektín/mylbemycín)	Spôsobuje otváranie glutamát riadených chloridových receptorov, čo vedie k zvýšenému príjmu chloridových iónov do nervových buniek, a tým spôsobujú paralýzu červa.	Nie je presne objasnený. Možné je zapojenie mutácie v géne pre P-glykoproteín, čo môže viesť k zvýšeniu jeho funkcie a následnému zvýšeniu efluxu liečiva von z bunky.
Amino-acetonitrilové deriváty	Mechanizmus nie je známy. Predpokladá sa zapojenie podjednotky acetylcholínového receptora, ktorá je špecifická pre nematódy	Úplná alebo čiastočná strata génu, ktorý kóduje konkrétny typ acetylcholínového receptora.
Salicylanilidy	Odpojenie oxidatívnej fosforilácie	Mechanizmus nie je známy. Možná znížená disociácia liečiva z albumínu alebo zvýšený eflux liečiva z parazitických buniek .

Potrebu účinných anthelmintík na liečbu a prevenciu hemonchózy netreba podceňovať vzhľadom na značný patogénny potenciál *H. contortus*. Ich dlhodobé využívanie, nevhodná manipulácia a časté poddávkovanie vedie k zníženiu ich účinnosti a k zvýšeniu rozvoja rezistencie na jednotlivé skupiny anthelmintík.^{2,10}

2.2.2.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly (BZ) boli pôvodne vyvinuté ako rastlinné fungicídy, až neskôr ako veterinárne anthelmintiká. Predstavujú najstaršiu skupinu širokospektrálnych anthelmintík.¹⁹ Prvý vyvinutý a licencovaný benzimidazol pre humánne použitie bol tiabendazol v roku 1962.⁷

Benzimidazolové a pre-benzimidazolové anthelmintiká sú široko používané liečivá vo veterinárnej medicíne. Pre-benzimidazoly (febantel a netobimin) sú neaktívne proliečivá, ktoré sú metabolicky konvertované až v tele hostiteľa na anthelminticky účinné molekuly. Do tejto skupiny liečiv radíme celú radu zlúčenín, ktoré sa líšia svojou chemickou štruktúrou. Albendazol, fenbendazol a ich sulfoxidové deriváty (alabendazol sulfoxid tzv. ricobendazol a oxfendazol) sú momentálne najviac využívané benzimidazoly u prežúvavcoch. Sú indikované na odstránenie a kontrolu širokého spektra parazitických helmintov, vrátane pásomníc, abomasálnych a črevných nematód (dospelých aj lariev L₄), pľúcnych červov (dospelých aj lariev) a majú ovocídnu aktivitu. Navyše, albendazol je účinný aj voči dospelým motoliciam (*Fasciola hepatica*). Mechanizmus účinku je založený na väzbe na parazitický β -tubulín, čo spôsobuje poruchu pri tvorbe mikrotubulov. Z toho dôvodu sú ovplyvnené všetky funkcie, ktoré na molekulárnej úrovni zabezpečujú mikrotubuly (bunkové delenie, zachovávanie tvaru bunky, pohyblivosť, bunková sekrécia, absorbcia potravy a intracelulárny transport). Bunky parazita tak nevedia prijať glukózu, dochádza k vyhladovaniu parazita na smrť.^{2,7,17}

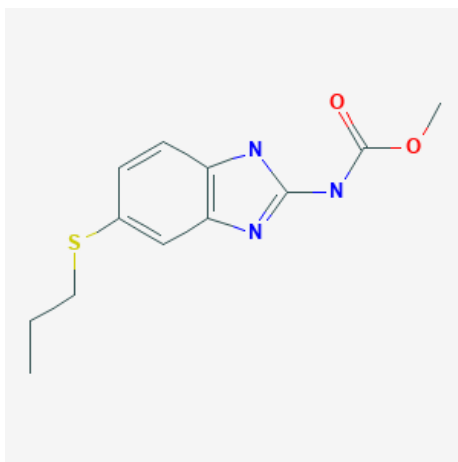
Toxicita väčšiny benzimidazolov pre cicavce je nízka, aj keď niektorý zo zástupcov vykazujú teratogenitu, takže ich použitie u gravidných samíc je limitované. BZ majú obmedzenú rozpustnosť vo vode. Hoci bolo vyvinutých viacero aplikačných foriem BZ, najčastejší spôsob podania je *per os*, a to v dávke 5-10 mg/kg. Liečiva z tejto skupiny patria medzi krátko pôsobiace anthelmintiká s minimálnym reziduálnym účinkom. Liečivo musí byť v kontakte s parazitom po dostatočný čas, aby bolo zaistené, že biochemické zmeny nasledujúce po narušení rovnováhy dynamiky tubulín-mikrotubuly, vyústia až do vypudenia parazita. Častice liečiva sa musia rozpustiť v črevnom obsahu, aby mohli byť absorbované GI mukózu. U prežúvavcoch sa benzimidazolová disolúcia odohráva najmä v abomase, kde jej napomáha nízke pH prostredia. Liečivo disolvované v GI tekutine je prístupné absorpcii a/alebo difúzii

cez kutikulu dospelých jedincov *H. contortus* lokalizovaných v abomase. Anthelmintikum, ktoré sa nerozpustí v črevnom obsahu, prechádza cez gastrointestinálny trakt (GIT) a je vylúčené stolicou bez vyvolania účinku.^{7,17}

Keďže benzimidazolové anthelmintiká sú prevažne podávané orálnou cestou, musíme zohľadniť „first-pass“ efekt pri kinetike týchto zlúčenín. Aromatické deriváty, akými sú fenbendazol a oxfenbendazol, vyžadujú rozsiahlejšiu oxidačnú metabolizáciu v pečeni, než alifatické deriváty (albendazol, a jeho sulfoxid) na dosiahnutie dostatočnej polarity na exkréciu. Biotransformácia sa odohráva prevažne v pečeni, hoci metabolická aktivita je zjavná aj v extrahepatálnych tkanivách akými sú pľúcny parenchým a intestinálna mukóza. Albendazol sulfoxid a oxfendazol môžu byť redukované späť na ich príslušný tioéter pomocou ruminálnej a črevnej mikroflóry, a to môže byť zdroj albendazolu a fenbendazolu v GIT.¹⁷

2.2.2.1.1 Albendazol

Na molekulárnej úrovni mechanizmus účinku všetkých benzimidazolov, vrátane albendazolu (ABZ), pozostáva z väzby na tubulín, štruktúrny proteín mikrotubulov.⁷



Obr. 3 Štruktúrny vzorec albendazolu.²⁰

Mikrotubuly sú dôležité organely, ktoré sa podieľajú na motilite, delení a sekrečných procesoch v bunkách všetkých živých organizmov. Blokovanie tvorby mikrotubulov v červoch spôsobuje narušenie vychytávania glukózy, čo vedie až k postupnému vyprázdneniu glykogénových zásob. Tým sa blokuje celý energetický metabolizmus parazita, ktorý je paralyzovaný, umiera a je vylúčený z organizmu preč. Vzhľadom na to, že ABZ poškodzuje bunkové delenie, je produkcia a vývoj vajícok taktiež blokovaný. To sa prejaví ako ovocídny účinok ABZ.²¹ Liečivo navyše inhibuje fumarátreduktázu špecifickú pre helminty. Je to enzým, ktorý sa podieľa na riadení energie buniek helmintov.²²

Čas nástupu účinku je relatívne dlhý. ABZ vyžaduje dlhší kontakt s parazitom a častejšie podávanie, na dosiahnutie vyčerpania energetických rezerv parazita. Po dvoch až troch dňoch parazit umiera. Zámena kyslíka za síru v mieste spojenia postranného reťazca a benzolového jadra zlepšuje farmakokinetické vlastnosti. Po perorálnom podaní sa až 45% podanej dávky vstrebáva do krvného obehu. Má značný distribučný objem, preto je účinný aj proti extraintestinálnym parazitom. U prežúvavcov pomalý prechod cez zložený žalúdok predlžuje čas, po ktorý môže byť ABZ absorbovaný. Maximálna koncentrácia v plazme je dosiahnutá po šiestich až tridsiatich hodinách. ABZ je proliečivo a je metabolizovaný pečeňou pomocou dvoch enzymatických systémov – a to cytochrómom P450 a FMO (flavín obsahujúci monooxygenázu) na svoju aktívnu formu (sulfoxid). V druhom oveľa pomalšom kroku sa sulfoxid ďalej metabolizuje v pečeni na sulfónový metabolit, ktorý nemá žiadnu anthelmintickú účinnosť. Časť produkovaného sulfoxidu sa uvoľňuje späť do bachora, kde ho bakteriálna flóra redukuje opäť na albendazol. To zvyšuje biologickú dostupnosť albendazolu u prežúvavcov.^{21,23,24}

Obličkami sa vylúči až 47 % liečiva do deviatich dní, pričom 28 % v prvých dvadsiatich štyroch hodinách. Dávka ABZ proti nematódovej infekcii u oviec je 5 – 10 mg/ kg. Liečivo je relatívne dobre tolerované s výnimkou gravidity, pretože ABZ je silný teratogén a embryotoxická látka už aj v malých koncentráciách.^{21,23}

2.3 Rezistencia

Rezistencia je všeobecne definovaná ako schopnosť organizmu prežiť dávku liečiva, ktorá by normálne zabila parazita rovnakého štádia a druhu. Na rezistenciu sa môžeme pozeráť ako na zmenu, ktorá spôsobuje, že účinnosť liečby je znížená v porovnaní s účinnosťou, ktorá bola dosiahnutá pri vstupe liečiva na trh. Rezistencia je dedičná. Jedince, ktoré odolali toxickému účinku farmakoterapie predávajú túto schopnosť ďalším generáciám. Doposiaľ nebola pozorovaná strata alebo zvrät už prítomnej rezistencie. Tento fenomén je v súčasnosti rozsiahlym problémom pri kontrole GI parazitov malých prežúvavcov v takmer každej oblasti sveta.^{3,25,26,27}

2.3.1 Mechanizmus rezistencie

Vzhľadom na pokroky v molekulárnej technológii sú čoraz viac objasnené mechanizmy rezistencie.²⁷ Mechanizmus rezistencie môže byť založený na farmakodynamickom alebo farmakokinetickom podklade. Farmakodynamický (špecifický) typ zahrňuje procesy, ktorými

sú zníženie cieľových molekúl a/alebo zmeny v ich štruktúre, pričom oba prípady ústia do zníženej účinnosti liečiva. Farmakokinetický mechanizmus vzniku rezistencie zahrňuje znížený príjem liečiva, zvýšený eflux liečiva von z bunky a zvýšenú inaktiváciu liečiva. V týchto prípadoch dochádza k zníženiu koncentrácie aktívnej formy liečiva v parazitickej bunke. Farmakokinetická (nešpecifická) rezistencia je založená na zvýšení expresie a aktivity enzýmov metabolizujúcich xenobiotiká. Vo všetkých organizmoch tieto proteíny slúžia ako účinná obrana proti potenciálnemu negatívnemu účinku liekov a iných xenobiotík. Niekoľko štúdií opísalo dôkaz priamej asociácie medzi enzýmami metabolizujúcimi xenobiotiká a rezistenciou na lieky u helmintov.^{4,6,26,28}

2.3.2 *Haemonchus contortus* ako modelový organizmus

H. contortus je najrozsiahlejšie študovaný nematód z čeľade Trichostrongylidae v súvislosti so vznikom rezistencie. To je čiastočne aj preto, lebo vykazuje značnú schopnosť rozvinúť rezistenciu voči všetkým hlavným skupinám anthelmintických liečiv. Rezistencia spôsobená týmto druhom má ekonomický dopad v celosvetovom meradle. Okrem ekonomického dôvodu je tento druh značnejšie študovaný, než iné aj vďaka svojej biológii a fyziológii, ktorá vytvára z *H. contortus* výborný modelový organizmus. Dospelé samice sú relatívne veľké a produkujú tisíce vajíec denne, čo umožňuje produkciu veľkého množstva biologického a genetického materiálu, navyše infekčné larvy (L₃) môžu byť životaschopne zakryokonzervované. Tiež štúdie *in vivo*, vrátane genetických krížení, sa môžu uskutočniť v prirodzenom hostiteľovi.^{26,29}

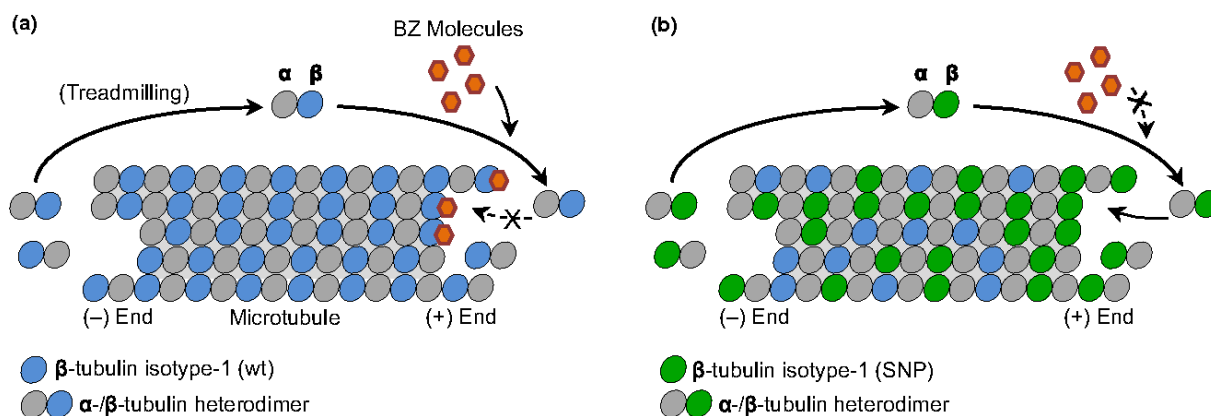
V niektorých prípadoch skorá evidencia mechanizmu rezistencie u laboratórne vybraných parazitoch nevysvetľuje rezistenciu pozorovanú u voľne sa vyskytujúcich jedincov. Existujú dva aspekty, ktoré môžu komplikovať objasnenie rezistencie u *H. contortus* a ďalších druhov.²⁶

- 1) Individuálne izoláty, vrátane laboratórne zvolených izolátov, nemusia vytvoriť reprezentatívny rozsah mechanizmov rezistencie, ktorá môže vzniknúť v prírode.
- 2) Rozdiely v genetickom pozadí parazita a prirodzenom selekčnom tlaku, ktorý pôsobí na parazita na rôznych farmách (vďaka rozličným liečebným režimom, ako aj vďaka rozdielnym environmentálnym podmienkam) môžu spôsobiť, že rezistencia na jednotlivé skupiny anthelmintík zistená v teréne zahrňuje rozdielne genetické zmeny a mechanizmy.

2.3.3 Rezistencia na benzimidazoly

Prvý hlásený prípad zníženia účinku tiabendazolu voči *H. contortus* sa vyskytol už tri roky po jeho uvedení na trh. Výskumy špecifickej rezistencie na BZ odhalili zmeny v genetickej sekvencii β -tubulínu. Môže byť spôsobená zmenou sekvencie β -tubulínu v jednom mieste, a to v poradí 200. aminokyseliny. Citlivé jedince majú toto miesto obsadené fenylalanínom (Phe), zatiaľ čo rezistentné tyrozínom (Tyr). Táto zmena v sekvencii aminokyselín predstavuje jednonukleotidový polymorfizmus (tzv. SNP- single nucleotide polymorphism). BZ sa viažu na β -tubulín s Tyr ako 200. aminokyselinou s menšou afinitou ako k β -tubulínu s Phe. Hlásené boli prípady ďalších mutácií spojených s rezistenciou na BZ (napr. v kodóne v pozícií 167 a 198). Avšak ich výskyt je pomerne vzácny v porovnaní s mutáciou na 200. kodóne.^{24,26,27}

Imidazolový cyklus v molekule BZ je kľúčový pre ich aktivitu. Protonácia a deprotonácia je dôležitá na transport liečiv cez membrány, zatiaľ čo karbamátová časť je zodpovedná za väzbu na β -tubulín. Alifatický postranný reťazec zabezpečí lepšiu mikrozomálnu oxidáciu v porovnaní s aromatickým systémom. Benzolové jadro BZ interaguje s Phe v 200. pozícií β -tubulínu na C-konci a Phe v 167. pozícií na N-konci vlákna. Tak oba Phe zohrávajú dôležitú rolu vo väzbe BZ na β -tubulín. Substitúcia Tyr výrazne zníži schopnosť BZ naviazať sa na cieľové miesto, čo vysvetľuje rezistenciu na tieto liečivá (Obr. 4).²⁴



Obr. 4 Molekulárny mechanizmus rezistencie na BZ.³⁰

(a) Znárodňuje narušenie polymerácie β -tubulínu prostredníctvom naviazania BZ na podjednotku izotypu-1. (b) Štruktúralna zmena spôsobená SNP znižuje afinitu BZ molekúl k podjednotke β -tubulínu izotypu-1.

Štúdiá zaoberajúca sa fenotypovou rezistenciou naznačuje, že hoci genotyp génu pre izotyp-1 β -tubulínu je hlavným parametrom určujúcim stav BZ rezistencie u *H. contortus*, rozhodne nie je jediný mechanizmus podieľajúci sa na rozvoji rezistencie.³⁰ K jej vzniku a rozvoju môžu prispieť aj zmeny hladiny enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme alebo transporte liečiva,

ktoré následne modulujú jeho koncentráciu v mieste cieľového receptora. Tieto zmeny môžu byť spôsobené zníženým príjmom liečiva do bunky, zvýšeným efluxom z bunky, zvýšeným metabolizmom, inaktiváciou liečiva alebo zníženou aktiváciou v prípade proliečiv.⁴

2.3.4 Diagnostika rezistencie

Na hodnotenie účinnosti anthelmintík sú k dispozícii rôzne metódy *in vivo* a *in vitro*.⁷ Žiadna metóda však nie je dostatočne citlivá a zároveň univerzálne použiteľná pre všetky skupiny anthelmintík.²⁷

2.3.4.1 *In vivo* test rezistencie

FECRT (Faecal Egg Count Reduction Test) test je najčastejšie používaný na odhad účinnosti anthelmintík proti GI červom, akým je aj *H. contortus*. Tento test odhaduje anthelmintickú účinnosť, porovnaním počtu vajíčok červov v stolici infikovaných zvierat pred a po liečbe. Rezistencia sa považuje za prítomnú v testovanej populácii, ak percentuálna redukcia počtu vajíčok je menšia než 95 %. Tento test môže byť použitý pre všetky anthelmintické triedy, čo je veľká výhoda v porovnaní s inými testami. Avšak FECRT test má určité obmedzenia, ktoré ovplyvňujú jeho širšie uplatnenie. Medzi tieto obmedzenia patria náklady na jeho prevedenie, nedostatok presnosti v dôsledku nepresnej povahy techniky počítania vajíčok a biologickej odchýlke ich produkcie, ako aj nedostatok citlivosti. Napriek týmto nedostatkom stále ostáva v súčasnosti štandardným testom na detekciu rezistencie v teréne.^{26,27}

Medzi jedny z najpresnejších testov sa radia tzv. kontrolované testy na zvieratách. Základom je postmortálne zistenie počtu jedincov, ktorý prežili liečbu. Rezistencia sa považuje za prítomnú pokiaľ pokles počtu jedincov, ktorý prežili liečbu, je menší než 90% alebo v prípade, keď liečbu prežije viac než 1000 jedincov. Tieto testy sú však náročné na prevedenie a relatívne finančne nákladné, preto sa v bežnej praxi neuskutočňujú.⁷

2.3.4.2 *In vitro* testy rezistencie

Vedci dlhé roky hľadali alternatívu k FECRT testu. V mnohých prípadoch práve *H. contortus* slúžil ako modelový organizmus pre vývoj nových metód testov. Jednou z možností, ktorá bola preskúmaná, je použitie *in vitro* testov s využitím voľne žijúcich štádií parazita na meranie citlivosti k anthelmintikám, a tak detekovať každú zmenu v citlivosti, ktorá môže indikovať vznikajúcu rezistenciu. V porovnaní s FECRT, testy *in vitro* nevyžadujú ošetrovanie zvierat a je potrebná len jedna vzorka fekálií na jednotlivca (z ktorého môžu byť kultivované a izolované rôzne nematódové štádiá), čo znižuje náklady na odber vzoriek v teréne. Napriek tomu, že testy

in vitro sa v parazitologických výskumoch využívajú vo veľkej miere, tieto testy nie sú stále bežne dostupné pre rutinné použitie v diagnostických laboratóriách, najmä kvôli potrebe vyspelých technických zariadení a odborných znalostí. Medzi *in vitro* testy patrí test liahnutia vajíčok, test vývinu lariev a test pohyblivosti lariev. Tieto testy však majú veľkú nevýhodu v podobe testovania voči štádiám, na ktoré nie je liečivo primárne cielene, čiže nie voči dospelým jedincom. Okrem iného, najnovšie boli opísané aj molekulárne testy na detekciu BZ rezistencie.^{25,26}

2.3.4.2.1 Test liahnutia vajíčok

Test liahnutia vajíčok, z ang. Egg hatch assay (EHA), je najpoužívanejší *in vitro* test na určenie rezistencie k BZ. Je založený na meraní ovocidnej aktivity benzimidazolov. Nevyvinuté vajíčka sú vystavené štandardne účinnej dávke BZ. Ak prežijú a vyliahnú sa po LD₉₉, tak sú rezistentné. Ak sa EHA vykonáva paralelne s klesajúcimi koncentráciami, je možné vypočítať hodnoty LD₅₀ a porovnať so štandardom.^{27,32}

2.3.4.2.2 Test vývinu lariev

Test vývinu lariev (Larval development test- LDT) pozostáva z inkubácie vajíčok alebo lariev štádia L₁ s rôznymi koncentráciami liečiva. Test prebieha v mikrotitračných doštičkách so zmesou výživy za laboratórnych podmienok až do vývinu lariev štádia L₃. Počet jednotlivých larválnych štádií na konci testu sa vyjadří ako LD₅₀ – koncentrácia liečiva, ktorá spôsobila devitalizáciu 50% lariev. Tento test sa používa na zistenie účinnosti terapie ivermektínom.⁷

2.3.4.3 Molekulárne testy rezistencie

Molekulárne metódy na detekciu a kvantifikáciu rezistentných a/alebo identifikáciu genetických markerov spojených s rezistenciou na liečivo, by sa mohli stať mimoriadnym prínosom v diagnostike anthelmintickej rezistencie. Tieto testy by vedeli preukázať rezistenciu skôr, ako by nastalo terapeutické zlyhanie, alebo by sa rezistencia stala klinicky viditeľná v teste FECRT. Molekulárna diagnostika anthelmintickej rezistencie je však spojená s komplexným porozumením mechanizmov pôsobenia každej skupiny anthelmintík a genetického podkladu jej vzniku. V súčasnosti sa pomocou PCR môže detegovať len rezistencia na benzimidazoly. K dispozícii je molekulárny test, ktorý je založený na detekcii mutácie génu pre β -tubulín.^{7,25,27}

2.4 Metabolizmus xenobiotík

Xenobiotiká sú telu cudzie zlúčeniny, ktoré neslúžia ako zdroj energie alebo ako prekursor pre biomolekuly. Radíme medzi nich liečiva, potravinové aditíva (napr. konzervanty, farbivá), stimulanty a návykové látky, ale aj polutanty a kontaminanty životného prostredia. Vo všetkých živých organizmoch sa vyvinuli sofistikované mechanizmy detoxikácie xenobiotík. Metabolizmus xenobiotík zahŕňa ich biotransformáciu a transport v organizme. Biotransformácia sa odohráva v 2 fázach. Hlavné reakcie oboch fáz sú zhrnuté v Tab. 3. Oxidácia, redukcia a hydrolyza predstavuje hlavné reakcie 1. fázy biotransformácie xenobiotík. Tieto reakcie vedú buď k zavedeniu alebo odkrytiu reaktívnych hydrofilných skupín v štruktúre xenobiotika.^{33,34}

Druhú fázu metabolizmu predstavujú reakcie konjugačné, kde xenobiotikum alebo konverziou vzniknutý metabolit reaguje s endogénnou molekulou. Transport xenobiotika a jeho metabolitov býva niekedy označovaný ako tretia fáza metabolizmu xenobiotík.³³

Tab. 3 Základné reakcie 1. a 2. fázy biotransformácie.³³

1.fáza biotransformácie	2.fáza biotransformácie
Oxidácia	Glykozylácia
Redukcia	Sulfonácia
Hydrolyzácia	Metylácia
Hydratácia	Acetylácia
Izomerácia	Konjugácia s glutationom
	Konjugácia s aminokyselinami

Dôležitým dôsledkom biotransformácie je, že fyzikálne vlastnosti xenobiotika sa vo všeobecnosti menia z tých, ktoré podporujú absorpciu (lipofilnosť) na tie, ktoré podporujú vylučovanie v moči alebo stolici (hydrofilnosť).³⁴

Metabolizmus xenobiotík je katalyzovaný pomocou enzýmov metabolizujúcich xenobiotiká (XMEs). Zahŕňajú biotransformačné enzýmy a transportéry. Syntéza niektorých z týchto enzýmov sa spúšťa xenobiotikom (procesom indukcie enzýmu), ale vo väčšine prípadov sa enzýmy exprimujú konštitutívne (t.j. sú syntetizované v neprítomnosti rozpoznateľného

vonkajšieho stimulu). Vo väčšine prípadov biotransformácia ukončuje farmakologické účinky lieku a znižuje toxicitu xenobiotík. A tak enzýmy katalyzujúce biotransformačné reakcie často určujú intenzitu a trvanie účinku liekov a slúžia ako účinná obrana proti potenciálnemu negatívnemu účinku liekov a iných xenobiotík.^{6,34} Viaceré štúdie dokazujú priamu súvislosť medzi týmito enzýmami a rezistenciou na anthelmintiká u nematód.^{28,35}

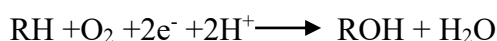
2.4.1.1 Metabolizmus xenobiotík u helmintov

Spomedzi všetkých skupín helmintov, najlepšie vyvinutý systém metabolizujúci xenobiotiká majú nematódy. Nematódy vlastnia relatívne veľké množstvo génov XMEs, a preto vytvárajú vyššie množstvo metabolitov než iné skupiny helmintov. Táto skutočnosť môže byť príčinou ich rýchleho vývoja rezistencie na anthelmintiká.⁶

2.4.2 Enzýmy 1. fázy biotrasformácie

Cytochrómy P450 (CYPs) tvoria veľkú nadrodinu enzýmov, ktoré sa vyskytujú vo všetkých živých prokaryotických aj eukaryotických organizmoch. Cytochrómy P450 sa vyskytujú v mnohých izoformách, ktoré sa radia do genetických rodín a podrodín podľa stupňa homológie ich primárnej štruktúry (poradia aminokyselín). Sú to hematoproteíny, v ktorých je porfyrínový skelet čiastočne viazaný hydrofóbnymi silami a zároveň prostredníctvom thiolátovej síry sulfhydrylovej skupiny cysteínu prítomného v aktívnom mieste enzýmu. V eukaryotických bunkách sú lokalizované prevažne v membráne hladkého endoplazmatického retikula a niektoré tiež v membráne mitochondrií. V prokaryotických bunkách sú rozpustené voľne v cytozole. CYPs metabolizujú širokú škálu endogénnych a exogénnych substrátov, a to predovšetkým prostredníctvom monooxydázového systému. Na druhej strane tieto enzýmy sú schopné sa správať aj ako reduktázy alebo peroxidázy. CYPs zvyšujú rozpustnosť substrátu, predovšetkým pridaním alebo odkrytím hydrofilnej skupiny.³³

Monooxygenázy sú enzýmy, ktoré viažu vzdušný kyslík, štiepia jeho molekulu – jeden kyslík zabudujú do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Tieto enzýmy spolupracujú s NADPH-CYP-reduktázou. Monooxygenázovu aktivitu CYPs voči substrátu (RH) môžeme súhrne zapísať nasledovnou rovnicou:³³



U stavovcov je známe, že nadrodina CYPs zahŕňa tzv. evolučne stabilné a nestabilné gény. Kým stabilné gény sú evolučne zakonzervované, fungujú v biosyntéze a metabolizme endogénnych substrátov a sú typicky zastúpené jedným členom v rodine, nestabilné gény

všeobecne vykazujú vysokú mieru duplikácie/ eliminácie génov, pričom kódujú enzýmy metabolizujúce xenobiotické substráty. Genóm *C. elegans* kóduje viac ako 80 CYPs a niekoľko z nich, najmä členovia rodiny CYP35, sa ukázali byť indukovateľné xenobiotikami. Bola hlásená zvýšená génová expresia CYP35C1, CYP35A5 a CYP35A2 v *C. elegans* po expozícii albendazolom.³⁰

Nadrodina CYPs zakódovaná v genóme *H. contortus* je značne menšia v porovnaní s *C. elegans* avšak boli identifikované štyri CYPs, ktoré tvoria sesterskú rodinu k xenobiotikami indukovateľnými rodinám CYP *elegans* CYP CYP34 a CYP35. Táto rodina je označovaná ako CYP34/35. Zistilo sa, že konštitutívna expresia jedného člena tejto rodiny (HCOI100383400) je signifikantne 2,4 - 3,7-násobne vyššia u multirezistentného kmeňa. Aj keď je toto zvýšenie len mierne, tento gén môže byť zapojený do BZ rezistencie na vysokej úrovni tým, že ďalej znižuje citlivosť u izolátov, ktoré už nesú 100% SNP β -tubulínu.³⁰

Okrem CYPs existujú aj ďalšie enzýmy, ktoré majú monooxidázovú aktivitu. V organizme sa nachádza mnoho ďalších enzýmov, ktoré sú schopné xenobiotika biotrasformovať oxidačnou cestou. Napr. zlúčeniny obsahujúce heteroatómy (napr. S, N alebo P) môžu byť dobré substráty pre tzv. flavínové monooxygenázy (FMOs). FMOs sú proteíny lokalizované v hladkom endoplasmatickom retikule. Majú monomérnu štruktúru a obsahujú jednu molekulu flavínového koenzýmu FAD (flavínadenín-dinukleotid). Tieto enzýmy spolupracujú s NADPH, ktorý je pre nich zdrojom redukčného ekvivalentu.³³

Ďalšou oxidázou podieľajúcou sa na biotransformácií xenobiotik je aj peroxidáza. Peroxidázy tvoria rozsiahlu nadrodinu hemoproteínov a patria k najdôležitejším intracelulárnym enzýmovým antioxidantom. Aj keď hlavnou funkciou peroxidáz je odstránenie toxického peroxidu vodíka alebo rôznych organických hydroperoxidov, môžu peroxidázy oxidovať aj niektoré xenobiotické substráty. Medzi najvýznamnejších zástupcov zo skupiny peroxidáz patria glutathionperoxidázy (GPx). Sú to tetramerné glykoproteíny, ktoré v mieste aktívneho centra majú selenocysteín.³³

Biotrasformácia xenobiotik prostredníctvom redukcie sa všeobecne vyskytuje menej často v porovnaní s oxidáciou. Avšak aldehydy a ketóny sú často metabolizované prostredníctvom reductáz/dehydrogenáz, ktoré sú klasifikované do mnohých tried vrátane krátko-reťazových dehydrogenáz/reductáz (SDRs) a aldo-keto reductáz (AKRs). V genóme helmintov, sa nachádza relatívne veľký počet SDR/AKR génov, zdôrazňujúc dôležitosť reductáz v metabolizme xenobiotik u helmintov.⁶

2.4.3 Enzýmy 2. fázy biotrasformácie

Na 2. fáze biotrasformácie sa zúčastňujú konjugačné enzýmy, ktoré xenobiotikum alebo metabolit vzniknutý v 1. fáze konjugujú s endogénnou molekulou. Konjugačné reakcie vyžadujú dodanie energie, a preto sa väčšinou musí endogénna molekula pred konjugačnou reakciou aktivovať väzbou s makroergickým kofaktorom. Konjugačné reakcie katalyzujú rôzne transferázy. Sú to väčšinou cytosolické enzýmy s výnimkou UDP-glykozyltransferáz, ktoré sú mikrosomálne enzýmy. S výnimkou metylácie a acetylácie vedú biotransformačné reakcie fázy II k veľkému zvýšeniu hydrofilítity xenobiotík, takže výrazne podporujú vylučovanie cudzích chemikálií. Konjugačných reakcií existuje niekoľko typov. Typ konjugácie u určitej zlúčeniny závisí predovšetkým od jej štruktúry. Rozhodujúca je prítomnosť funkčných skupín v štruktúre, v menšej miere potom jej priestorové usporiadanie a elektrónové vlastnosti. Často môže jedno xenobiotikum podliehať viacerým typom konjugačných reakcií. Navyše, existujú veľké rozdiely v zastúpení aj v aktivite konjugačných enzýmov v rámci rôznych organizmov, preto môžeme nájsť u rôznych druhov rôzne konjugáty toho istého xenobiotika. Medzi najčastejšie typy konjugácie sa radí konjugácia s kyselinou glukuronovou, sulfonácia, konjugácia s glutathionom, acetylácia, konjugácia s aminokyselinami a metylácia.^{33,34}

Glutathion S-transferázy

Glutathion S-transferázy (GSTs) patria k multifunkčným XMEs, ktoré hrajú kľúčovú rolu v druhej fáze biotrasformácie. Hlavná funkcia GSTs spočíva v konjugácii zlúčenín obsahujúce elektrofilné centrum s tripeptidom glutathionom, avšak aj mnoho iných funkcií je spojených s GSTs. U helmintov, GSTs sa zúčastňujú na detoxikácii lipidových hydroperoxidov a karbonylových zlúčenín produkovaných pri oxidačnom strese. Navyše, GSTs prítomné u helmintov dokážu konjugovať glutathion so xenobiotikami ako aj naviazať na anthelmintiká. Hoci úloha GSTs v rozvoji rezistencie na liečiva a toxíny bola popísaná u rakovinových bunkách, bunkách rastlín a hmyzu, doposiaľ sa neobjavila žiadna informácia potvrdzujúca vzťah medzi expresiou a aktivitou GSTs a rezistenciou na anthelmintiká.⁶

UDP-glykozyltransferázy

UDP-glykozyltransferázy (UGTs) sú ďalšia skupina enzýmov zúčastňujúca sa druhej biotransformačnej fázy. Katalyzujú kovalentné napojenie hexózovej skupiny na lipofilné zlúčeniny, a tak zvyšujú ich hydrofilitu a dostupnosť influxným a efluxným transportérom. Aktivované cukorné zvyšky vo forme uridín difosfátu (UDP), napr. UDP-glukurónová kyselina, UDP-glukóza, UDP-xylóza alebo UDP-acetylglukosamín, sú konjugované pomocou

UGTs na hydroxyl, karboxyl, thiol, amín a karbonylovú funkčnú skupinu rôznych zlúčenín. Glukuronidácia a glukozylácia sú prevažujúce reakcie katalyzované prostredníctvom UGTs.⁶ Tieto enzýmy sú lokalizované v membráne hladkého endoplazmatického retikula (mikrosómov). Keďže sú lokalizované do lumen mikrosómu, je pre ich činnosť potrebný transportný systém pre kofaktory (aktivované cukorné zvyšky vo forme UDP sú tvorené v cytozole). Po konjugácii sa produkt a UDP (vedľajší produkt reakcie) vylučujú späť do cytozolu tým istým transportérom, ktorý sa používa na vstup kofaktora. Tieto enzýmy sa na základe sekvencie aminokyselín delia na rodiny a podrodiny. U ľudí sú najdôležitejšie izoformy rodín 1 a 2. Isoformy UGTs majú iba čiastočnú substrátovú špecifitu. Ak sa vyskytuje v organizme 2 a viac xenobiotík, môže dôjsť k ich súťaženiu o jednotlivé UGTs. Takže liečivo, ku ktorému má UGT vyššiu afinitu kompetitívne inhibuje iné súčasne podávané liečivo. Na druhej strane, liečivo môže zvýšiť aktivitu UGTs indukciou expsie ich génov.^{33,34}

Hoci glukozylácia je nezvyčajná konjugačná reakcia u stavovcov, je to hlavná cesta detoxikácie xenobiotík u rastlín a baktérií. Práve táto cesta metabolizácie bola zistená ako dominantná deaktivácia cesta pre benzimidazolové anthelmintiká akým je aj ABZ u *C. elegans* a *H. contortus*.⁶ *H. contortus* disponuje tridsiatimi dvoma génmi, ktoré sa delia do pätnástich rodín. Pri porovnaní konštitutívnej expsie génov kódujúcich UGTs u dospelých červoch *H. contortus* sa zaznamenali významné rozdiely v expresii medzi samicami a samcami. Konštitutívna expresia sa líšila aj medzi kmeňmi. Zistilo sa, že konštitutívna expresia UGT368B2 bola významne vyššia u testovaných rezistentných kmeňov ako u citlivého ISE kmeňa. Keďže rezistentné kmene sú schopné účinnejšie deaktivovať BZ prostredníctvom glykozylácie než citlivý kmeň, mohla by zvýšená konštitutívna expresia UGT368B2 prispieť k rozvoju rezistencie na BZ.⁵

2.4.4 Membránové efluxné transportéry

Membránové efluxné transportéry chránia organizmy pred potencionálne toxickým účinkom xenobiotík. Rozdeľujú sa do 5 rodín, z toho najviac študovaná skupina z pohľadu rezistencie je rodina ABC transportérov (ATP-binding cassette). Hlavnou funkciou ABC transportérov je ATP-dependný transport veľkého množstva štruktúrne nepríbuzných endogénnych ale aj exogénnych zlúčenín vrátane veľkého množstva liečiv. Jedným z mechanizmov rezistencie je aj zmena hladiny ABC transportérov, akým je napr. P-glykoproteín. Práve P-glykoproteín bol prvý objavený ABC transportér u helmintov, presnejšie *C. elegans*. Odvtedy bola existencia týchto transportérov hlásená aj u mnohých ďalších helmintov vrátane *H. contortus*. Viaceré

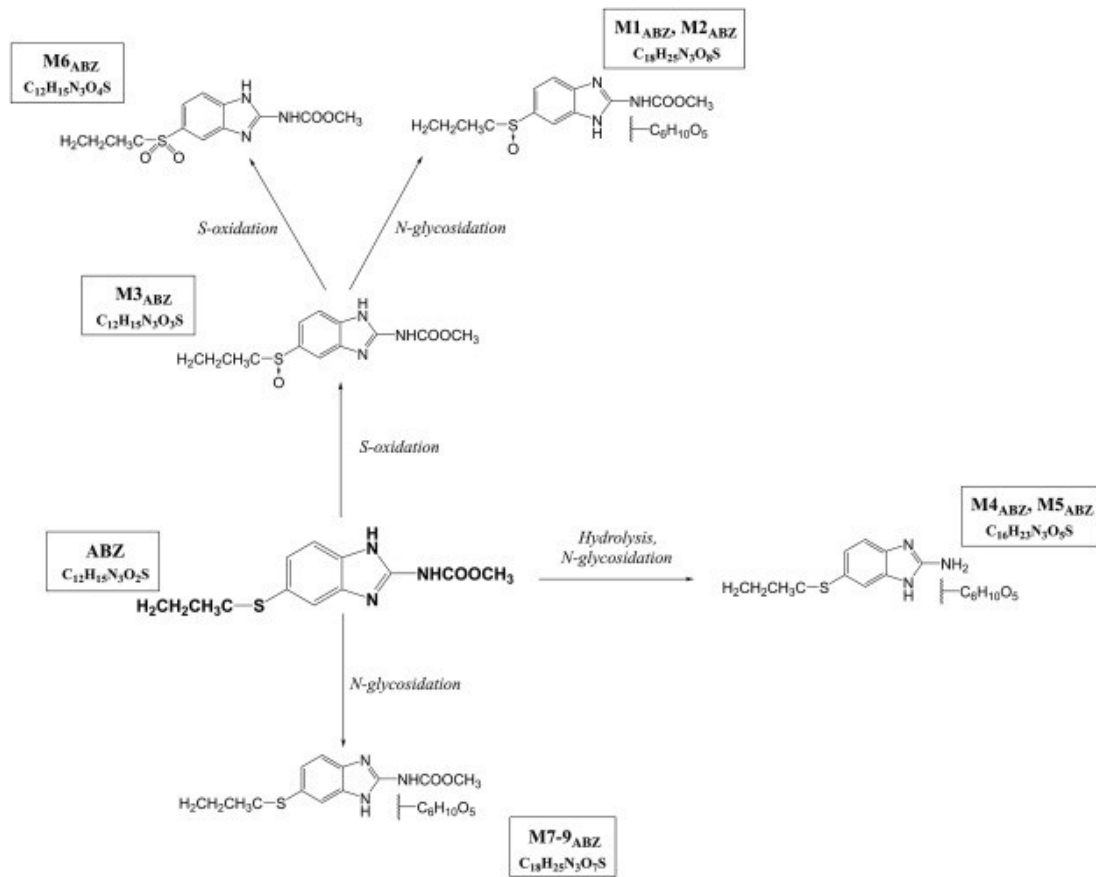
štúdie dokazujú zapojenie ABC transportérov do vzniku rezistencie na makrocyclické laktony, prevažne na ivermektín.^{4,6}

2.4.5 Biotrasformácia albendazolu

V prvej fáze biotrasformácie prevažovala S-oxidácia albendazolu. Prvou S-oxidáciou ABZ vznikol sulfoxid (ABS). Pričom sa zistilo signifikantne nižšie množstvo ABS u citlivého kmeňa v porovnaní s rezistentným. Druhou S-oxidáciou vznikol sulfón (ABSO). ABS sa považuje zodpovedný za systémovú biologickú aktivitu albendazolu, zatiaľ čo ABSO je farmakologicky inertný. Dôkazy z predklinických štúdií a mikrozomálnych vyšetrení poukazujú na zapojenie dvoch systémov do S-oxidácie ABZ. Ukázalo sa, že monooxygenázy obsahujúce flavín a cytochrómy P450 (CYPs) sprostredkujú konverziu ABZ na ABS, zatiaľ čo biotrasformácia ABS na ABSO zahŕňa len CYPs. Okrem S-oxidácie, bola pozorovaná aj hydrolyza karbamátového bočného reťazca počas biotrasformácie 1. fázy u *H. contortus*.^{28,36}

V druhej fáze biotrasformácie bola N-glykozidácia jedinou biotrasformáciou. Tri rozdielne N-glykozidy ABZ, dva N-glykozidy ABS a dva N-glykozidy hydrolyzovaného ABZ boli identifikované u dospelých jedincov *H. contortus*. Dokopy teda v 1. a 2. fáze biotrasformácie bolo zistených 9 rôznych metabolitov ABZ u *H. contortus* (Obr. 5).²⁸

Štúdia porovnávajúca metabolizmus ABZ u citlivého ISE kmeňa s rezistentným IRE (*Inbred Resistant Edinburgh*) kmeňom potvrdila, že jedinci z rezistentného kmeňa majú väčšiu schopnosť deaktivovať toto anthelmintikum pomocou metabolizmu než jedinci citlivého kmeňa. Nematódy z kmeňa IRE mali viac aktívnych resp. exprimovaných biotrasformačných enzýmov fázy I. ako aj fázy II. Navyše výsledky ukázali výrazné rozdiely aj medzi pohlaviami *H. contortus*. Jeden metabolit ABZ bol špecifický pre samice a tvorba niektorých ďalších metabolitov sa výrazne líšila medzi pohlaviami. Prevažne sa zistilo viac metabolitov u samíc než u samcov. Tvorba glukózových konjugátov sa všeobecne považuje za deaktiváciu liečiva a zvýšená schopnosť tvoriť glukozidy, môže veľmi pravdepodobne ochrániť *H. contortus* voči toxickému účinku anthelmintík.^{28,37}



Obr. 5 Navrhovaná metabolická dráha ABZ u dospělých helmintov rodu *H. contortus*.²⁸

3 Cieľ štúdie

Cieľom tejto diplomovej práce bolo preskúmať možnosti vzniku rezistencie prostredníctvom zvýšenia expresie biotransformačných enzýmov UGTs.

Na dosiahnutie záveru bolo potrebné:

- izolovať mRNA zo vzoriek ISE a WR kmeňa *H. contortus*;
- previesť mRNA na cDNA a replikovať pomocou realtime PCR;
- zistiť a porovnať konštitutívnu génovú expresiu vybraných enzýmov UGTs medzi dospelými samicami a samcami ISE a WR kmeňa;
- zistiť a porovnať indukovanú génovú expresiu vybraných enzýmov UGTs medzi dospelými samicami a samcami ISE a WR kmeňa po dvanástich hodinách kultivácie v médiu s anthelmintikom albendazolom;
- analyzovať výsledky.

4 Experimentálna časť

4.1 Biologický materiál, použité chemikálie a prístrojové vybavenie

4.1.1 Biologický materiál

Zdravé jahňatá (vo veku 2-4 mesiacov) boli infikované približne 5000-6000 kusmi lariev infekčného štádia L₃ *H. contortus*. Tieto jahňatá boli po dobu života chované v boxoch, izolované od vonkajšieho prostredia, aby sa predišlo ich infekcií inými gastrointestinálnymi parazitmi. Zo všetkými zvieratami bolo zaobchádzané podľa platných zákonov a zásad pre zaobchádzanie a prácu s laboratórnymi zvieratami (*Vyhláška o ochrane pokusných zvierat č.419/2012 Sb.* a *Zákon České národní rady na ochranu zvierat proti týrání č.246/1992 Sb.*).

Po siedmich týždňoch boli jahňatá usmrtené a dospelé červy rodu *H. contortus* vyňaté z abomasu. Na tento experiment boli použité dva kmene *H. contortus* – a to kmeň citlivý voči anthelmintikám- ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) a multirezistentný kmeň - WR (White river).

Samci a samice boli rozdelený ručne pod mikroskopom na základe ich pohlavného dimorfizmu (Obr. 1). Každá vzorka pozostávala z desiatich jedincov daného pohlavia a kmeňa. Časť vzoriek bola podrobená *in vitro* expozícií ABZ. Tri série vzoriek, každá pozostávajúca z 10 desiatich samíc alebo desiatich samcov oboch kmeňov, boli kultivované v médiu RPMI 1640 pri 37°C. K médiu bol pridaný ABZ, ktorý bol rozpustený v 0,1% DMSO (10µM ABZ). Pre kontrolné vzorky bol použitý iba čistý 0,1%DMSO bez ABZ. Po dvanástich hodinách boli červy prenesené priamo do TRI reagentu a zamrazené na -80°C.

4.1.2 Použité chemikálie

Albendazol- Sigma-Aldrich

DEPC (diethylpyrokarbonát) – Sigma-Aldrich

DNáza I – New England BioLabs

DMSO (dimetyl-sulfoxid)- Serva

DTT (dithiotreitol) – Sigma-Aldrich

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) – Sigma-Aldrich

etanol 99 % – Sigma-Aldrich

chloroform – Sigma-Aldrich

isopropanol – Sigma-Aldrich

Náhodné hexamery – Generi Biotech

Primery (GAPDH, UGTs) – Generi Biotech

qPCR kit: Xceed qPCR SG Mix – Lo-ROX – Institute of Applied Biotechnologies

RPMI 1640 médium- Sigma-Aldrich

RT (Reverzná transkriptáza): ProtoScript II – New England BioLabs

TRI reagent– Molecular Research centre

Zmes dNTP – Eurogentec

4.1.3 Prístrojové vybavenie

Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf

Bioanalyzátor – Bioanalyzer 2100, Agilent

Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo scientific

Guličkový homogenizér – FastPrep24, M.G.P.

Hlboko mraziaci box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific

Laminárny box – AURA 2000, M.A.C, BioAir

Laminárny box – UVC/T-AR, BioSan

Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific

PCR cykler – MJ mini, Bio-Rad

Prístroj pro Real-Time PCR – QuantStudio6, AppliedBiosystems

Scientific Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

Spektrofotometer – NanoDrop 2000, Thermo

4.1.4 Pracovné pomôcky

Stojany na skúmavky a mikroskúmavky, laboratórne sklo, pinzeta, mikroskúmavky Eppendorf, sterilné pipetovacie špičky, RNÁza free pipetovacie špičky, sklenené guľičky, nitrilové rukavice, pinzeta, plastové skúmavky, sklenené Pasteurove pipety, PCR doštičky

4.2 Pracovné postupy

4.2.1 Izolácia RNA TRI reagentom

TRI reagent je špecifická zmes fenolu a guanidín isothiokyanátu. Umožňuje selektívnu izoláciu celkovej RNA (tRNA, mRNA, rRNA, microRNA) z malého množstva tkanív alebo buniek. Pri izolácii RNA zostáva jej integrita počas homogenizácie tkanív. Pridanie chloroformu a následne stočenie na centrifúge rozdelí zmes na vodnú a organickú fázu. RNA sa bude nachádzať v hornej, vodnej fáze. Následné selektívne vyzrážanie RNA pomocou isopropanolu umožní izoláciu čistej RNA. TRI reagent, je pre prítomnosť fenolu, vysoko toxická látka. Navyše RNázy sú všade prítomné. Preto treba pri izolácii pracovať rýchlo a čisto, najlepšie v laminárnom boxe. Navyše pri práci je potrebné mať stále na sebe rukavice, nesiahat' si na vlasy, tvár a pod., radšej častejšie si meniť rukavice. Tým chránime nie len seba od toxického účinku fenolu, ale aj vzorky od možnej kontaminácie RNázami.

Zamrazené vzorky v skúmavkách boli prenesené do laminárneho boxu určeného výhradne na izoláciu RNA. Tam boli rozmrazené, aby sa predišlo kontaminácií vzoriek všadeprítomnými RNázami. Do skúmaviek boli vložené sklenené guľičky, ktoré v homogenizátore pomohli rozrušiť tkanivá červov. Po prvej homogenizácii bolo pridané 500 μ l TRI reagentu, a potom prebehla ďalšia homogenizácia. Vzorky potom stáli päť minút pri laboratórnej teplote. Po piatich minútach sa pridalo 100 μ l chloroformu a pätnásť sekúnd sa pretrepávalo v rukách. Ďalej vzorky stáli dve až tri minúty pri laboratórnej teplote. Po tomto procese nasledovalo pätnásť minútové stáčanie vo vychladenej centrifúge na 4°C pri preťažení 12 000g.

Pomocou centrifúgy došlo k oddeleniu organickej a vodnej fázy, ktorá obsahovala RNA (Obr. 6). Horná vodná fáza sa veľmi opatrne odpipetovala do novej 1,5ml skúmavky. Množstvo by malo byť približne 50% pôvodného TRI reagent, čiže približne 250 μ l. Tu si treba dať veľký pozor a špičkou sa nedotýkať medzifázy ani spodnej organickej fázy, pretože by mohlo dôjsť ku kontaminácií genómovou DNA alebo bielkovinami.



Obr. 6 Mikroskúmavka s oddelenými fázami po pridaní chloroformu

K odpipetovanej vodnej fáze sa pridalo 250 μ l isopropanolu, zmes sa premiešala na vortexe a nechala stáť pri laboratórnej teplote desať minút. Následne sa stočila – desať minút pri 4°C a pri odstredení 12 000g. Skúmavky sa nastavili tak, aby všetky smerovali otváraním do stredu centrifúgy, aby bolo zreteľné, kde máme predpokladať peletku RNA (na protiaľahlej strane skúmavky). Musí byť dobre viditeľná, nech sa predíde jej odsatiu. Po 10 minútach sa skúmavky opatrne vybrali z centrifúgy, aby nedošlo k poškodeniu peletiek a opatrne sa odstránil supernatant.

Peletky sa omyli 500 μ l 75% etanolom, ktorý bol čerstvo nariadený z absolútneho etanolu DEPC vodou. DEPC voda sa pripraví z redestilovanej vody, prídavkom 0,1% DEPC (diethylpyrokarbonát) Diethylpyrokarbonát funguje ako nešpecifický inhibítor RNáz.

Ďalej sa skúmavky zamiešali na vortexe a nechali stočiť 5 minút pri 4°C a preťažení 7 500g. Znova sa opatrne odstránil supernatant pomocou sklenenej Pasteurovej pipety s vytiahnutým koncom. Pokiaľ bol etanol dôkladne odsatý, stačilo peletku usušiť na vzduchu približne desať minút. Potom sa peletky rozpustili v DEPC vode. Peletky treba sledovať, ak by dochádzalo k ich spriehľadňovaniu skôr, treba takisto pridať DEPC vodu skôr, aby nedochádzalo zbytočne k ich nadmernému vysychaniu. Objem vody závisí od veľkosti peletky. Samčie peletky boli vo všeobecnosti menšie, a preto sa rozpustili pomocou 30 μ l DEPC vody, zatiaľ čo samičie, väčšie peletky, sa rozpúšťali v 40 μ l DEPC vody. Po premiešaní sa nechá stáť cez noc a nakoniec sa sterilizuje v autokláve pri 120°C 20 minút. Vzorok sa dôkladne premiešali a nechali stáť päť minút pri laboratórnej teplote, potom sa premiešali ešte raz. Nakoniec sa merala koncentrácia RNA pomocou Nanodropu.

4.2.2 Meranie koncentrácie RNA

Pred meraním koncentrácie na Nanodrope sme si všetky vzorky samíc desaťnásobne zriedili pridaním 27 μl DEPC vody k 3 μl rozpustenej RNA. Vzorky sme premiešali. Ešte v ten deň sa merala spektrofotometricky ich koncentrácia v $\text{ng}/\mu\text{l}$. Ak by sa merala koncentrácia iný deň, vzorky by sa nechali zamraziť na -70°C . Okrem meraní koncentrácií sa pomocou pomeru špecifických absorbancií fenolu a bielkovín zistovala prípadná kontaminácia fenolom alebo bielkovinami. Vzorky boli potom zamrazené na -70°C pre ďalšie použitie.

4.2.3 Ošetrenie DNázou I

Po meraní koncentrácie nasledovalo ošetrenie enzýmom DNázou I. Tento enzým selektívne štiepi DNA, ktorá by mohla spôsobiť prípadnú kontamináciu vzoriek.

Podľa koncentrácie získanej pomocou NanoDropu ($\text{ng}/\mu\text{l}$), sa pre každú vzorku vypočítalo množstvo potrebnej RNA vzorku v μl , aby výsledná koncentrácia bola 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a vypočítalo sa množstvo DEPC vody, ktorú treba pridať ku každej vzorke, aby výsledný objem bol 26 μl .

Ďalej ku každej vzorke sa pridali 4 μl mastermixu, ktorý sa skladá z 1 μl DNázy I a 3 μl pufru. Mastermix sa pripraví na množstvo trinásť vzoriek (dvanásť vzoriek + jedna rezerva). Reakčnú zmes (30 μl) teda tvorí 26 μl RNA v DEPC vode a 4 μl mastermixu. Vzorky boli premiešané na vortexe a stočené na minicentrifúge a následne inkubované po dobu desiatich minút pri 37°C . Po inkubácii sa ku vzorkám pridalo 1,5 μl 0,1M EDTA, ktorá ukončila aktivitu DNázy I. Vzorky sa opäť premiešali na vortexe a stočili na minicentrifúge. Následne sa vzorky po dobu 10 minút inkubovali pri teplote 75°C aby došlo k inaktivácii DNázy I. Následne sa k nim pridalo 18,5 μl DEPC vody. Finálny objem teda predstavovalo 50 μl . Koncentrácia RNA v tomto objeme predstavovala 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pokiaľ nenasledovala ihneď reverzná transkripcia, tak sa vzorky uchovávali v mrazničke pri teplote -70°C .

4.2.4 Reverzná transkripcia

Reverzná transkripcia je reakcia katalyzovaná enzýmom reverznou transkriptázou, ktorá na základe RNA syntetizuje komplementárnu jednovláknovú DNA (cDNA). Reverzná transkriptáza je RNA dependentná DNA polymeráza. Nato aby reverzná transkriptáza správne fungovala potrebuje k svojej činnosti primery. Primery fungujú ako „odrazové mostíky“, ktoré sa vďaka svojej komplementarite naviažu k templátovej RNA. Reverzná transkriptáza potom od miesta naviazania primeru syntetizuje podľa templátovej RNA komplementárny reťazec

DNA. Primery môže predstavovať zmes náhodných hexanukleotidov, poly-dT (komplementárne úseky k poly-A konci) alebo sa môžu použiť aj oligonukleotidy, ktoré sú špecifické ku konkrétnej sekvencii daného génu. Výsledok práce reverznej transkriptázy je hybridná molekula DNA-RNA.³⁸

V našej reakcii bola použitá zmes náhodných hexanukleotidov ako primerov. Keďže sa stále pracovalo s RNA, práce prebiehali v laminárnom boxe určenom výhradne na prácu s RNA. Ku 5 μ l RNA (čo predstavovalo 1 μ g RNA) sa pridal 1 μ l náhodných hexanukleotidových primerov. Zmes sa premiešala na vortexe. Vzorky sa potom vložili do PCR cyklieru, kde sa zahrievali po dobu päť minút pri 65°C. Toto zahriatie je dôležité kvôli denaturácii RNA a možného výskytu sekundárnych štruktúr, ktoré by mohli prekážať pri „nasadaní“ primerov. Po zahriati boli vzorky položené na chvíľu na ľad a následne krátko stočené na minicentrifúge. Kým vzorky boli v PCR cyklere, pripravil sa mastermix, v dostatočnom nadbytku z dôvodu možného výskytu pipetovacej chyby. (Zloženie mastermixu je uvedené v Tab. 4.)

14 μ l tohto mastermixu bolo pridané ku jednotlivým vzorkám, a tak konečný objem predstavoval 20 μ l. Táto zmes bola dôkladne premiešaná a následne vložená do PCR cyklieru. Tu sa zmes najprv zahriala na 25°C po dobu desať minút. V tejto fáze cyklu dochádza k nasadeniu primerov. Ďalšia fáza cyklu trvá päťdesiat minút, kedy cyklér zohrieva zmes na teplotu 42°C a tu dochádza k samotnej syntéze cDNA. Posledná fáza trvá päť minút, kedy dochádza k zahriatiu na 85°C, táto teplota denaturuje reverznú transkriptázu. Nakoniec sa k zmesi pridalo 80 μ l redistilovanej vody. Finálny objem teda činí 100 μ l, cDNA sa uchováva pri -20°C. Celý postup sa robí súbežne s kontrolnými vzorkami (noRT kontrola), kde reverzná transkriptáza je nahradená príslušným množstvom vody.

Tab. 4 Zloženie mastermixu pre reverznú transkripciu, uvedené objemy sú na jednu vzorku

	Mastermix s RT [μ l]	Mastermix bez RT-kontrola [μ l]
reakčný pufor	4	4
0,1 M DTT	2	2
10mM dNTPs	2	2
reverzná transkriptáza	0,5	-
DEPC voda	5,5	6
spolu	14	14

4.2.5 Real-time PCR

V tejto práci bola použitá metóda real-time PCR. Metóda kvantitatívnej real-time PCR je obmena štandardnej laboratórnej techniky polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s možnosťou kvantifikácie vznikajúceho produktu (amplikónu) po každom cykle a nie len na jeho konci. Množstvo DNA sa teda meria „za behu“ (ang. Real-time). Špeciálny termálny cyklér s detektorom fluorescencie meria buď zväčšujúce sa množstvo dvojvláknovej DNA v reakčnej zmesi (SYBR Green I), alebo množstvo sondy hybridizujúcej k cieľovej sekvencii amplikónu (TaqMan). Práve z dôvodu kvantifikácie DNA v reakčnej zmesi možno spätne vyrátať počiatočné množstvo templátovej DNA vo vzorke (napr. množstvo vírusu v tkanive), alebo zistiť relatívne množstvo DNA jednej vzorky vzhľadom na inú (napr. či je v tkanive po liečbe menej vírusu ako pred liečbou). Kvantitatívna real-time PCR sa označuje skratkou qPCR (ang. quantitative PCR = kvantitatívna PCR).³⁹

V našej reakcii bol použitý fluorescenčný substrát (farbivo) SYBR Green I. Ten je vzhľadom na DNA nešpecifický substrát (viaže sa kdekoľvek na DNA). Excitačné maximum SYBR Green I je v oblasti modrého svetla s vlnovou dĺžkou 497 nm a emisné maximum je v oblasti zeleného svetla s vlnovou dĺžkou 520 nm. SYBR Green I je fluorescenčne aktívny iba ak je naviazaný na dvojvláknovú DNA, ktorou je PCR produkt. Termálny cyklér po každom cykle excituje molekuly SYBR Green I modrým svetlom a následne zaznamená množstvo emitovaného zeleného svetla, ktoré odzrkadľuje množstvo PCR produktu. V niektorých prípadoch môže byť presnosť výsledkov pri použití SYBR Green-u nižšia než u špecifických fluorescenčných substrátov (pretože metóda deteguje prítomnosť každej dvojvláknovej DNA, "pozitívny signál" budú dávať aj nešpecifické amplikóny a primer-diméry). Avšak vďaka jeho všestrannosti a nízkej cene je najpoužívanejším fluorescenčným substrátom pre qPCR.^{39,40}

Pokiaľ pre qPCR používame farbivo SYBR Green, dá sa jednoducho skontrolovať, či pri reakcii nevznikajú nešpecifické produkty, alebo diméry primerov. K tomu sa používa krivka topenia, tzv. melting curve, ktorá využíva, že rôzne PCR produkty majú rôznu teplotu topenia. Krivka ukazuje zmenu intenzity fluorescencie v závislosti od meniacej sa teploty. Nešpecifické produkty majú obvykle nižšiu teplotu topenia, a preto ak má krivka topenia dva a viac vrcholov, znamená to, že okrem špecifických produktov vznikajú aj nešpecifické.⁴⁰

4.2.5.1 Kvantifikácia PCR

Kvantifikácia je prevedená buď ako relatívna, kedy sa množstvo fluorescencie testovanej vzorky porovnáva s množstvom fluorescencie inej vzorky, alebo ako absolútna, kedy sa

množstvo DNA odpočíta z kalibračnej krivky, ktorú zostrojíme podľa vzorky o známej koncentrácii. V tejto práci bola použitá relatívna kvantifikácia. Keďže nevieme koľko templátovej cDNA sme do qPCR pridali (známe je iba množstvo vstupujúcej RNA), môže byť zistená zmena v hladine expresie vzoriek spôsobená rozdielnym množstvom pridanej cDNA a nie skutočnou zmenou v expresii génov. Tento problém sa odstráni pridaním tzv. endogénnej kontroly. Endogénna kontrola je amplifikácia referenčného génu, ktorého expresia je za každých podmienok rovnaká. Potom sa prevedie normalizácia na množstvo expresie referenčného génu a až tak dosiahneme relatívnu expresiu daného génu.⁴⁰ Výber referenčného génu je kľúčový krok pri štúdiu expresie génov, pričom je dôležité mať pre experiment referenčný gén validovaný. V tejto práci bol použitý ako referenčný gén – gén kódujúci glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu (GAPDH). Gén bol vybratý na základe experimentu, v ktorom bola preverená jeho stabilita a vhodnosť pre štúdie expresie metódou qPCR u červov rodu *H. contortus*.⁴¹

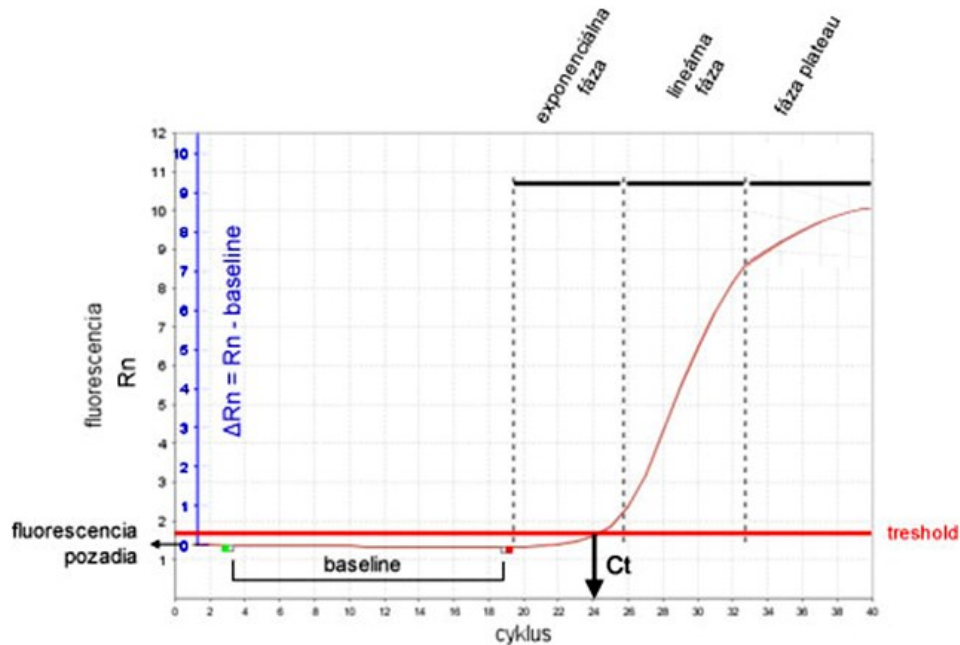
4.2.5.2 Fázy PCR

Priebeh PCR reakcie môžeme rozdeliť do troch fáz (Obr. 7).

1. V prvej časti tzv. exponenciálnej fáze dochádza k exponenciálnemu nárastu DNA, ale množstvo DNA, a tým aj fluorescence, je nízke a nepresahuje úroveň pozadia. Neskôr je priebeh stále exponenciálny, avšak syntéza DNA je už na takej úrovni, že intenzita fluorescence presahuje úroveň pozadia a detektory ju môžu zachytiť. V ideálnom prípade môžeme nárast DNA vyjadriť vzťahom 2^n , kde n predstavuje poradie cyklu. Množstvo templátovej DNA a intenzita fluorescence odráža množstvo DNA pridanej do reakcie, a preto sa kvantifikácia templátovej DNA vypočíta na základe fluorescence detegovanej v tejto fáze cyklu.
2. V druhej fáze, lineárnej, dochádza k lineárnemu nárastu DNA podľa vzorca $2n+1$, kde n je poradie cyklu.
3. V poslednej tretej fáze, tzv. plateau fáze, je prítomné veľké množstvo ampliónu, ale množstvo niektorých komponent reakcie bolo už spotrebované, a tak dochádza k spomaleniu kinetiky reakcie.

Graficky môžeme priebeh qPCR znázorniť pomocou amplifikačnej krivky. Amplifikačná krivka (Obr. 8) znázorňuje závislosť detegovanej fluorescence (os y) od počtu cyklov (os x).^{39,40}

Pre real-time PCR je dôležitý cyklus, v ktorom sa začína exponenciálna fáza, pretože práve vtedy intenzita fluorescence najlepšie odráža množstvo amplikónu. Tento cyklus sa nazýva cyklus prahu a označuje sa C_t . Čím je C_t nižšie, tým bolo do reakcie dodané väčšie množstvo templátovej DNA a naopak.^{39,40}



Obr. 7 Fázy PCR

Os x predstavuje počet cyklov a os y predstavuje detegovanú fluorescenciu (R_n). Na obrázku môžeme pozorovať veľmi nízke zmeny v detegovanej fluorescencii počas prvých cyklov qPCR (zvyčajne od 3 do 15). Táto nízka hladina ang. baseline zodpovedá základnej fluorescencii pozadia alebo tzv. "šumu". Tento šum môžeme od skutočnej fluorescencie amplikónu odrátať a korigovať tak všetky amplifikačné krivky, aby začínali na hodnote $y = 0$. Táto korekcia sa môže vyjadriť rovnicou $R_n - \text{baseline} = \Delta R_n$.³⁹

Pred začatím jednotlivých cyklov sa zariadenie zahreje na 95°C po dobu desať minút aby došlo k aktivácii DNA-polymerázy. Každý cyklus pozostáva z viacerých fáz, pričom sa využívajú skokové zmeny teploty počas cyklu. Ako prvá prebieha fáza denaturácie, kde sú pomocou vysokej teploty (95°C po dobu 15s) od seba separované reťazce DNA. Nasleduje fáza annealing-u, kedy pri teplote 60°C prisadajú primery na základe komplementarity na jednovláknovú DNA. Táto fáza trvá 20s. Tretia fáza je fáza predlžovania (ang. elongation), kde pri teplote 72°C , dochádza činnosťou DNA polymerázy k syntéze komplementárneho vlákna DNA. Fluorescencia sa meria po každom cykle, pričom celkový počet cyklov je štyridsať. Po ukončení štyridsiateho cyklu dôjde k analýze krivky topenia, kedy teplota postupne stúpa od 60°C do 95°C rýchlosťou $0,5^\circ\text{C}$ za 5s, pričom sa zaznamenávajú zmeny v fluorescencii. Na

základe zistených dát sa zhotoví krivka topenia. Metódou qPCR bola prevedená analýza referenčných a cieľových génov. Do doštičiek pre PCR bolo napipetovaný objem 20µl (5µl vzorky cDNA a 15µl mastermixu). Mastermix sa skladal z 0,8µl primerov (špecifické primery R-reverse a F-forward pre GAPDH alebo cieľové gény), 4,2 µl vody pre PCR a z 10µl G Mixu (Xceed qPCR SG Mix LoRox). G Mix bol dodaný v konečnej podobe výrobcom a obsahoval Hot Start Taq polymerázu (je termostabilná a zabraňuje tvorbe nešpecifických produktov), reakčný pufor, MgCl₂, dNTPs (dCTP, dATP, dTTP a dGTP) a fluorescenčné farbivo SYBR Green I.

Vzorky boli rozdelené podľa kmeňov a pohlavia: f-samice, m-samce, ISE (citlivý kmeň) a WR (multirezistentný kmeň). Polovica vzoriek bola ovplyvnená ABZ po dobu dvanástich hodín. Každá skupina vzoriek bola meraná v duplikáte, pričom pre každý gén bola prevedená negatívna kontrola, kde namiesto cDNA bola napipetovaná PCR voda. V Tab. 5 môžeme vidieť schematické rozloženie vzoriek na doštičke. Po napipetovaní 5µl cDNA a 15µl mastermixu, bola doštička uzavretá a vzorky sa premiešali na vortexe a následne boli stočené na centrifúge. Samotná real-time PCR prebehla v prístroji na to určenom podľa vyššie opísaných podmienok. Po prebehnutí qPCR nasledovalo vyhodnotenie dát pomocou počítača.

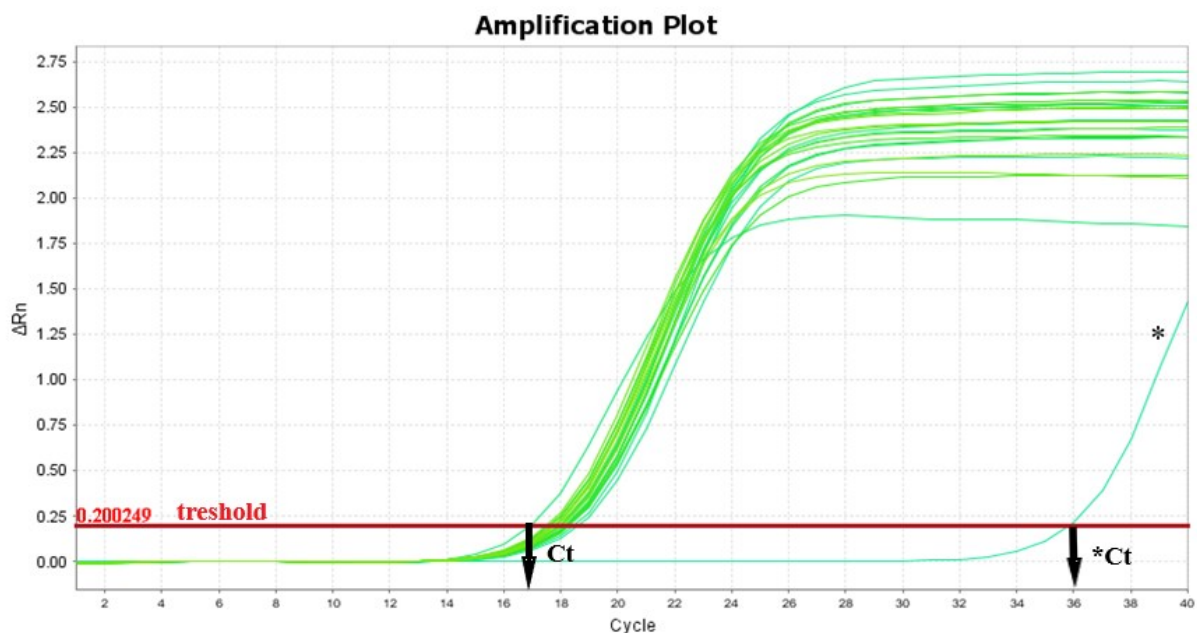
Tab. 5 Schematické rozdelenie vzoriek na PCR doštičke pre jeden gén

Vzorky sú testované v 3 biologických kópiách a v duplikátoch (oddelenie farebne). Označenie: WR- rezistentný kmeň, ISE- citlivý kmeň, A- vzorka ovplyvnená ABZ, K-kontrolná vzorka, M-samci, F-samice, K- negatívna kontrola bez cDNA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WR KM ₁	WR KM ₂	WR KM ₃	WR AM ₁	WR AM ₂	WR AM ₃	WR KF ₁	WR KF ₂	WR KF ₃	WR AF ₁	WR AF ₂	WR AF ₃
B	WR KM ₁	WR KM ₂	WR KM ₃	WR AM ₁	WR AM ₂	WR AM ₃	WR KF ₁	WR KF ₂	WR KF ₃	WR AF ₁	WR AF ₂	WR AF ₃
C	ISE KM ₁	ISE KM ₂	ISE KM ₃	ISE AM ₁	ISE AM ₂	ISE AM ₃	ISE KF ₁	ISE KF ₂	ISE KF ₃	ISE AF ₁	ISE AF ₂	ISE AF ₃
D	ISE KM ₁	ISE KM ₂	ISE KM ₃	ISE AM ₁	ISE AM ₂	ISE AM ₃	ISE KF ₁	ISE KF ₂	ISE KF ₃	ISE AF ₁	ISE AF ₂	ISE AF ₃
E	K											
F												
G												
H												

4.2.6 Analýza dát

Relatívna expresia vybraných UGTs a konštitučného génu pre GAPDH sa zisťovala pre všetky vzorky, ktoré pozostávali z troch biologických replikátov pre daný kmeň a pohlavie. Najprv boli skontrolované amplifikačné krivky pre každý gén. Na to aby sme mohli vzorky považovať za platné a zistené informácie mohli ďalej spracovať, nesmela kontrolná vzorka vykazovať prítomnosť špecifického produktu. Na kontamináciu vzoriek by poukazovala krivka topenia kontroly, ktorá by zodpovedala krivke topenia špecifických produktov. Pri amplifikačnej krivke (Obr. 8) sa sledovala hodnota C_t kontrolnej vzorky, ktorá by sa mala líšiť minimálne o 5 cyklov od hodnoty C_t testovaných vzoriek.



Obr. 8 Amplifikačná krivka

Os x- počet cyklov, os y- relatívna fluorescencia, *-amplifikačná krivka kontrolnej vzorky, *Ct- cyklus prahu kontrolnej vzorky, Ct- cyklus prahu jednej zo sady testovaných vzoriek, amplifikačná krivka vyhovuje kritériám pokiaľ je rozdiel hodnôt Ct väčší než 5

Kvantifikácia DNA pri qPCR môže byť prevedená dvomi spôsobmi:⁴³

1. Pomocou absolútnej kvantifikácie, ktorá vychádza zo štandardnej krivky
2. Pomocou relatívnej kvantifikácie

V tejto práci bol využitý spôsob relatívnej kvantifikácie, kde sa postupovalo metódou „comparative C_t “ (známu tiež ako metóda $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Zistené dáta boli vyhodnotené pomocou programu Microsoft Excel 2016. Relatívna kvantifikácia porovnáva expresiu sledovaného génu v testovanej vzorke voči expresii toho istého génu v kontrolnej vzorke (kalibrátor). V tejto

diplomovej práci boli ako kalibrátor vybrané vzorky citlivého kmeňa (ISE Km a ISE Kf). Pri porovnaní konštitutívnej expresie medzi kmeňmi a pri porovnaní expresie indukovanej ABZ boli ako kalibrátor volené príslušné kontrolné vzorky. Expresiu sledovaného génu (ΔCt) tak môžeme vyjadriť ako:^{39,42,43}

$$\Delta Ct = Ct_{vz} - Ct_K$$

Ct_{vz} predstavuje hodnotu Ct testovanej vzorky

Ct_K predstavauje hodnotu Ct kontrolnej vzorky (kalibrátor)

V rámci každej vzorky musí byť pred relatívnou kvantifikáciou prevedená tzv. normalizácia na referenčný gén, ktorý predstavuje vnútornú kontrolu. Najčastejšie sa používajú tzv. „housekeeping“ gény, v našom prípade bol použitý gén pre GAPDH, ktorý bol stabilný vo všetkých vzorkách.⁴¹ Preto bola okrem expresie vybratých UGTs génov zisťovaná aj expresia génov pre GAPDH u všetkých vzoriek, t.j. testovaných (Ct_{vz}^{ref}) aj kontrolných (Ct_K^{ref}). Relatívnu génovú expresiu vyrátame ako:^{39,42,43}

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Kde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{vz} - \Delta Ct_K$

$$\Delta Ct_{vz} = Ct_{vz} - Ct_{vz}^{ref}$$

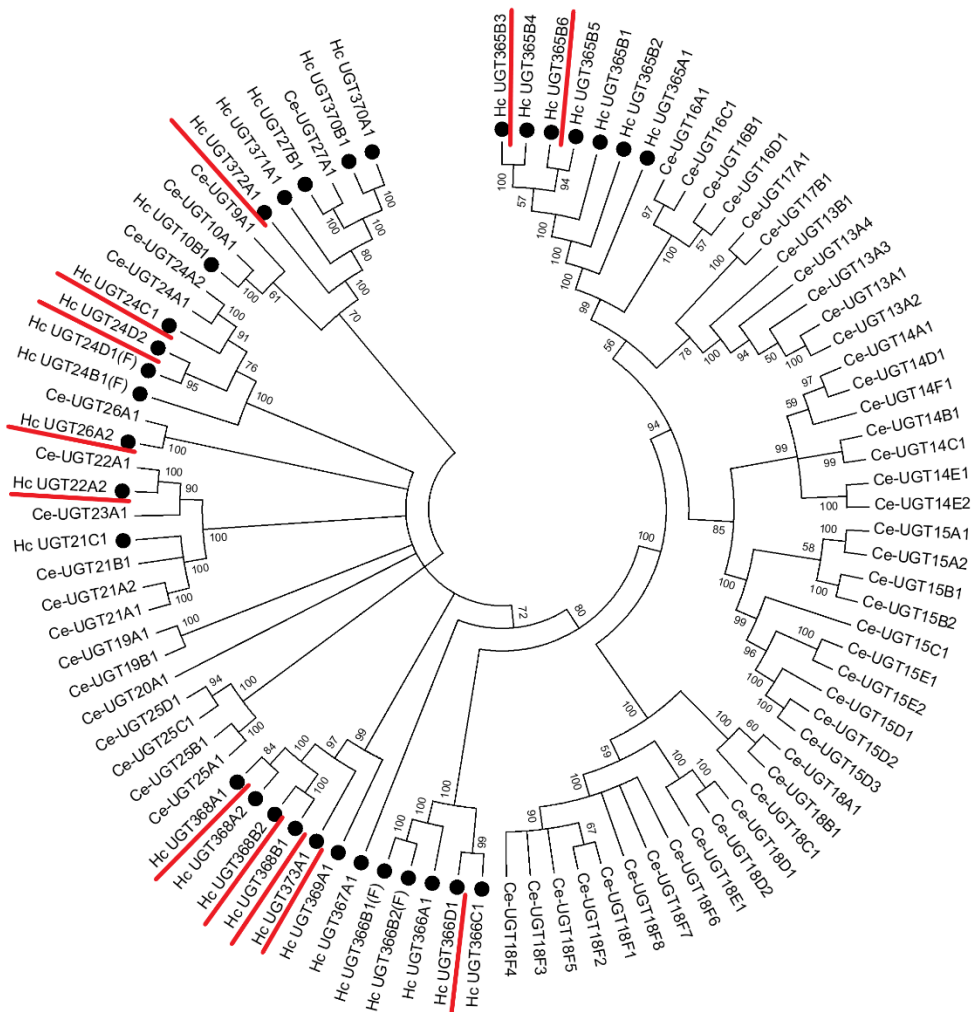
$$\Delta Ct_K = Ct_K - Ct_K^{ref}$$

4.2.6.1 Štatistická analýza dát

Výsledky boli analyzované doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. v programe GraphPad Prism 8 pomocou nepárového Studentova t-testu, aby sa zistilo, či zistené zmeny v génovej expresii sú štatisticky významné. Medzi štatisticky signifikantné zmeny sa považujú také zmeny, ktorých hladina významnosti p je menšia alebo rovná 0,05. Hladina významnosti udáva pravdepodobnosť, že zistená závislosť (u nás zvýšenie/zníženie expresie génov) je náhodná. Čím je hodnota p väčšia, tým menej sa dá predpokladať výskyt závislosť v celej populácii, z ktorej pochádzali testované vzorky.⁴⁴ Následne zistené výsledky boli spracované graficky pomocou programu Microsoft Excel 2016.

5 Výsledky

V tejto diplomovej práci bola meraná expresia vybraných enzýmov – UGTs u *H. contortus*. Jednotlivé gény boli vybrané doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. na základe fylogenetického stromu (Obr. 9). Presnejšie sa jednalo o UGT24C1, UGT365B6, UGT22A2, UGT26A2, UGT368A1, UGT365B3, UGT366D1, UGT368B2, UGT372A1, UGT368B1, UGT24D2 a UGT373A1.



Obr. 9 Fylogenetický strom dostupných génov pre UGTs u *C. elegans* a *H. contortus* a ich vzájomná príbuznosť. Gény *C. elegans* sú značené písmenami Ce- a označením konkrétnej UGT. Gény *H. contortus* sú značené čiernou bodkou, písmenami Hc a označením konkrétnej UGT. Gény použité v tejto diplomovej práci sú podtrhnuté červenou farbou.

5.1 Koncentrácia a čistota RNA

Koncentrácia RNA sa merala pomocou spektrofotometra Nanodrop. Vzorky, ktoré nie sú znečistené proteínmi majú pomer absorbancií pri vlnovej dĺžke 260 a 280nm v rozmedzí hodnôt 1,8-2. Nami získané hodnoty sú uvedené v Tab. 6 . Všetky testované vzorky tejto hodnote vyhovovali a tak mohli byť použité v ďalších krokoch. Z dôvodu možnej kontaminácie vzoriek fenolom sa zisťoval pomer absorbancií pri vlnovej dĺžke 260 a 230nm. Tento pomer by mal byť okolo hodnoty 2.

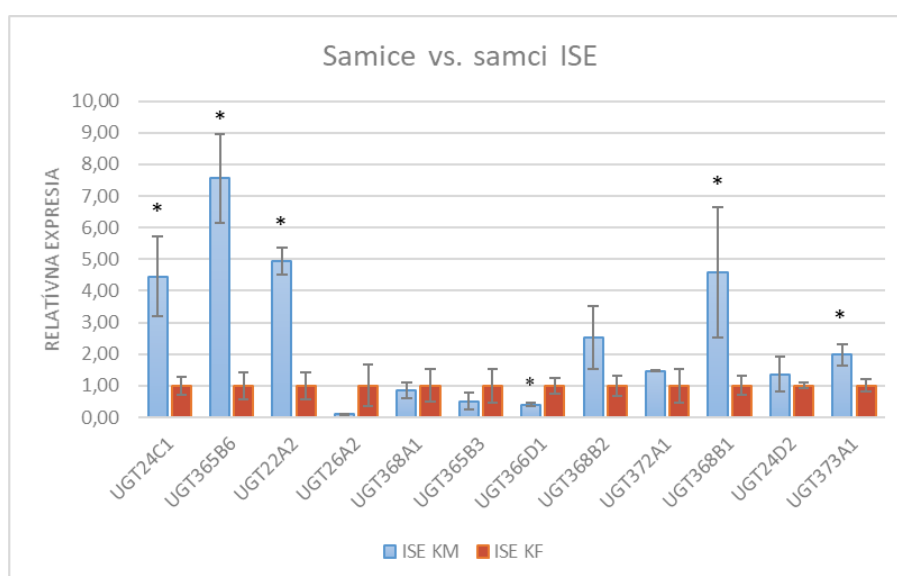
Tab. 6 Koncentrácia nameraná pomocou Nanodrop-u (c RNA v ng/μl). ISE- citlivý kmeň, WR- rezistentný kmeň, M- samci, F- samice (vzorky samíc boli pred meraním 10x zriedené), A- vzorky ovplyvnené albendazolom, K-kontrolné vzorky, 260/280 a 260/230 pomery absorbancií pri danej vlnovej dĺžke v nm.

Vzorka	c RNA [ng/μl]	260/280 [nm]	260/230 [nm]	Vzorka	c RNA [ng/μl]	260/280 [nm]	260/230 [nm]
ISE KM ₁	932,06	2,06	2,27	WR KM ₁	770,93	2,05	2,32
ISE KM ₂	618,29	2,03	1,75	WR KM ₂	596,26	2,04	2,17
ISE KM ₃	610,05	2,02	1,54	WR KM ₃	600,18	2,06	2,12
ISE AM ₁	571,82	2,03	1,96	WR AM ₁	427,34	1,92	2,34
ISE AM ₂	661,45	2,05	1,77	WR AM ₂	374,72	1,97	1,74
ISE AM ₃	682,20	2,08	2,16	WR AM ₃	433,40	1,93	2,29
ISE KF ₁ 10x	265,18	1,99	1,37	WR KF ₁ 10x	96,19	1,95	2,28
ISE KF ₂ 10x	306,28	1,96	2,51	WR KF ₂ 10x	312,92	1,93	2,50
ISE KF ₃ 10x	446,70	1,89	2,50	WR KF ₃ 10x	166,40	1,91	2,33
ISE AF ₁ 10x	400,99	1,92	2,51	WR AF ₁ 10x	100,80	1,85	2,49
ISE AF ₂ 10x	354,65	1,94	2,47	WR AF ₂ 10x	111,40	1,88	2,66
ISE AF ₃ 10x	207,30	1,90	2,43	WR AF ₃ 10x	73,24	1,88	2,19

5.2 Konštitutívna génová expresia

5.2.1 Porovnanie expresie medzi pohlaviami citlivého kmeňa

Na Obr. 10 môžeme vidieť porovnanie relatívnej expresie vybraných UGTs u kontrolných (ABZ neovplyvnených) vzoriek medzi pohlaviami v rámci citlivého (ISE) kmeňa. Miere expresie samičích vzoriek bola priradená hodnota 1 a k tejto hodnote boli vzťahnuté hodnoty zistené u samcov, tým sa získali relatívne hodnoty expresie, ktoré sa následne použili k vytvoreniu grafu. V grafe je navyše zobrazená smerodajná odchýlka a * označené štatisticky významné zmeny v expresii. Smerodajná odchýlka určuje ako sú namerané hodnoty medzi tromi biologickými replikátmi odchylené resp. rozptýlené od priemeru hodnôt.

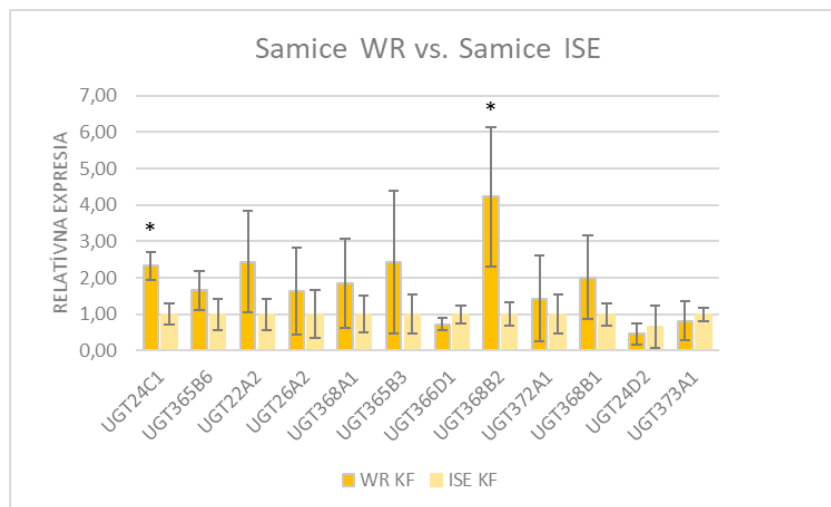


Obr. 10 Porovnanie expresie vybraných UGTs génov medzi pohlaviami ISE kmeňa. Samice sú označené červenou a samci modrou farbou. * sú označené hodnoty so významnou zmenou ($p \leq 0,05$)

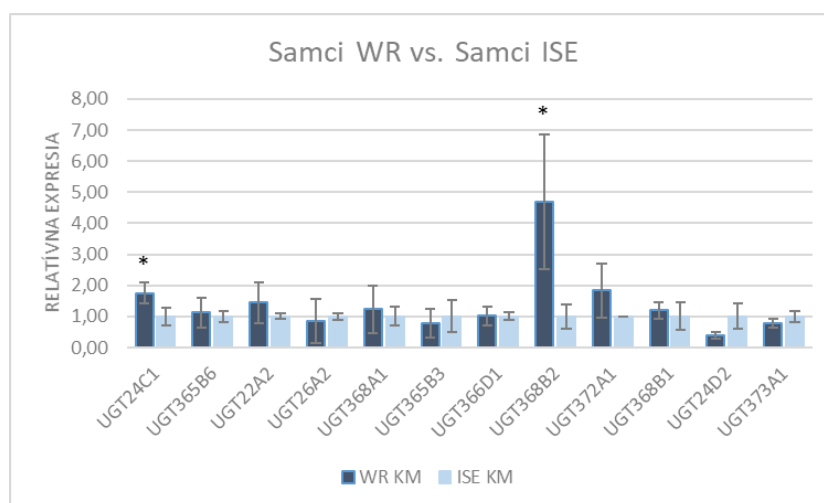
Z grafu na Obr. 10 môžeme vyčítať, prevládajúcu zvýšenú expresiu UGTs u samcov a to významne zvýšenú u UGT24C1, UGT365B6, UGT22A2, UGT368B1 a UGT373A1. Iba UGT366D1 vykazuje významné zníženie expresie v porovnaní so samicami. Tento rozdiel expresie medzi pohlaviami môže byť zapríčinený iným účelom jednotlivých enzýmov u samic resp. samcov.

5.2.2 Porovnanie konštitatívnej expresie medzi kmeňmi

Na zistenie rozdielov v konštitatívnej expresii vybraných UGT medzi citlivým (ISE) a rezistentným (WR) kmeňom, sme porovnávali údaje zistené pomocou qPCR u vzoriek, ktoré neboli ovplyvnené ABZ (kontrolné vzorky). Miere expresie vzoriek samíc resp. samcov ISE kmeňa bola priradená hodnota 1 a k tejto hodnote boli vztiahnuté hodnoty zistené u samíc resp. samcov rezistentného kmeňa. Výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Excel 2016 do grafu, ktorý môžeme vidieť na Obr. 11 a Obr. 12. Na grafoch sú vyznačené smerodajné odchýlky a * označené štatisticky signifikantné zmeny.



Obr. 11 Porovnanie expresie vybraných UGTs u samíc medzi WR a ISE kmeňom. F- samice, K- vzorky neovplyvnené ABZ, * sú označené hodnoty so signifikantnou zmenou ($p \leq 0,05$)



Obr. 12 Porovnanie expresie vybraných UGTs u samcov medzi WR a ISE kmeňom. M- samci, K- vzorky neovplyvnené ABZ, * sú označené hodnoty so signifikantnou zmenou ($p \leq 0,05$)

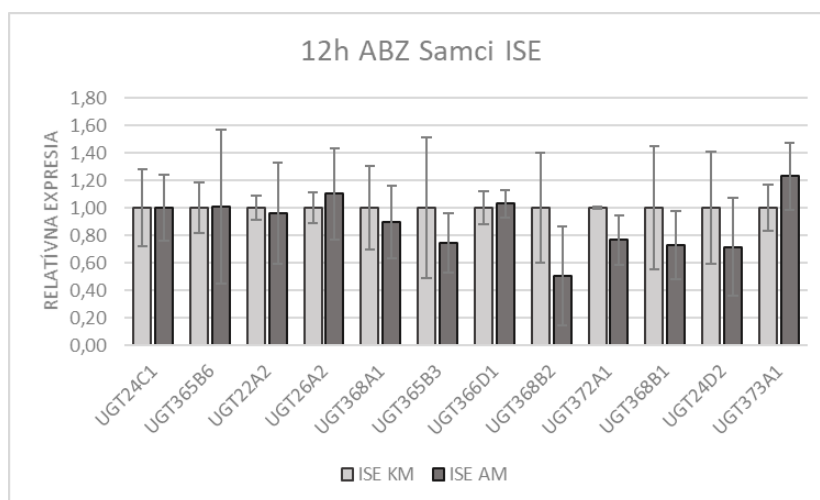
U samíc (Obr. 11), prevláda vyššia expresia vybraných enzýmov v rámci rezistentného WR kmeňa, pričom za štatisticky signifikantné môžeme považovať zvýšenie expresie u dvoch enzýmov a to UGT24C1 a UGT368B2.

U samcov z WR kmeňa (Obr. 12) rovnako ako u samíc, vykazujú štatisticky signifikantné zvýšenie expresie rovnaké, dva gény kódujúce enzýmy UGT24C1 a UGT368B2. V jednom prípade (UGT24D2) došlo k miernemu zníženiu génovej expresie v porovnaní s ISE kmeňom. Zvyšné UGTs nevykazovali výrazné zmeny v expresii v porovnaní s citlivým ISE kmeňom.

5.3 Expresia vybraných enzýmov po ovplyvnení albendazolom

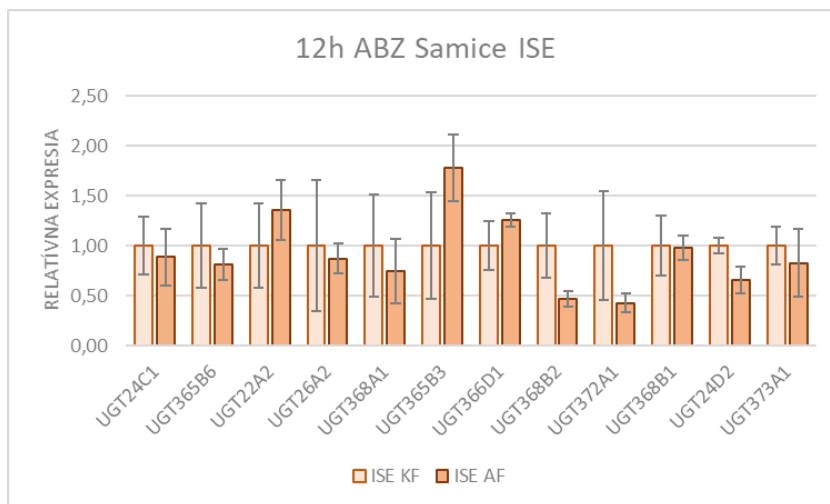
Na posúdenie vplyvu albendazolu na génovú expresiu vybraných enzýmov, sa jedna časť dospelých jedincov rodu *H.contortus* rozdelených podľa pohlavia a kmeňa, kultivovala v médiu po dobu dvanásť hodín, ktoré obsahovalo albendazol zatiaľ čo druhá časť v médiu, ktoré liečivo neobsahovalo (kontrola). Miere expresii kontrolných vzoriek bola priradená hodnota 1 a k tejto hodnote boli vzťahnuté hodnoty zistené u vzoriek ovplyvnených albendazolom. Následne zistené výsledky boli spracované graficky pomocou programu Microsoft Excel 2016.

5.3.1 Porovnanie expresie po ovplyvnení albendazolom u citlivého kmeňa



Obr. 13 Porovnanie expresie vybraných UGTs u samcov kmeňa ISE ovplyvnených albendazolom (ISE AM) po dobu 12 hodín. ABZ-albendazol, ISE KM-kontrolná vzorka samcov neovplyvnená ABZ .

Pôsobením albendazolu na citlivý kmeň u samcov nespôsobilo žiadne signifikantne zmeny expresie študovaných enzýmov. V niekoľkých prípadoch bola pozorovaná nižšia expresia v porovnaní s kontrolou a len v jednom prípade mierne vyššia expresia (Obr. 13). Na Obr. 14 u samíc môžeme vidieť, že situácia bola podobná, nedošlo k výraznému ovplyvneniu expresie.

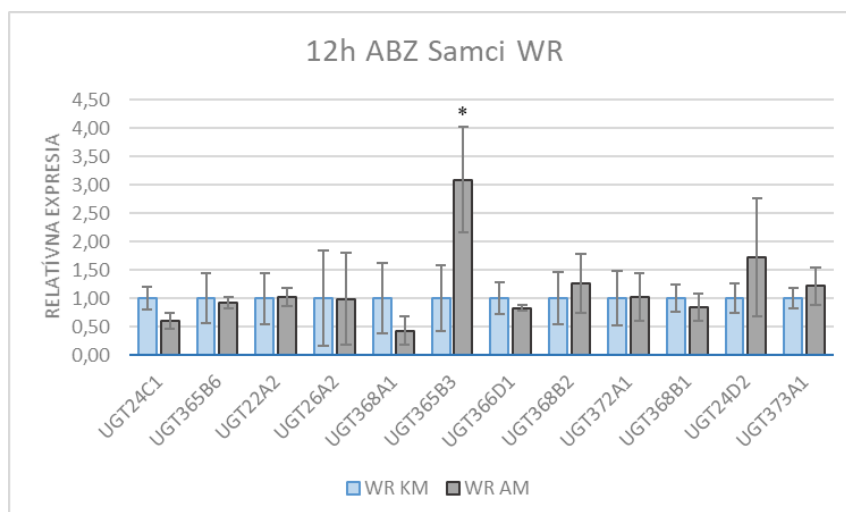


Obr. 14 Porovnanie expresie vybraných UGT u samíc kmeňa ISE ovplyvnených albendazolom po dobu 12 hodín (ISE AF). ABZ- albendazol, ISE KF-kontrolná vzorka samíc neovplyvnená ABZ

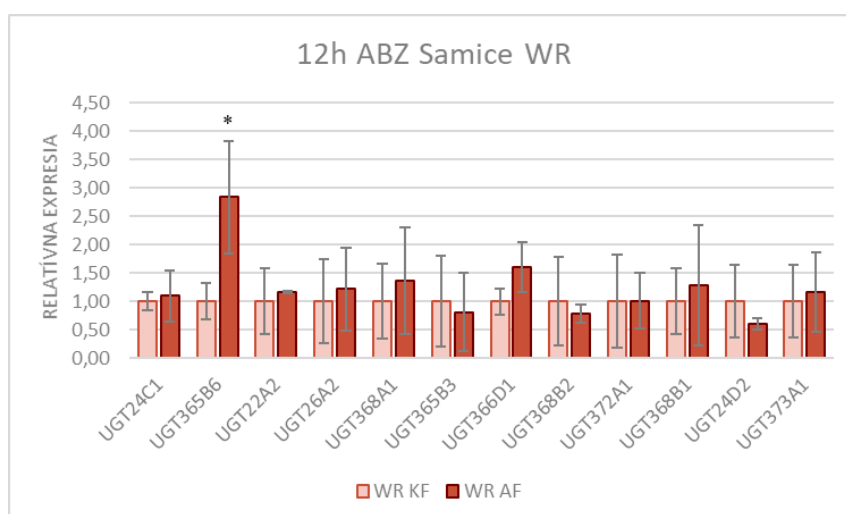
5.3.2 Porovnanie expresie po ovplyvnení albendazolom u rezistentného kmeňa

V rezistentnom kmeni, u samcov, ktorí boli ovplyvnený ABZ po dobu dvanásť hodín, bola pozorovaná signifikantne zvýšená expresia u jedného génu, konkrétne UGT365B3. U niektorých enzýmov bola naopak expresia po ovplyvnení ABZ mierne znížená v porovnaní s kontrolou (Obr. 15).

U samíc (Obr. 16) došlo k výraznejšiemu zvýšeniu génovej expresie po ovplyvnení ABZ u UGT365B6. U zvyšných génov nedošlo k výraznejšiemu zníženiu alebo zvýšeniu génovej expresie po ovplyvnení albendazolom.



Obr. 15 Porovnanie expresie vybraných UGTs u samcov kmeňa WR ovplyvnených albendazolom po dobu 12 hodín (WR AM). ABZ- albendazol, WR KM-kontrolná vzorka samcov neovplyvnená ABZ, * sú označené hodnoty so signifikantnou zmenou ($p \leq 0,05$).



Obr. 16 Porovnanie expresie vybraných UGTs u samíc kmeňa WR ovplyvnených albendazolom po dobu 12 hodín (WR AF). ABZ-albendazol, WR KF-kontrolná vzorka samíc neovplyvnená ABZ, * sú označené hodnoty so signifikantnou zmenou ($p \leq 0,05$).

6 Diskusia

Parazity hospodárskych zvierat spôsobujú značné finančné straty ich chovateľom a majú zásadný vplyv na ziskovosť podnikov. Niet pochyb o tom, že v celosvetovom meradle je *Haemonchus contortus* zďaleka najdôležitejším parazitom malých prežúvavcov (oviec a kôz). To predovšetkým vďaka jeho vysokej patogénnosti a rozšírenému výskytu naprieč svetom. Jedna z najúčinnjších metód na potlačenie výskytu parazitov je aplikácia anthelmintík. Ich nadmerná spotreba (často aj neopodstatnená), nedodržiavanie odporúčania výrobcu a predovšetkým využívanie liečby ako jedinej metódy potlačenia výskytu parazitov viedlo k vzniku a rozvoju rezistencie. Rezistencia na anthelmintiká sa stala jedným z najväčších svetových problémov veterinárnej parazitológie. Práve *H. contortus* je notoricky známy vývojom anthelmintickej rezistencie a to voči obom typom anthelmintík: úzko aj široko spektrálnych.^{1,7,35}

Vďaka pokroku v molekulárnej technológii sme schopní čoraz viac pochopiť a objasniť mechanizmus vzniku rezistencie. Rezistencia môže vznikať na základe viacerých mechanizmov. Môže byť zhruba kategorizovaná ako genetické zmeny v cieľovom mieste anthelmintika, zmeny v transporte liekov alebo zmeny v metabolizme, ktoré inaktivujú alebo odstraňujú lieky z organizmu, alebo naopak, ktoré zabraňujú ich aktivácii.^{1,3} Hlavným mechanizmom rezistencie na benzimidazolové anthelmintika je mutácia v cieľovom mieste izotypu-1 β -tubulínu v troch kodónoch (F167Y, E198A, F200Y), ktoré zabraňujú väzbe BZ na ich cieľovú molekulu.²⁶ Avšak mutácie v samotnom lokuse izotypu-1 β -tubulínu úplne nevysvetľujú rozdiely v hladine fenotypovej rezistencie, čo naznačuje, že sú zahrnuté ďalšie mechanizmy, ktoré sa podieľajú na rozvoji rezistencie.³⁰

Znalosť sekvencie genómu parazitov (vrátane *H. contortus*) sa stala neodmysliteľnou súčasťou molekulárnej a bunkovej biológie a prináša značné výhody vo všetkých aspektoch boja proti infekciám spôsobeným týmito druhmi.⁶

Nematódy majú najlepšie rozvinutý enzymatický systém metabolizujúci xenobiotiká (XMEs) v rámci helmintov. Majú relatívne veľký počet génov kódujúcich XMEs a sú teda schopné tvoriť vyššie počty metabolitov anthelmintík ako iné triedy helmintov. Toto zistenie by mohlo byť základom rýchleho rozvoja rezistencie na liečivá. Existuje niekoľko štúdií, ktoré jasne poukazujú na vzťah medzi expresiou XMEs, aktivitou a vznikom rezistencie. Medzi XMEs patria aj enzýmy druhej metabolizačnej fázy- UDP-glykozytransferázy. Práve zvýšená aktivita

UGTs môže ochrániť nematódy od toxického účinku ABZ a tak prispieť k rozvoju rezistencie u týchto parazitov.^{6,37}

V tejto diplomovej práci sa skúmala génová expresia 12 vybraných UGTs. Ako prvé sa porovnávali rozdiely v konštitutívnej expresii medzi pohlaviami u citlivého kmeňa a zmeny v konštitutívnej expresii medzi citlivým a multirezistentným kmeňom u samíc a následne zmeny expresie medzi kmeňmi u samcov. V druhej časti diplomovej práce sa skúmal vplyv albendazolu na génovú expresiu vybraných enzýmov u citlivého a multirezistentného kmeňa. Vychádzalo sa s už publikovaných štúdií, v ktorých bolo preukázané že *H. contortus* je schopný ABZ detoxifikovať na 9 metabolitov, pričom 7 z nich bolo N-glykozidov. Tvorba glykozidových konjugátov bola signifikantne vyššia u rezistentných kmeňov v porovnaní s citlivým ISE kmeňom. Navyše sa zistili signifikantné rozdiely v množstve (prítomnosti) metabolitov medzi samicami a samcami.^{28,37}

Porovnaním konštitutívnej génovej expresie medzi pohlaviami citlivého kmeňa, sa zistili výrazné rozdiely medzi samcami a samicami. U piatich z dvanástich vzoriek bola génová expresia vyššia u samcov než u samíc, konkrétne sa jednalo o gény kódujúce enzýmy UGT24C1, UGT365B6, UGT22A2, UGT368B1 a UGT373A1. Tieto zmeny boli vyhodnotené programom GraphPad za štatisticky signifikantné ($p \leq 0,05$). Jedna zo vzoriek vykázala štatisticky signifikantné zníženie u samcov, resp. zvýšenie expresie u samíc, a to UGT366D1. Zistené výsledky korešponujú s výsledkami predchádzajúcej štúdie, kde štyri rovnaké UGTs (UGT24C1, UGT22A2, UGT368B1 a UGT373A1) vykazovali zvýšenú bazálnu expresiu u samcov a UGT366D1 zvýšenú expresiu u samíc.⁵ Tieto zmeny medzi pohlaviami môžu byť spôsobené rozdielnym účelom konkrétnych UGTs u samíc resp. samcov.

Výsledky predchádzajúcej štúdie ukázali, že viacero izoforiem UGTs malo vyššie hladiny transkripcie u samíc a/alebo samcov oboch rezistentných kmeňov. Úroveň transkripcie UGT371A1 bola zvýšená iba v rámci samcov rezistentných kmeňov, zatiaľ čo UGT368B2 vykazovala signifikantne zvýšenú konštitutívnu expresiu u oboch pohlaviach rezistentných kmeňov.⁵ Na základne už publikovaných štúdií sme očakávali zvýšenú génovú expresiu u multirezistentného WR kmeňa, a to predovšetkým UGT368B2 (expresia UGT371A1 v tejto diplomovej práci nebola skúmaná). Tento predpoklad sa aj naplnil. U samíc ako aj u samcov bola zistená signifikantne zvýšená konštitutívna génová expresia génu kódujúceho UGT368B2. Okrem tejto zmeny, bola zistená aj signifikantne zvýšená expresia génu kódujúceho UGT24C1 u samíc a samcov multirezistentného kmeňa. Rezistentné jedince sú schopné deaktivovať benzimidazoly účinnejšie než citlivé jedince, tak by mohla zvýšená konštitutívna expresia

zistených génov prispieť k rozvoju rezistencie u *H. contortus*. Keďže nie je známe či sa tieto enzýmy podieľajú na metabolizácii BZ ani príčina zvýšenej konštitutívnej expresie, na potvrdenie tejto hypotézy je potrebné previesť dôkladnejší výskum týchto enzýmov.

V druhej časti diplomovej práce sme analyzovali vplyv ABZ na expresiu vybraných enzýmov u citlivého ISE kmeňa a rezistentného WR kmeňa. Vzorky kultivované po dobu dvanástich hodín v médiu s prídavkom 10 μ M ABZ sa porovnávali s kontrolnými vzorkami, ktorých médium neobsahovalo liečivo. Ak by sa vychádzalo z hypotézy, že biotransformačné enzýmy (medzi, ktoré patria aj UGTs) môžu ochrániť parazita pred toxickým efektom farmakoterapie, čím by sa znížila účinnosť anthelmintík, tak by sa očakávala indukcia génovej expresie po ovplyvnení ABZ u rezistentných kmeňov.

Pri porovnaní vplyvu albendazolu na citlivý kmeň ani u jednej zo vzoriek nedošlo k ovplyvneniu expresie, ktorá by mohla byť považovaná za štatisticky významnú.

U samcov z WR kmeňa, ktorý boli ovplyvnení ABZ po dobu 12 hodín došlo k významnému zvýšeniu expresie génu kódujúceho UGT365B3. U niekoľkých enzýmov bola naopak expresia po ovplyvnení ABZ znížená v porovnaní s kontrolou, avšak ani jedna z týchto zmien sa z dôvodu veľkých smerodajných odchýlok nepreukázala ako štatisticky významná. U samíc iba zvýšenie génovej expresie UGT365B6 bolo vyhodnotených programom GraphPad za štatisticky významné. U zvyšných génov nedošlo k výraznejšiemu zníženiu alebo zvýšeniu génovej expresie po ovplyvnení albendazolom.

Pôvodná hypotéza, že pred toxickým účinkom albendazolu sa rezistentné kmene bránia zvýšením génovej expresie UGTs sa naplnila iba čiastočne. Výsledky prezentované v tejto diplomovej práci ukázali, že anthelmintikum albendazol výraznejšie ovplyvnilo iba enzýmy z rodiny UGT365. Štatisticky významné zvýšenie génovej expresie u multirezistentného WR kmeňa sme zaznamenali v dvoch prípadoch a to u samíc pre gén kódujúci enzým UGT365B6 a u samcov pre gén kódujúci enzým UGT365B3. Oba enzýmy patria do rodiny UGT365, ktorá je najbližšia k rodine UGT16 u *C. elegans*. Do rodiny UGT16 patrí aj gén spojený s transkripčným faktorom SKN-1: *ugt_22* (Ce-UGT16C1). Ten bol nedávno identifikovaný ako detoxifikačný gén zapojený do biotransformácie albendazolu u *C. elegans*.⁴⁵ Tento fakt naznačuje, že enzýmy rodiny UGT365 by mohli byť zapojené do rozvoja rezistencie na benzimidazolové anthelmintika.

K získaniu výsledkov sme merania uskutočnili iba raz. Na potvrdenie záverov by bolo potrebné merania zopakovať. Ďalší výskum by mohol byť zameraný na enzýmy, u ktorých došlo k štatisticky signifikantnej zmene a to predovšetkým UGT365B6 a UGT365B3 a taktiež by mohlo byť prínosné preskúmanie expresie ďalších enzýmov z tejto rodiny. Mechanizmus metabolizmu liečiv ako aj mechanizmus vzniku rezistencie je vysoko komplexný a navzájom prepojený proces. Na to, aby sme boli schopný efektívne bojovať s rozširujúcou sa rezistenciou, je potrebné dostatočne pochopiť funkciu jednotlivých enzýmov a spôsob ich indukcie u *H.contortus*.

7 Záver

Predmetom tejto diplomovej práce bolo zistiť ako anthelmintikum albendazol ovplyvní expresiu vybraných enzýmov zo skupiny UDP-glykozyltrásferáz u helminta rodu *H. contortus* z citlivého ISE a rezistentného WR kmeňa. Okrem liečivom ovplyvniteľnej expresie sa skúmala aj (konštitutívna) expresia u jedincov, ktorí neboli ovplyvnení albendazolom.

Vzorky RNA z jedincov separovaných podľa pohlavia a kmeňa, ktoré boli izolované v požadovanej kvantite a kvalite, boli kvantifikované pomocou qPCR. Následná analýza výsledkov ukázala obecnú vyššiu konštitutívnu expresiu génov u samcov citlivého kmeňa v porovnaní so samicami. Rozdiely boli zistené aj pri porovnaní konštitutívnej expresie medzi kmeňmi. Ako u samíc, tak aj u samcov z multirezistentného kmeňa, sa zaznamenala zvýšená expresia génov kódujúcich enzýmy UGT24C1 a UGT368B2. Po dvanásť hodinovom ovplyvnení albendazolom bola zistená u rezistentného kmeňa významná indukcia génovej expresie v dvoch prípadoch, a to u samíc pre gén kódujúci UGT365B6 a u samcov pre gén kódujúci enzým UGT365B3.

8 Zoznam skratiek

ABC transportér	ATP-binding cassette
ABS	albendazolsulfoxid
ABSO	albendazolsulfón
ABZ	albendazol
AF	vzorka samíc <i>H. contortus</i> ovplyvnená ABZ
AKRs	aldo-keto reduktázy
AM	vzorka samcov <i>H. contortus</i> ovplyvnená ABZ
BZ	benzimidazoly
cDNA	komplementárna deoxyribonukleová kyselina
C _t	cyklus prahu
CYP 450	cytochróm P450
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DTT	dithiotretiol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EHA	egg hatch assay – test liahnutia vajíčok
FAD	flavínadenínukleotid
FAMACHA	faffa malan chart –test na zistenie závažnosti anémie
FECRT	fecal egg count reduction
FMO	flavínové monooxygenázy
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza
GI	gastrointestinálny
GIT	gastrointestinálny trakt
GPx	glutathionperoxidázy
GSTs	glutathion S-trasferázy
IRE kmeň	kmeň rezistentný na benzimidazolové anthelmintika
ISE kmeň	kmeň citlivý k všetkým anthelmintikám
KF	kontrolná vzorka samíc <i>H. contortus</i> neovplyvnená ABZ
KM	kontrolná vzorka samcov <i>H. contortus</i> neovplyvnená ABZ

L ₁ -L ₄	larválne štádia 1-4
LD ₅₀	letálna dávka, ktorá po podaní usmrtí 50 % jedincov
LD ₉₉	letálna dávka, ktorá po podaní usmrtí 90 % jedincov
LDT	larval development test – test vývinu lariev
NAPDH	nikotínadenín-dinukleotidfosfát
Phe	fenylalanín
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzná transkriptáza
SDRs	krátko-reťazové dehydrogenázy/reduktázy
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
Tyr	tyrozín
UDP	uridín difosfát
UGTs	uridíndifosfát glykozyltransferázy
WR kmeň	multirezistentný kmeň
XMEs	enzýmy metabolizujúce xenobiotiká

9 Zdroje

1. Waller, P. J.; Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchu contortus*: Parasite problem No. 1 from tropics – polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22(2), s.131-137.
2. Besier, R.B.; Kahn, L.P.; Sargison, N.D.; Van Wyk, J.A. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advance in Parasitology*, 93(6), s.181-238.
3. Wolstenholme, A.J.; a kol. (2004). Drug rezistence in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20(10), s.469-476.
4. Lespine, A.; Ménez, C.; Bourguinat, C.; Prichard, R.K. (2012). P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Drugs and Drug Resistance*, 2, s.58-75.
5. Matoušková, P.; a kol. (2018). UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 8(3), p. 420-429.
6. Matoušková, P.; Vokřál, I.; Lamka, J.; Skálová L. (2016). The role of xenobiotic metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. *Trends in Parasitology*, 32(6), s.481-491.
7. Vadlejch, J.; Langrová, I. (2014). *Gastrointestinální hlístice ovcí*. 1. vyd. Praha: Powerprint, ISBN 978-80-87994-20-7.
8. Jurášek V., a kol. (1993). *Veterinárna prazitológia*. 1.vydanie, Bratislava: Príroda, s.253-254, ISBN: 80-07-00603-6.
9. Roeber, F.; Jex, A. R.; Gasser, R. B. (2013). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasities and Vectors*, 6(153), p.1-13.
10. Getachew, T., Dorchies, P., Jacquiet, P. (2007), Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite*, 14(1), s. 3-14.
11. Lecová, L.
12. Gasser, R.B.; a kol. (2016). Understanding *Haemonchus contortus* better through genomics and transcriptomics. *Advances in Parasitology*, 93(12), s.519-552.

13. Waller, P.J. (2004). Management and control of nematode of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. *Tropical Biomedicine*, 21(2), s.7-13.
14. Besier, R.B.; Kahn, L.P.; Sargison, N.D.; Van Wyk, J.A. (2016). The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Advance in Parasitology*, 93(4), s.95-143.
15. Van Wyk, J.A.; Bath, G.F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*, 33, s.509-529.
16. Online : Use the FAMACHA system to control parasites, 20.09.2016, (citované dňa: 23.1.2019), dostupné na : <https://www.farmersweekly.co.za/agri-news/south-africa/use-the-famacha-system-to-control-parasites/>.
17. Lanusse, C. E.; Alvarez L. I.; Lifschitz, A. L. (2016). Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. *Advance in Parasitology*, 93(11), s.465-512.
18. Lamka, J.; Ducháček, L. (2014). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 4. vyd., Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1790-8.
19. Horton, J. (2000). Albendazole: A review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, 121(S1), s.113-132.
20. Online : National Center for Biotechnology Information, PubChem Substance Database, SID:135003573, (citované dňa : 23.1.2019) dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/135003573>.
21. Online: Junquera, P. (2017). ALBENDAZOLE: Safety Summary for Veterinary Use. (citované dňa : 26.1.2019), dostupné na : https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2697&Itemid=2960.
22. Hartl, J.; a kol. (2012). *Farmaceutická chemie IV. 2.*, nezmenené vyd., Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-2129-6.
23. Hans-Hasso, F.; Wolfgang, L. (2009). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3.vyd., Stuttgart: Enke. ISBN 978-3830410799.
24. Harder, A. (2016). The Biochemistry of *Haemonchus contortus* and Other Parasitic Nematodes. *Advance in Parasitology*, 93(3), s.69-94.

25. Peña-Espinoza, M. (2018). Drug resistance in parasitic helminths of veterinary importance in Chile: status review and research needs. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(2), s.65-76.
26. Kotze, A.C.; Prichard, R.K. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Advance in Parasitology*, 93(9), s. 397-428.
27. Online : European medicines agency (2017). Reflection paper on anthelmintic resistance. (citované dňa: 5.4.2019), dostupné na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-anthelmintic-resistance_en-1.pdf.
28. Raisová Stuchlíková, L.; a kol. (2018). Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *IPJ: Drugs and Drug Resistance* 8(1), s.50-58.
29. Laing, R.; a kol. (2015). The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Internatinal Journal for Parasitology*, vol. 45(4), p.243–251.
30. Whittaker, J.H.; Carlson, S.A.; Jones, D.E.; Brewer, M.T. (2017). Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 40(2), s.105-115.
31. Yilmaz, E.; Ramünke S.; Demeler, J.; Krücken, J. (2017). Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 7(3), s. 362-369.
32. Papadopoulos, E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, 76(1), s.99-103.
33. Skálová, L.; a kol. (2011). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotic*. 1. vyd., Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1917-0.
34. Online: Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. s.133-203, (citované dňa: 10.4.2019), dostupné na: <https://farmasi.unud.ac.id/ind/wp-content/uploads/Bio-Transformation-of-Xenobiotics.pdf>.
35. Vokřál, I.; a kol. (2012). The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 139(10), s.1309-1316.

36. Rawden, H.; a kol. (2000). Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49(4), s.313-322.
37. Vokřál, I.; a kol. (2013). Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 196, s.373-381.
38. Online: <https://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>, (citované dňa: 3.3.2019).
39. Online: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/kvantitativna-pcr-real-time-pcr>, (citované dňa: 9.3.2019).
40. Online: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>, (citované dňa :9.3.2019).
41. Lecová L.; a kol. (2015). Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 201(2), s.123-127.
42. Schmittgen, T.; Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), s.1001-1008.
43. Pastoráková, A.; Petrovič, R. (2016). Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, ISBN 978-80-223-4231-5.
44. Online: <http://www.fhvp.unipo.sk/cvt/statistika/stuvod.htm>, (citované dňa: 3.4.2019).
45. Fontaine, P.; Choe, K. (2018). The transcription factor SKN-1 and detoxification gene *ugt-22* alter albendazole efficacy in *Caenorhabditis elegans*. *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 8(2), s.312-319.