

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biochemických věd

**TRANSPORT A BIOTRANSFORMACE ANTHELMINTIK  
U CITLIVÝCH A REZISTENTNÍCH KMENŮ VLASOVKY  
SLÉZOVÉ (*HAEMONCHUS CONTORTUS*)**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2012

Lukáš Prchal

Na úvod mé práce bych chtěl poděkovat Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení v průběhu práce. Dále bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za odběr biologického materiálu, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za provedení HPLC analýzy u transportu a za pomoc při provádění ostatních HPLC analýz, Mgr. Haně Bártíkové za pomoc v průběhu experimentální části práce a Mgr. Ivanu Vokřálovi za pomoc při HPLC analýze. Nakonec bych rád poděkoval celému osazenstvu katedry biochemických věd za ochotu a pomoc. Práce byla zařazena v rámci grantu Vývoj lékové rezistence u helmintů – možné mechanismy a obrana (GAČR č. P502/10/0217)

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

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lukáš Prchal

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

Název práce: Transport a biotransformace anthelmintik u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*)

Haemonchóza je celosvětově rozšířená choroba, která ohrožuje chovy malých přežvýkavců. Toto onemocnění je způsobeno vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*), která parazituje v žaludcích napadených zvířat, způsobuje anemii a v některých případech i smrt. Nejčastěji používanou metodou na prevenci a léčbu je farmakoterapie. Velmi často se využívají benzimidazolová anthelmintika, ale v dnešní době dochází velmi často k jejich selhání kvůli rezistenci parazitů na léčbu. Nejčastější příčinou této rezistence je mutace v genu pro  $\beta$ -tubulin, cílové struktury pro benzimidazoly. Tento výzkum se zabývá dalšími možnými mechanismy rezistence, jako jsou rozdíly v metabolismu a enzymové výbavě. Jedním z cílů této diplomové práce bylo porovnat metabolismus anthelmintika flubendazolu ve třech kmenech *H. contortus*: kmeni ISE (citlivém na běžná anthelmintika), kmeni BR (rezistentním na benzimidazolová anthelmintika) a kmeni WR (rezistentním na všechna běžná anthelmintika). Dalším cílem bylo porovnání transportu flubendazolu u těchto tří kmenů *H. contortus*. Posledním cílem bylo porovnat pomocí PCR mutace v genu pro  $\beta$ -tubulin. Výsledky naznačují, že redukce je u vlasovky slézové velmi důležitou cestou deaktivace flubendazolu. Kupodivu je ale více aktivní u citlivého kmene než u rezistentních. Transport flubendazolu u vlasovky slézové není ovlivněn transportními proteiny a flubendazol tak proniká především díky své lipofilitě. Provedení PCR u zástupců všech tří kmenů potvrdilo nutnou přítomnost mutace ve 200. aminokyselině  $\beta$ -tubulinu u rezistentních kmenů.

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Lukáš Prchal

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

Title of diploma thesis: Transport and biotransformation of anthelmintics in susceptible and resistant strains of Barber's pole worm (*Haemonchus Contortus*)

Haemonchosis is a worldwide problem, which endangers breeding of small ruminants. This disease is caused by nematode Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*), which parasitizes inside stomachs of host animals, causing anaemia and in many cases death. Pharmacotherapy is the most used way to prevent and/or treat animals. The use of benzimidazole anthelmintics is very common, but it's failing more and more often because of resistance of parasites to pharmacotherapy. The most common reason of resistance is mutation in the gene for  $\beta$ -tubulin, which is target for benzimidazoles. This research focuses at the other possible mechanism of resistance, which is resistance based on enzymes and metabolism. One of the aims of this thesis was to compare the metabolism of the anthelmintic drug flubendazole in three different strains of *H. contortus*: the ISE strain (susceptible to common anthelmintics), the BR strain (resistant to benzimidazole anthelmintics) and the WR strain (resistant to all common anthelmintics). Another aim was to compare the transport of flubendazole in all three strains of *H. contortus*. The last aim was to detect mutations in the gene for  $\beta$ -tubulin using PCR. The results indicate that reduction is quite important way to deactivate flubendazole in Barber's pole worm. However it's more active in susceptible strain, than in resistant ones. The transport of flubendazole in Barber's pole worm isn't affected by transport proteins and flubendazole penetrates due to its lipophilicity. The PCR confirmed the necessity of mutation in the 200<sup>th</sup> aminoacid of  $\beta$ -tubulin in the resistant strains of Barber's pole worm.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| OBSAH   | 5  |
| 1. ÚVOD   | 7  |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST                                  | 8  |
| 2.1 <i>Haemonchus contortus</i>                     | 8  |
| 2.1.1 <i>Haemonchus contortus</i>                   | 8  |
| 2.1.2 Vývojový cyklus                               | 9  |
| 2.2 Haemonchóza                                     | 10 |
| 2.2.1 Onemocnění                                    | 10 |
| 2.2.2 Diagnostika                                   | 12 |
| 2.3 Opatření proti haemonchóze                      | 13 |
| 2.3.1 Léčba a farmakoprolaxe                        | 13 |
| 2.4 Rezistence                                      | 18 |
| 2.4.1 Rezistence vlasovky slézové                   | 18 |
| 2.4.2 Detekce rezistentních <i>H. contortus</i>     | 20 |
| 2.4.3 Rezistentní kmeny <i>Haemonchus contortus</i> | 20 |
| 2.4.4 Metabolismus xenobiotik                       | 21 |
| 2.5 HPLC a PCR                                      | 24 |
| 2.5.1 HPLC  | 24 |
| 2.5.2 PCR   | 25 |
| 3. CÍL PRÁCE  | 26 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST                              | 27 |
| 4.1 Chemikálie, přístroje a biologický materiál     | 27 |
| 4.1.1 Chemikálie                                    | 27 |
| 4.1.2 Přístroje                                     | 28 |
| 4.1.3 Biologický materiál                           | 28 |
| 4.2 Pracovní postupy                                | 29 |
| 4.2.1 Pufry a roztoky                               | 29 |
| 4.2.2 Zpracování biologického materiálu             | 30 |
| 4.2.3 BCA stanovení bílkoviny                       | 30 |
| 4.2.4 Inkubace FLU s cytosolem <i>in vitro</i>      | 31 |
| 4.2.5 Transport FLU u <i>H. contortus</i>           | 33 |
| 4.2.6 PCR   | 34 |

|   |    |
|---|----|
| 5. VÝSLEDKY   | 37 |
| 5.1 Stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích           | 37 |
| 5.2 Biotransformace FLU u citlivého a resistantních kmenů | 38 |
| 5.3 Transport flubendazolu                                | 42 |
| 5.3.1 Import flubendazolu                                 | 42 |
| 5.3.2 Export flubendazolu                                 | 47 |
| 5.4 PCR   | 52 |
| 5.4.1 PCR s primery PH4 a PH5                             | 53 |
| 5.4.2 PCR s primery PH4M a PH5M                           | 54 |
| 6. DISKUZE  | 56 |
| 7. ZÁVĚR  | 61 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK                                  | 62 |
| ZDROJE  | 63 |

# 1. ÚVOD

Haemonchóza je onemocnění způsobené parazitickou hlísticí vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*). Vlasovky jsou celosvětově rozšířené, napadají sléz přežvýkavců ve volné přírodě i v chovech, kde působí značné škody zvláště u malých přežvýkavců. Projevuje se anémií a celkových chřadnutím zvířete, které může končit až smrtí.

Hlavní metodou v boji proti helmintózám jsou dnes širokospektrá anthelmintika, účinkující na většinu vývojových stádií helmintů. Používají se jak terapeuticky tak především v dřívějších dobách i preventivně. Vzhledem k jejich rozsáhlému a v některých případech i špatnému nasazení došlo k rozšíření parazitů, kteří jsou rezistentní vůči jejich účinkům. Kromě kmenů rezistentních pouze na jednu skupinu látek se objevují kmeny, které jsou rezistentní na většinu běžně používaných anthelmintik. Příčiny rezistencí se zkoumají, ať již jde o metody na úrovni změn v DNA nebo cesty biotransformace xenobiotik, které velmi často způsobují mnohočetné rezistence.

Tato práce se zabývá právě srovnáním tří kmenů vlasovky slézové, kmene ISE, který je citlivý na běžně používaná anthelmintika, pak kmene BR, který je rezistentní na benzimidazolová anthelmintika a kmene WR rezistentního na většinu běžně užívaných anthelmintik. Porovnání biotransformace se provádělo pomocí *in vitro* inkubace benzimidazolového anthelmintika flubendazolu s cytosolem vlasovek. Dále se provádělo *ex vivo* srovnání transportu flubendazolu. V poslední části se provádělo *in vitro* testování rezistentních a citlivých alel genu pro  $\beta$ -tubulin.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Haemonchus contortus*

#### 2.1.1 *Haemonchus contortus*

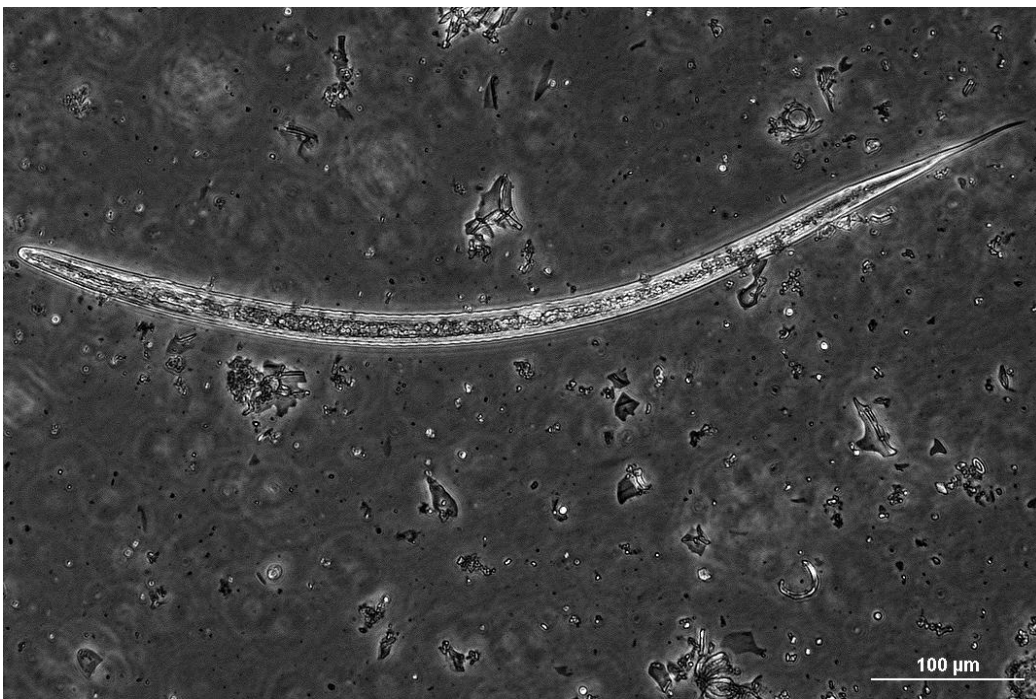
*Haemonchus Contortus*, česky vlasovka slézová je parazitický červ z čeledi Trychostrongylidae, řádu Strongylida (měchovci), třídy Secernentea, kmenu Nematoda (hlístice). Rod *Haemonchus* původně pochází z Afriky, dnes jej můžeme nalézt rozšířený po celém světě.

Má válcovité bilaterálně souměrné tělo. Mají druhotnou tělní dutinu pseudocel. Oporu těla tvoří velkým tlakem v tělních tekutinách. Je zde výrazný pohlavní dimorfismus. Samečci měří mezi 10 a 20 milimetry výrazným znakem je u nich kopulační váček, který bývá charakteristický svým asymetrickým zadním lalokem. Samice jsou větší, měří mezi 20 a 30 milimetry, výraznými strukturami u nich jsou bílé vaječníky, a na přední části cervikální papily (Sendow 2003). Povrch těla je tvořen kutikulou, která je tvořena především bílkovinami a chrání parazita v nepříznivých podmínkách trávicího traktu hostitele. Vrchní vrstvy jsou nebuněčné struktury a jsou vylučovány z epidermis. Vrchní vrstvy kutikuly jsou tvořené především kolagenem, dále mukopolysacharidy a lipidy (Sood a Kalra 1977). Svalstvo je podélné uspořádané ve svazcích podél stěny těla. Mají bílou průhlednou barvu, ale často se zdají, díky krvi hostitele v jejich trávicí trubici, červení, kromě samic, kde zůstávají vidět výrazně bílé vaječníky, tvořící bíločervenou spirálu. Má jeden zub nebo lancetu, kterým proráží žaludeční mukózu hostitele. Nervový systém hlístic je tvořen kruhem čtyř ganglií u hltanu, ze kterých vychází šest podélných nervů k různým částem trávicího a rozmnožovacího systému, dalších šest nervů jde směrem k ústům (Ramel 2009). Mohou se od sebe odlišovat i jedinci žijící v různých hostitelích např. kozách a ovcích (Rahman a Hamib 2007).





Obr. 1. *Haemonchus contortus*



Obr. 2. *Haemonchus contortus* - detail pod mikroskopem.

### 2.1.2 Vývojový cyklus

*Haemonchus contortus* prochází několika stádii během vývoje. *H. contortus* patří mezi geohelmintry, takže jeho vývojový cyklus probíhá přímo, bez nutnosti mezipřítelce. Jedna samice naklade přibližně 5000 vajíček za den. Po vypuzení z těla

hostitele se z vajíček líhne larva prvního stupně, která postupně dospívá, svléká svou kutikulu, až dospěje do stádia 3, kdy je spasena hostitelem. V prvních stádiích se živí bakteriemi v prostředí, později krví hostitele (Sendow 2003). V žaludku proniká do jeho mukózy, kde dospívá do stádia 4. V tomto stádiu většinou dochází k hypobióze, což je stav, kdy larva zastavuje svůj vývoj a zpomaluje metabolismus a pouze přežívá v hostiteli, než budou příznivější podmínky. Tento stav je ovlivněn prostředím, jak v žaludku, tak i mimo hostitele, odpovědí imunitního systému na parazitózu a dalšími faktory. Nejčastěji probíhá hypobióza během chladných měsíců, případně během období sucha. Po opětovném započetí vývoje opouští larva žaludeční mukózu a po dalším svlékání se vyvíjí v dospělého jedince, který ještě přibližně 15 až 18 dní dospívá a následně může kopulovat (Angulo-Cubillán et al. 2007). V ideálních podmínkách dojde k celému cyklu během 21 dní. Vajíčka se líhnou v rozmezí teplot 10-37 °C a při 40 °C již po 20hodinách hynou. Takže optimální podmínky pro vývoj jsou 25-30 °C a vlhkost 70-80 % (Sendow 2003).

## **2.2 Haemonchóza**

### **2.2.1 Onemocnění**

Haemonchóza je onemocnění dobytka způsobené vlasovkou slézovou. Hlavní mechanismy, jsou sání krve a léze v mukóze žaludku. Postihuje sléz, „pravý“ žaludek u přežvýkavců. Dále během svého vývoje v tkáni způsobují místní morfologicko-funkční změny. Dospělý *H. contortus* má příjem 0,05 ml krve na jedince za den, což postupně snižuje hematokrit (objem červených krvinek v krvi). Hematokrit je používán jako marker virulence parazitů a nepřímý odhad vážnosti infekce (Angulo-Cubillán et al. 2007). Pokles začíná být znatelný od 4. dne po infekci, protože v tuto dobu opouští čtvrtá stádia stěnu žaludku. S počátkem pohlavního rozmnožování se úbytek zrychluje.

Vliv zde má i hemoragická gastritida způsobená parazity a jejich vylučování hemolytických faktorů. Nejnižších hodnot dosahuje hematokrit přibližně sedm týdnů po infekci. Dále pak dochází ke ztrátám i dalších bílkovin, při krvácení, reparaci poškozených tkání, zvýšení produkce hlenu a zvýšením syntézy elementů imunitního systému. K tomu se musí připočíst, že zde jsou faktory, které brání náhradě ztrát bílkovin z potravy. Napadená zvířata mají příjem snížený díky anemii, gastrinu, který

snižuje průchod potravy traktem a syndromem špatného trávení, který je způsoben růstem hodnoty pH v žaludku, což brání syntéze pepsinu a tím i vstřebávání aminokyselin. Toto zvyšování je způsobeno, tím že se snižuje produkce HCl z parietálních buněk v žaludku, což je způsobeno jejich úbytkem a poškozením, které jsou způsobeny infiltrací parazitů do tkáně, případně vylučováním látek z parazitů a náhradou nedospělými buňkami bez sekreční činnosti. Dále bylo zjištěno, že paraziti vylučují sloučeniny jako amoniak, které dále zvyšují pH kolem parazitů, aby je ochránily před účinkem HCl případně pepsinu na povrch těla. Pepsinogen se navíc nemůže měnit na pepsin vzhledem k vysokému pH, takže dochází k jeho hromadění v hlavních buňkách žaludku a následnému uvolňování do krevního oběhu, vzhledem ke zvýšení permeability žaludeční sliznice vlivem infekce a zánětu. Růst a sekrece parazitů také vyvolává vylučování acetylcholinu, histaminu, růstového faktoru a tím zvyšuje další produkci pepsinogenu v hlavních buňkách. Při experimentech na ovcích a kozách došlo ke zvýšení pepsinogenu mezi 4. a 14. dnem infekce s návratem k původním hodnotám kolem 40. dne. Tyto faktory nejen přímo ovlivňují zdraví zvířete ale i například kvalitu jeho vlny a především váhu (Angulo-Cubillán et al. 2007).

Mezi symptomy haemonchózy patří anemie, nechůť k jídlu, letargie, ztráta hmotnosti, nižší produkce mléka i vlny. Vyskytují se bledé sliznice, otoky, snížení hematokritu, hemoglobinu, plazmatických bílkovin a na druhou stranu zvýšení cirkulujících eosinofilů v krvi a pepsinogenu a gastrinu v séru. Dochází ke změnám teploty, kašli, střídání zácpy a průjmů (Sendow 2003). V konečné fázi dochází k pohublosti a následně ke smrti. Během pitvy byla nalezena právě pohublost, bledé sliznice, otoky v tělních dutinách, snížení zásob tuku, hypertrofie lokálních lymfatických uzlin, otok žaludeční sliznice s petechiálním krvácením a v ní dospělí paraziti. Při mikroskopickém prozkoumání se zjistilo rozšíření žaludečních žláz, vředy, otoky, krvácení a zvýšené množství eosinofilů a mastocytů v tkáni. Vážnost onemocnění závisí na množství faktorů, jako je množství parazitů, jejich virulence, dále věk, plemeno a zdravotní stav nakaženého zvířete. U ovcí většinou probíhá vážněji u jehňat než u dospělých, vzhledem k jejich lépe vyvinutému imunitnímu systému.



Obr. 3. žaludek ovce napadené haemochózou

### 2.2.2 Diagnostika

Diagnostika probíhá několika způsoby, nejčastějším testem je test počítání vajíček v trusu hostitele. Výhodou techniky je levnost a snadná proveditelnost testu. Množství vajíček ale může být ovlivněno mnoha faktory, s nimiž se musí počítat, jako je vývojová fáze parazita, jeho virulence, imunita hostitele, průchod potravy trávicím traktem hostitele, roční období. Další možností je kultivace výkalů, která slouží k rozlišování jednotlivých druhů nematod, ale nevýhodou je pomalost této metody. Odhad larev na pastvinách se používá k odhadu stupně infekce, kterému jsou pasoucí se zvířata vystavena. Dá se použít na diagnózu i prognózu infekcí na dané farmě. Ale test může být ovlivněn rostlinami na pastvině nebo deštěm. Dají se použít i kontrolní zvířata, čímž se zvýší spolehlivost, ale metodu to značně prodražuje. Další metodou je posmrtné počítání dospělých červů. Tato metoda je nejpřesnější a nejjistější ale také je limitována náklady (Crompton a Newton 1982). Jedním z nových přístupů je systém FAMACHA (obr. 4), který využívá hodnocení klinických projevů anemie, k určení zvířat, u kterých nemoc nekontrolovaně probíhá. Název je akronym FAffa MAlan CHArt. Využívá změny barvy spojivek, podle probíhající choroby, od tmavě červené přes růžovou až k téměř bílé, a porovnání s hematokritem napadeného zvířete. Systém je zjednodušený, aby jeho provádění bylo rutinní (van Wyk a Bath 2002).





Obr. 4: FAMACHA test (Haemonchus Parasite)

## **2.3 Opatření proti haemonchóze**

Cílem při kontrole nákazy není úplně nemoc vyhubit, ale spíše snaha udržet ji ve stavu, kdy neohrožuje hostitelská zvířata. Úspěchy mohou být buď okamžité, nebo dlouhodobé. Cílem je dosáhnout vyšší produkce a menších problémů, co se týče rezistence na anthelmintika a vlivů na konzumenty a prostředí.

### **2.3.1 Léčba a farmakoprophylaxe**

Nejčastěji se anthelmintika užívají jako profylaxe proti nákaze. Používá se především forma roztoků, past, bolusů. Aplikace se liší podle podnebí v místě chovu a stavu zvířat. Například v mírném pásmu se dává přednost specifické léčbě než podávání v přesně daných intervalech. V oblastech střídání období sucha a dešťů dochází k podávání léčiv nejméně dvakrát za rok, většinou 4 týdny po začátku dešťů a 4 týdny po konci dešťů. Ale nyní začíná být používání anthelmintik ohroženo. Vinnu na tom má především dlouhodobé užívání, nesprávné použití a poddávkování, které vedou ke snižování účinnosti a k nárůstu rezistence. Existuje několik skupin anthelmintik, k nejčastěji používaným patří benzimidazoly, což způsobuje časté problémy s rezistencí parazitů. Je snaha snížit preventivní používání, aby se rezistence šířila co nejméně. K tomuto slouží například systém FAMACHA, který umožňuje léčbu jen napadených zvířat ve stádě (Getachew et al. 2007).

## **Anthelmintika**

### **Agonisté nikotinu**

Tato léčiva fungují jako agonisté na synaptických a extrasynaptických nikotinových receptorech pro acetylcholin ve svalech červů. Zvyšují vodivost membrány a její depolarizaci, tím že otevírají neselektivní iontové kanály pro kationty, které jsou prostupné pro  $K^+$  i  $Na^+$  ionty. Způsobují kontrakce svaloviny a následně její spastickou paralýzu. Potom dojde k vyloučení parazitů z těla hostitele pomocí peristaltiky. Do této skupiny patří imidazothiazoly jako levamisol a butamisol, dále tetrahydropyrimidiny jako pyrantel nebo oxantel a kvartérní amoniové soli (Martin 1997).

### **Agonisté GABA receptorů**

Do této skupiny patří piperazin, který, ačkoli má od GABA odlišnou strukturu, účinkuje na stejném typu ligandem řízených receptorů pro chloridový kanál na svalstvu helmintů. Dochází zde k otevření kanálů, hyperpolarizaci membrány, zvýšení její vodivosti a následně ke spastické paralýze.

### **Makrocyklické laktony**

Tato skupina se dělí na avermektiny jako ivermektin nebo moxidektin a milbemyciny jako milbemycin D. Spektrum účinku pokrývá pouze nematoda. Druhová indikace je velmi široká, pouze s některými výjimkami u psů. Účinky jsou systémové, vylučují se do mléka. Ochranné lhůty pro ivermektin jsou mezi 5 a 28 dny, pro další léčiva až 42 dní. Mechanismem účinku je zvýšení prostupnosti membrány svalových buněk pro chloridové anionty. Dříve se myslelo, že tyto změny jsou výsledkem působení GABA neurotransmise, ale postupným výzkumem se zjistilo, že role GABA je pouze minoritní a větší význam zde má glutamát, jehož účinek léčiva ovlivňují (Lamka a Ducháček 2006). Naklonováním podjednotek GluCl  $\alpha 1$  a  $\beta$  kanálu z *Caenorhabditis elegans* došlo k identifikaci avermektin-senzitivního GluCl iontového kanálu. Účinek avermektinů je závislý na dávce. Při nízkých dávkách zesilují účinek glutamátu na kanály. Při vysokých dávkách přímo otevírají glutamátem řízené kanály. Selektivita léčiv se dá vysvětlit nepřítomností GluCl kanálů u hostitelského organismu. Léčiva také neprostupují hematoencefalickou bariérou organismu, kromě některých citlivých plemen psů. Experimenty bylo zjištěno, že podjednotka  $\beta$  se vyskytuje ve

pharyngeálním svalu *C. elegans* a aplikace léčiv inhibuje pharyngeální pumpu, která je součástí procesu příjmu potravy u hlístic. Mimo to ivermektin má vliv i na somatické svalstvo, aktivuje GABA neaktivované kanály a inhibuje GABA aktivované, takže se dá předpokládat, že mají u nematod i další místa účinku (Martin 1997).

### **Látky zvyšující prostupnost vápníku**

Zástupcem této skupiny je prazikvantel. Zvyšuje průchodnost vápníku přes parazitární tegument a do svalových buněk a způsobuje rychlé kontrakce svalů. Využívá kanálů pro vápník, které nejsou napětově řízené a které se vyskytují pouze v parazitech. Používá se především u léčby onemocnění způsobených motolicemi.

### **Látky zasahující do metabolismu**

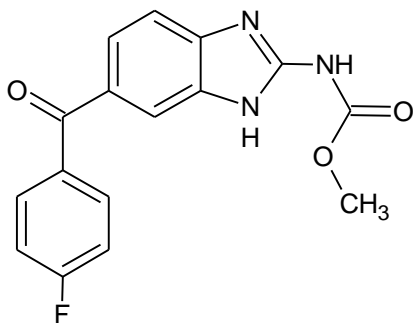
Jedná se o skupinu velmi lipofilních látek salicylanilidů nebo substituovaných fenolů, které dokáží prostupovat membránami, zde konkrétně se jedná o vnitřní mitochondriální membrány. Molekuly léčiv dokáží odtrhnout vodíkový kation. Při syntéze ATP se v mitochondriích využívá protonového gradientu na membráně.  $H^+$  uvolněný z léčiva narušuje tento gradient a tím blokuje syntézu ATP. Dalším způsobem, jak mohou tato léčiva ovlivňovat parazity je snížení pH v tegumentu, které ovlivňuje zde probíhající procesy a které vyústí ve snížení pohyblivosti. Toto bylo pozorováno u aplikace klozantelu na *Schistosoma mansoni* a motolici jaterní. Do této skupiny patří mimo klozantelu například i rafoxanid (Martin 1997).

### **Látky zabraňující tvorbě mikrotubulů**

Tyto látky jsou benzimidazoly, případně jejich proléčiva, která se v organismu přemění na účinný benzimidazol. Mikrotubuly jsou buněčné organely, které slouží k různým účelům, od opory buněčného těla, přes přesun chromozomů během dělení, po přesunování vnitřních částic včetně metabolitů a zdrojů energie. Tyto organely se vyskytují u rostlin, zvířat, hub i části bakterií. Jsou složeny ze dvou proteinů  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu. Řetězce mají 450 aminokyselin. Vzájemnou polymerizací tvoří spirálu, kde se střídá  $\alpha$  a  $\beta$  tubulin. Každá otáčka má 13 částí. Pozitivní je konec, kde polymerizací mikrotubuly vznikají. Jejich vznik je zvyšován pomocí GTP,  $Mg^{2+}$ , vyšší teploty a inhibují je benzimidazolová léčiva. Na negativním konci mikrotubuly depolymerizací zanikají, na což má vliv pokles teploty na 4 °C a přítomnost  $Ca^{2+}$  nebo kalmmodulinu. Dohromady tvoří tubuliny 75-85% mikrotubulu, zbývající část

mikrotubulu tvoří asociované proteiny, které stabilizují jeho strukturu. *In vitro* mohou tubuliny polymerizovat i na jiné tvary kromě mikrotubulů. Tvorba mikrotubulů může být inhibována sloučeninami, které se váží na pozitivním konci. Tento proces se nazývá capping a nastává vázáním mitotických jedů jako kolchicin, vinblastin, vinkristin nebo benzimidazolových léčiv na molekuly  $\beta$ -tubulinu. Z toho vyplývá, že mechanismem účinku je selektivní inhibice tvorby mikrotubulů.

Na rozdíl od léčiv účinkujících na nervový systém parazitů, účinkují pomaleji, tím že vyhladoví parazita a inhibicí produkce vajíček (Martin 1997). Při podávání fenbendazolu ovčím proti haemonchóze bylo zjištěno, že střeva parazita byla značně poškozená, DNA v jádře buněk střeva byla defragmentovaná jako při apoptóze a došlo k zastavení příjmu krve hostitele. Došlo k zastavení přesunu sekrečních vesikul a vylití jejich obsahu do cytoplasmy a těla parazita (Jasmer et al. 2000). Kromě účinku anthelmintického vykazují některé látky také účinky antifungální a je zde i účinek na savčí buňky, ale léčiva vykazují větší afinitu k buňkám parazitů, takže je jejich používání bezpečné (Lamka a Ducháček 2006). Díky jejich lipofilitě přechází do parazitů většinou přes povrch těla (Alvarez et al. 2007). Prvním z této skupiny byl thiabendazol, který byl objeven v roce 1961 (Dubey a Sanyal 2010). Mezi další zástupce patří například albendazol, mebendazol, flubendazol, fenbendazol a jeho proléčivo febantel. Flubendazol je metyl [5-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát (obr. 5). Jedná se o bílý až žlutý prášek takřka nerozpustný ve vodě, ethanolu, dichlormetanu (ČL 2009). Rozpuští se například v dimethylsulfoxidu. Účinkuje na nematoda i cestoda. Jeho ochranná lhůta je 0-15 dní. Nesmí být podáván březím samicím, protože vykazuje teratogenní účinky (Lamka a Ducháček 2006).



Obr. 5. Molekula flubendazolu



## Další metody léčby

Mezi alternativní metody patří například použití bylinných extraktů nebo oxidu měďnatého. Použití 2,5 až 5 g oxidu měďnatého vedlo ke snížení počtu vajíček vlasovky slézové v trusu, bohužel už 4 g vyvolávaly problémy u jehňat ovcí léčených v pozdních fázích březosti. Z extraktů rostlin se testovaly například kondenzované taniny, které snižovaly počet vajíček vlasovky v trusu koz a počty vajíček a plodnost *Trichostrongylus colubriformis* u ovcí. Podobně také extrakt z *Calotropis procera* vykazoval výbornou anthelmintickou aktivitu u ovcí. Navzdory škále možných rostlin s těmito vlastnostmi je zatím problémem vybrat možné kandidáty a extrahovat z nich účinné látky (Getachew et al. 2007).

Další možností jak snížit riziko je úprava pastvy případně sečení pastvin, které ve spojení s anthelmintiky zlepšují ekonomické výhledy. Výzkumy na tropických ostrovech v Tichém oceánu zjistily, že nejvyšší množství larev *Haemonchus contortus* nebo *Trichostrongylus colubriformis* je na pastvině týden po kontaminaci a po 9 týdnech již je množství stěží detekovatelné. Na základě těchto znalostí byl vyvinut systém rotace pastvin, který významně snižuje množství vajíček v trusu stejně jako nutnost použití anthelmintik. Bohužel na mnoha místech jako je například střední Afrika zdejší klimatické a sociální podmínky nedovolují využití této metody (Getachew et al. 2007). Tento systém také dovoluje pastvině více vyrůst a tím zajistí lepší výživu zvířete, které je tím pádem méně náchylné k nákaze. Výška rostlin také ovlivňuje možnosti nákazy, protože larvy se většinou pohybují kolem 2,5 cm. Zde bývá problém především u ovcí, které se pasou více u země než skot a spasou tedy více larev. Vzhledem i k omezenému pohybu larev od trusu (asi 30cm) mělo by se hlídat, aby se dobytek nepásl moc blízko vlastního trusu. Pastviny se též mohou střídát v rámci zvířat, která nemají stejné parazity jako koně nebo skot oproti kozám a ovcím. Dá se využít pastvin, které se používaly na seno, případně na pěstování užitkových plodin. Sluneční záření a s ním spojená zvýšená teplota a sucho zabijí larvy, takže může pomoci posečení pastvin na 8-10 cm, čímž se zvýší jejich expozice (Wells 1999). Další metodou je využití hub, které hubí larvy parazitů. Jsou dva druhy těchto hub, jedny jsou masožravé a tvoří adhezivní a neadhezivní vlákna, která chytají larvy, a druhé, které jsou endoparazitické a napadají červy nebo jejich vajíčka. K endoparazitickým, které napadají vlasovky, patří *Drechumeria coniospora* a *Harposporium anguillulae* zatímco dravé houby zastupuje *Arthrobotis oligospora* a *A. robusta*. Velký průlom v těchto

výzkumech znamenalo využití *Dunndingtonia flagrans*, které tvoří 3D lepivé sítě, které znehyní a tím zlikviduje larvy žijící v trusu. Navíc u něj bylo hlášeno, že jeho chlamydospory dokážou po orální aplikaci projít zažívacím traktem hostitele (Getachew et al. 2007). Pro odolnost proti helmintózám je také důležitá výživa zvířete, pokud je podvyživené tak je mnohem náchylnější. Zvláště v tomto pomáhá fosfor, kdy jehňata krmená zvýšenou dávkou měla při parazitóze o 40% větší přírůstek na váze než jehňata s nižším příjmem. Také proteiny, které se nerozkládají v žaludku, mají podobné účinky na zachování váhy. Jejich zdrojem mohou být některé rostliny a traviny (Wells 1999). Také je možné se zaměřit na šlechtění plemen, která jsou odolnější vůči nákaze, jak se podařilo v Austrálii a na Novém Zélandu. V rámci hostitele se dá také působit přímo na jeho imunitní systém a zvyšovat tím jeho odolnost. Již dlouho je snaha vytvořit vakcínu. Bylo testováno mnoho různých proteinů těchto parazitů. Dají se rozdělit na dvě skupiny, „přírodní“ neboli „konvenční“ antigeny jsou ty, které jsou běžně rozeznávány imunitním systémem při infekcích. Ty, které nejsou běžně rozeznávány nebo nevyvolávají imunitní reakci během běžné infekce, ale které mohou sloužit jako cíle imunitní reakce, jsou nazývané „skryté“. Přírodní antigeny jsou většinou povrchové antigeny nebo sekreční/exkreční produkty parazitů. Tyto vakcíny produkují určitou ochranu, která značně snižuje zamoření pastvin, ale nemusí být dostatečná pro jehňata s vážnou haemonchózou. Většina skrytých antigenů jsou epiteliální buňky trávicího traktu vlasovky slézové. Protilátky proti těmto molekulám po pozření krve parazitem dokáží efektivně snižovat množství parazitů. Bohužel tyto vakcíny zatím nejsou komerčně využívané (Getachew et al. 2007).

## **2.4 Rezistence**

### **2.4.1 Rezistence vlasovky slézové**

Vznik rezistence je stav kdy v populaci je větší množství jedinců nezasažených danou látkou nebo je potřeba použít vyšších koncentrací dané látky. Rezistence je dědičná. U anthelmintik většinou dochází k tomu, že rezistence je společná pro celou skupinu. Nyní se stále častěji stává, že rezistence je mnohonásobná pro více skupin léčiv. Pokud se rezistence jednou v populaci vyskytne, nebylo zatím pozorováno, že by někdy docházelo k její ztrátě. Před nasazením anthelmintika je většinou frekvence rezistentních alel v populaci nízká, protože mají nulový nebo negativní vliv na reprodukční možnosti jednotlivce.

Pro vývoj rezistence je několik omezení. Závisí na náhodě, na velikosti a rozmanitosti genetické informace populace, na životnosti a schopnosti se rozmnožovat u nositele rezistentní alely oproti nositelům bez rezistence. Nasazení léčby je velkým selekčním tlakem, kdy dochází ke zvyšování četnosti rezistence. Faktorů, které ovlivňují šíření rezistence v populaci, je několik. Mezi genetické patří například to, že rezistentní alely jsou dominantní jako u rezistence na avermektiny, takže se projeví i u heterozygotů. Také se na rezistenci může podílet více genů, kde čím větší je význam jednoho, tím rychleji se bude šířit. Vliv má také velká genetická diverzita helmintů ve spojení s velkými populacemi, to znamená, že rezistence je přítomna alespoň u malého množství jedinců. Vliv parazita se projevuje například tím, že má velkou plodnost a rychlý vývoj, čímž se rezistence rychle rozšiřuje. Přímý vývoj napomáhá tím, že rezistentní helminti se nemusí vyrovnávat s podmínkami v jiném hostiteli. Hostitel a jeho imunitní systém je také činitelem, přinejmenším tím že je potřeba napadené léčit.

Mechanismy rezistence jsou různé. Nejčastějším je změna kódování genu pro cílovou strukturu pro molekulu léčiva, také může dojít k častější expresi a větší tvorbě cílových struktur. Může také dojít ke zvýšení detoxikace léčiva pomocí biotransformačních enzymů, případně může dojít ke změně distribuce léčiva (Wolstenholme et al. 2004). Pokles plazmatických hladin zvyšuje šance parazitů na přežití. Stačí kontakt parazita se sníženou dávkou léčiva, aby došlo k aktivaci jeho obraného aparátu a následnému snížení účinku (Cvilink et al. 2009). Rezistence se vyvíjí velmi rychle, například u thiabendazolu byly první případy popsány již po 4 letech od uvedení na trh. První případy rezistence na benzimidazoly v Evropě byly prokázány u thiabendazolu přibližně 20 let po jeho uvedení do praxe. Rezistentním organismem byla *Teladorsagia circumcincta*. Po provedení studií se zjistilo, že je rezistentní na thiabendazol, fenbendazol, oxfendazol a albendazol. V roce 1984 Cawthorne a Cheong testovali ovce v jihozápadní Anglii a zjistili, že nejčastějším rezistentním parazitem zde byla vlasovka slézová. Pozdější výzkumy ale opět zjistili převahu rezistentních kmenů *T. circumcincta*. Rezistence je také obvyklejší u parazitů koz než ovcí, neboť kozy je potřeba léčit častěji, kvůli jejich větší citlivosti a také rychlejšímu metabolismu anthelmintik, který může způsobovat poddávkování. Také použití falešných nebo nekvalitních léčiv může vést k rozvoji rezistence.

Studii rezistentních kmenů *H. contortus*, *T. colubriformis* a *T. circumcincta* byly zjištěny mutace ve 200. aminokyselině u isotypu 1  $\beta$ -tubulinu. Rezistentní kmeny zde

mají tyrosin namísto fenylalaninu. Tento typ rezistence (záměna v genu pro  $\beta$ -tubulin) je prokázána i u antivykoticky působících benzimidazolů u plísní *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* a *Physarum polycephalum* (Beech et al. 1994). Předpokládalo se, že zde měly být dva mechanismy pro rezistenci na benzimidazoly. Selektce izotypu 1, který má nižší afinitu k benzimidazolům a eliminace citlivého isotypu 2 u zvláště rezistentních kmenů (Jackson a Coop 2000). Dále došlo k objevu polymorfizmu na kodonu 167, opět se jedná o záměnu tyrosinu za fenylalanin. Zjistilo se také, že i na isotypu 2 může dojít k této mutaci, což podpoří rezistenci. I v rámci izotypu 1 dochází k selekci výhodnějších alel, především alely 1A. (Beech et al. 1994). Poslední mutací je mutace na kodonu 198 a jedná se o záměnu adeninu za cytosin. (von Samson-Himmelstjerna et al. 2009) Kromě změn v genetickém kódu studie naznačují spojitost rezistence u nematod i změny efluxních transportérů jako je P-glykoprotein (Wolstenholme et al. 2004).

#### **2.4.2 Detekce rezistentních *H. contortus***

Rezistence se dá detekovat několika způsoby. Nejčastěji používaný je FECRT (fecal egg count reduction test). Jedná se o zlatý standard v určování rezistence. Jde o počítání vajíček parazitů během terapie a pak v určeném čase po jejím skončení. Tento čas se liší podle použitého anthelmintika. Na jistotu v použití testu musí být alespoň 25% červů rezistentních. Pro počítání se používá technika McMaster. Dalším testem, kterým se zjišťuje rezistence na benzimidazoly, je test líhnutí vajíček. Používá se thiabendazol díky dobré rozpustnosti ve vodě. Sesbíraná vajíčka se nechají inkubovat s různými koncentracemi thiabendazolu a následně se spočítají vylíhlé larvy a zbylá vajíčka. Dalším testem je test vývoje larev v mikroagaru. Při tomto testu se vajíčka nechají vyvíjet v agaru s anthelmintikem a počítají se třetí stádia larev. Z molekulárních metod se využívá PCR k vyhledání specifických mutací v genu pro  $\beta$ -tubulin. Omezením těchto testů je především to, pokud není rezistence vázaná na tyto geny (Coles et al 2005).

#### **2.4.3 Rezistentní kmeny *Haemonchus contortus***

##### **Kmeny ISE a BR**

V práci byly použity kmeny s různou citlivostí na anthelmintika. V základu jsou většinou kmeny značně geneticky rozdílné, proto se ke studiu využilo příbuzenského křížení (inbreeding), aby se vytvořily kmeny s fixovanými alelami. Z kmenů citlivých

na benzimidazoly se použil kmen SE, který pochází z Edinburgu a je z doby před nasazením anthelmintik. Z SE kmenu byl také postupně získán i kmen RE4, který je rezistentní na benzimidazoly. Inbreeding byl proveden tak, že se vstříkly larvy L3 do žaludku ovcí a následně se sbírala vajíčka, která se zmrazila pro pozdější výzkumy, potom se ovce utratila a další vajíčka se získala ze samic. Následně se u nich zjistila přítomnost isotypu 1 pro  $\beta$ -tubulin. Larvy, které neobsahovaly *Hpa I* fragment, byly použity pro inbreeding citlivého kmene a ty co obsahovaly pro rezistentní kmen. Následně proběhlo 15 generací HSM (half-sib mating) křížení. Koeficient inbreedingu byl pro oba kmény stanoven na 0,87. Zjišťování rezistence nebo citlivosti probíhalo pomocí testu líhnutí vajíček získaných z trusu nakažených zvířat a u posledních 3 generací i pomocí PCR  $\beta$ -tubulinového genu. Ve výsledku byly získány kmény ISE a IRE (BR), které se využívají k dalším pokusům (Roos et al. 2004).

### **Kmen WR (White River)**

Druhým rezistentním kmenem použitým v práci byl White River (WR). Tento kmen byl získán z oblasti White River v Lowveld v oblasti Transvaal v Jihoafrické republice. Jedná se o polyrezistentní kmen. Je rezistentní na ivermektin, benzimidazoly dále i na levamisol, radoxanid a u kmene White River II i klosantel (Gill et al. 1995, van Wyk et al. 1987).

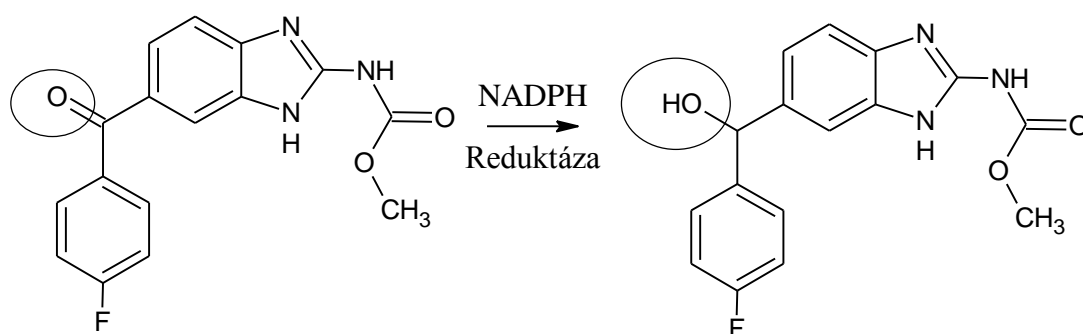
## **2.4.4 Metabolismus xenobiotik**

Xenobiotika jsou neustále přijímána z prostředí, ze stravy, léků, proto si organismy vytvořily enzymatický systém, který snižuje jejich toxicitu a zvyšuje jejich vylučování. Jde většinou o tvorbu polárnějšího metabolitu, který se snadněji vyloučí. První fáze zahrnuje oxidaci, redukci, hydrolýzu. Ve druhé fázi je xenobiotikum konjugováno s dalšími hydrofilními sloučeninami jako glutathion, glukuronová kyselina, aminokyseliny, sulfáty. V první fázi jsou nejdůležitější cytochromy P450 (CYP). Existují jich tisíce, jsou rozděleny do rodin a podrodin podle stavby jejich genů. Nejčastěji pracují jako monooxygenázy ale mohou fungovat i jako peroxidázy nebo reduktázy. U helmintů jsou důležité také z důvodu ochrany před reaktivními sloučeninami kyslíku, kterými se brání hostitelský systém. Oxidace jako ochrana před benzimidazoly albendazolem a thiabendazolem byla studována u mnoha druhů

nematod, mimo jiné i u *Haemonchus contortus*. Flavinové monooxygenázy jsou menší rodinou než CYP, ale hrají významnou roli v neutralizaci mnohých xenobiotik. Redukční enzymy se dělí do tří nadrodin: na dehydrogenázy s krátkým řetězcem, dehydrogenázy se středním řetězcem a aldoketoreduktázy. Hydrolázy mají význam především pro metabolismus endogenních látek, ale podílejí se i na zpracování některých xenobiotik. Ve druhé fázi se dále zvyšuje hydrofilita, aby mohlo dojít k vyloučení ledvinami do moči nebo játry do žluči. Nejčastěji dochází ke glukuronidaci, kterou provádějí UDP-glukuronosyl-transferázy. K dalším patří glutathion-S-transferázy, N-acetyltransferázy, sulfotransferázy. Třetí fází je exkrece xenobiotik z buňky, ať už v původní formě nebo po předchozích enzymatických úpravách. Do této skupiny patří ABC (ATP-binding cassette) transportéry (Cvilink et al. 2009).

### **Metabolismus flubendazolu**

*Haemonchus contortus* metabolizuje flubendazol redukcí jeho karbonylové skupiny. Enzymy, které tento proces provádějí, se nacházejí v cytosolu a jsou závislé na NADPH. Reakce je stereospecifická poměr vznikajících enantiomerů (-):(+) je 9:1. U savců a ptáků vzniká mimo redukovaného ještě hydrolyzovaný flubendazol. Ve druhé fázi biotransformace dochází u *H. contortus* u flubendazolu ke glukosidaci. U parentní látky vzniká N-glukosid, zatímco u redukované O-glukosid (Cvilink et al. 2008).



Obr. 6. Redukce flubendazolu

### **ABC transportéry**

Tyto proteiny slouží k různým účelům jako udržování homeostázy, přesun živin do buněk, dělení buněk a k ochraně před xenobiotiky, což často souvisí se vznikem rezistence. Patří k velmi starým strukturám společným pro většinu organismů. Hlavním

účelem je udržování homeostáze importováním a hromaděním živin v buňce a vylučováním toxinů z prostředí a jedovatých produktů metabolismu. Transportéry se skládají ze dvou transmembránových domén a dvou cytosolických domén vazajících nukleotidy (ATP-binding cassette). Přeměňují energii vazeb ATP ve změny konformace, čímž řídí influx a eflux substrátů. Podílejí se na rezistenci u bakterií, hub, plísní i savců. Nejdůležitějším z tohoto hlediska je P-glykoprotein (Jones a George 2005).

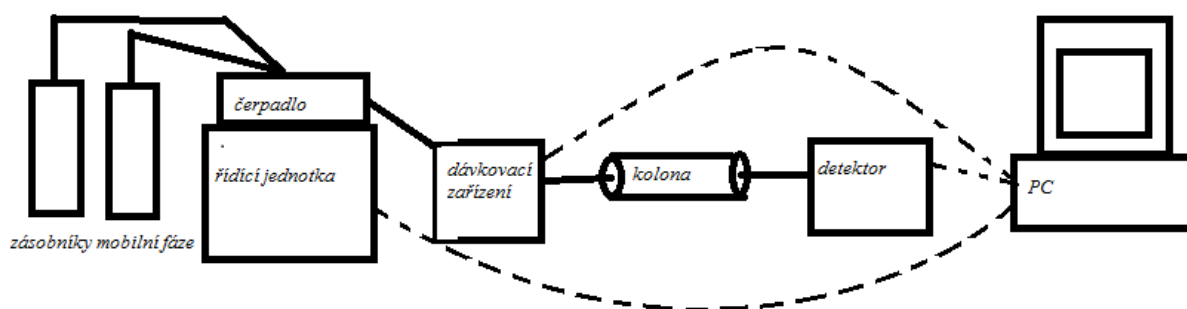
### **P-glykoprotein**

Patří do nadrodiny ABC transportérů. Jedná se o velký membránový protein. Dokáže transportovat velké množství liofilních látek přes membránu pomocí vázání a hydrolyzy ATP. Je často spojován s mnohočetnou rezistencí na léčiva, protože může snižovat množství léčiva v buňkách. Látky vstupují do buněk difúzí a ven jsou pumpovány P-glykoproteinem. V *H. contortus* byly identifikovány na základě genových sekvencí 4 typy P-glykoproteinu (Jones a George 2005). Vyskytuje se ve specifických tkáních primárně na basolaterálních membránách a může být indukován působením xenobiotik. Jeho činnost může být zablokována pomocí některých sloučenin. Patří k nim blokátory kalciového kanálu (verapamil, nifedipin), imunosupresiva (cyklosporin A), antiarytmika (chinin, amiodaron) nebo léky na HIV (sekinavir). Má velký vliv například u některých nádorů i bakterií. Například u krevničky *Schistosoma mansoni* je její rezistence na prazikvantel, způsobená nedostatečnou akumulací léčiva v těle parazita, spojována se zvýšením některých ABC proteinů včetně P-glykoproteinu a MRP (multidrug resistance protein). U motolic *Fasciola hepatica* a *Fasciola gigantica* byla snížena účinnost triklabendazolu zvýšením MRP-1. Z těchto výzkumů se vychází pro předpoklad rezistence u helmintů. U hlístice *Onchocera volvulus* došlo k redukci různorodosti alel pro P-glykoprotein u populací léčených ivermektinem (Alvarez et al. 2007). Podobně došlo k selekci specifických alel u populací *Haemonchus contortus* rezistentních na benzimidazoly. Ale nebyla zatím prokázána souvislost polymorfizmů se změnou transportu těchto léčiv (Jones a George 2005). Ale u kmene rezistentního na ivermektin byla zjištěna zvýšená exprese m-RNA pro P-glykoprotein. Podobně je to i u kmenů rezistentních na moxidektin (Alvarez et al. 2007).

## 2.5 HPLC a PCR

### 2.5.1 HPLC (high performance liquid chromatography)

V této práci bylo pro detekci produktů metabolismu použito vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jedná se o chromatografickou metodu, kdy jsou látky oddělovány pomocí různých sorbentů v kolonách, kterými rozpuštěné protékají. Kolony jsou zhotoveny většinou z oceli nebo ze skla, měří 10-25 cm a mají průměr 3-5 mm. Nejčastěji se používají chemicky vázané stacionární fáze, kdy jsou na silikagelových OH skupinách navázány další radikály. Ty mohou být buď nepolární (reverzní fáze), kdy se jedná o uhlovodíkové řetězce, nebo středně polární fáze, kdy je na krátkém tříuhlíkatém řetězci navázána polárnější skupina. Případně jako polární sorbenty mohou být použity silikagel a oxid hlinitý. Mobilní fáze může být buď stejná během celé analýzy, pak se jedná o isokratickou eluci, nebo se její složení s časem mění a nazývá se gradientová.



Obr. 7. Schéma HPLC

Charakteristikou HPLC je retenční (eluční) čas, který udává čas od nástřiku vzorku na kolonu do maxima daného chromatografického píku. Koncentrace látky se dá zjistit z plochy pod peakem. Citlivost a selektivita analýzy závisí na použitém detektoru. Nejčastěji jsou používány spektrofotometrické detektory, které proměřují absorpční elektromagnetického záření určité vlnové délky v eluátu. Používají se především UV-VIS spektra. Tento typ detekuje také flubendazol a redukovaný flubendazol, při absorpčním maximu 290nm. Dalším typem detektoru je fluorescenční detektor, pro látky vykazující fluorescenci, nebo jejich fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou méně univerzální ale citlivější. Detekuje redukovaný flubendazol i v malých koncentracích, proto je jeho využití výhodné. Dále se využívají detektory



elektrochemické, kde se měří veličina, která je ovlivněná koncentrací látky v eluátu, který elektrochemicky reaguje s elektrodou. Také je možné využít spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem (MS), kdy jsou molekuly zkoumané látky ionizovány a pak v magnetickém poli separovány podle náboje a hmotnosti (Klimeš et al. 2008, Nobilis et al. 2008).

### **2.5.2 PCR (polymerase chain reaction)**

Na detekci mutace v aminokyselině 200 v genu pro  $\beta$ -tubulin a tím i rezistentních alel v kmenech *H. contortus* bude využita polymerázová řetězová reakce (PCR). Polymerázová řetězová reakce je *in vitro* metoda k namnožení vybrané sekvence DNA. Využívá se činnosti DNA polymerázy, což je enzym, který syntetizuje DNA. Zapotřebí je mít pro danou sekvenci primer, což je oligonukleotid složený z opačných nukleotidů, tak aby byl komplementární k vlákně, které je třeba namnožit (templátové vlákno). Používají se většinou pro obě vlákna DNA. V první fázi je potřeba denaturovat DNA, aby se oddělily řetězce, používá se krátké zvýšení teploty. V další fázi nasedá polymeráza na primer a začíná syntézu z dodaných deoxyribonukleotidfosfátů. Po ukončení syntézy nových vláken se opět provede denaturace a celý cyklus se opakuje, dokud není získáno potřebné množství DNA (Alberts et al. 2005). Používá se zde taq polymeráza, což je polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která má tu výhodu, že pracuje při vyšší teplotě a především přežije opakovanou denaturaci DNA. Metoda se využívá pro detekci daných sekvencí nebo genů (Chien et al. 1976). Detekce produktu se dá provádět například spektrofotometricky nebo gelovou elektroforézou, což je metoda využívající pohybu částic v elektrickém poli. Rozdělení je podle délky řetězce. U gelové elektroforézy je třeba použít barviva, aby byl výsledek viditelný (Alberts et al. 2005).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo porovnání metabolismu flubendazolu a porovnání transportu flubendazolu u citlivého a rezistentních kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*). Práce byla provedena v rámci grantu Vývoj lékové rezistence u helmintů – možné mechanismy a obrana (GAČR č. P502/10/0217). Náplní práce bylo následující:

1. Inkubace flubendazolu s cytosolickými frakcemi tří kmenů (ISE, BR a WR) vlasovky slézové *in vitro* a určení kinetických parametrů redukce flubendazolu u těchto kmenů.
2. Sledování transportu flubendazolu u tří kmenů vlasovky slézové *ex vivo*. Sledování importu i exportu flubendazolu u těchto kmenů za různých podmínek (přidání verapamilu do média, porovnání živých a mrtvých parazitů).
3. Testování přítomnosti mutace ve 200. kodonu v genu pro  $\beta$ -tubulin u tří kmenů vlasovky slézové

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Chemikálie, přístroje a biologický materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Acetonitril, Sigma Aldrich

Agaróza, Serva

BSA, Sigma Aldrich

Bicinchoninová kyselina, Sigma Aldrich

DMSO, Penta

DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN

EDTA, Penta

Ethanol, Sigma Aldrich

Ethidiumbromid, Applichem

Etylacetát, Merck

FastStart SYBR Green Master, Roche Applied Science

Flubendazol, Sigma Aldrich

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Penta

Kys. boritá, Penta

NADPH, Merck

NH<sub>3</sub>, Penta

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Kulich

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Penta

NaHCO<sub>3</sub>, Penta

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Penta

Nanášecí pufr + „žebříček“, New England Biolabs

Primery pro PCR, Genera

### **4.1.2 Přístroje**

Centrifuga Eppendorf Centrifuge

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Centrifuga Mini Spin Plus

Hlubokomrazicí box Thermo Scientific

HPLC Agilent 1100 Series

HPLC Shimadzu

Koncentrátor Eppendorf Concentrator 5301

pH metr Thermo Orion

Přístroj pro provádění PCR v reálném čase qPCR iQ5, Bio-Rad

Spektrofotometr Tecan Infinite M 200

Systém čištění vody Millipore - Milli - Q

Thermomixer Comfort Eppendorf

Třepačka Velp ZX3

Ultracentrifuga Beckman

Ultrazvuk Bandelin Sonorex

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls Bandelin HD 2070

UV-transluminátor (GelDoc XR)

Váhy Scaltec SBC 22

Vortex MS2 Minishaker

### **4.1.3 Biologický materiál**

2-3 měsíce stará jehňata ovce domácí (*Ovis aries*) byla nakažena L3 larvami *H. contortus*. Perorálně byla vstříknuta suspenze s 5000 larvami. Byly použity a získány kmeny ISE (citlivý), BR (benzimidazolrezistentní) a WR (polyrezistentní). Vývoj probíhal 6 týdnů a následně byla jehňata poražena a vykvrvena. Dospělí červi byli získáni agarovou metodou dle Van Wyka et al. (1980) Potom byli červi promyti třikrát fyziologickým roztokem a zamražení na -80 °C.

## 4.2. Pracovní postupy

### 4.2.1 Pufry a roztoky

#### **Elektroforetický TRIS-borátový pufr**

Navážilo se 54,0 g trishydroxymethylaminomethanu, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA a doplnilo se redestilovanou vodou do jednoho litru a následně promíchalo. Před použitím se tento pufr ještě 10x zředil redestilovanou vodou.

#### **Roztoky FLU pro inkubace cytosolu s flubendazolem**

Rozpuštěním 1,5665 mg FLU v 5 ml DMSO byl připraven zásobní 1 mM roztok. Následně byly připraveny ředěním další roztoky

Tab.1 : Ředění roztoků FLU

| Zásobní roztoky | ml 1 mM roztoku FLU | ml DMSO |
|-----------------|---------------------|---------|
| 0,75 mM         | 0,75                | 0,25    |
| 0,5 mM          | 0,5                 | 0,5     |
| 0,25 mM         | 0,25                | 0,75    |
| 0,1 mM          | 0,1                 | 0,9     |
| 0,05 mM         | 0,05                | 0,95    |

#### **Roztok 1 mM NADPH**

5 mg NADPH se rozpustí v 2 ml redestilované vody a následně uchovává v chladu až do použití.

#### **Sodnofosfátový pufr 0,1 M pH 7,4**

Připraví se 1000 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (35,8 g se rozpustí v 1000 ml redestilované vody) a 250ml 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (3,9 g se rozpustí 250 ml). Obě složky se připraví do odměrných baněk a pak smíchají za stálého míchání a kontroly pH pomocí pH metru až do pH 7,4.

## 4.2.2 Zpracování biologického materiálu

### Příprava subcelulárních frakcí

*H. contortus* jednotlivých kmenů se rozevážili a přidal se k nim pufr. K 3,34 g kmenu ISE se přidaly 4 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4), k 2,56 g BR kmene se přidalo 3 ml pufru a k 6 g kmene WR se přidalo 6 ml pufru. Vzorky s pufrům se zhomogenizovaly (skleněný homogenizátor s teflonovým pístem + Sonopuls) a homogenát se přelil do kyvet a byla provedena první centrifugace (Heraeus, 5000 G, 4 °C, 20 min), supernatant se přelil do čisté kyvety a následně bylo opět zcentrifugováno (Heraeus, 20000 G, 4 °C, 60 min).

Peleta z této centrifugace se resuspendovala v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4) a opět zcentrifugována (Heraeus, 20000 G, 4 °C, 60 min) a resuspendací pelety v Na-fosfátovém pufru s 20 % (v/v) glycerolu se získala mitochondriální frakce

Supernatant z druhé centrifugace se přelil do kyvet pro ultracentrifugu Beckman a byl zcentrifugován (105000 G, 65 min, 4 °C). Vzniklý supernatant je frakcí cytosolu.

Peleta z předchozí centrifugace se resuspenduje v 5 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru (pH 7,4) a opět se zcentrifugovalo (Beckman 105000 G, 65 min, 4 °C). Získaná peleta se resuspendovala v Na-fosfátovém pufru s 20 % (v/v) glycerolu a tím byla získána mikrosomální frakce. Vzorky byly skladovány zmražené při -80 °C.

### Příprava biologického materiálu pro sledování transportu FLU

Nejprve byla jehňata odčervena albendazolem (dvě dávky perorálně, 30 mg/kg, dva po sobě jdoucí dny) až do momentu, kdy byl nález vajíček v trusu opakovaně negativní. 9 jehňat starých 3-4 měsíce bylo nakaženo třetím stádiem larev *H. contortus* (pro každý kmen 3 jehňata). Po sedmi týdnech byla omráčena a vykřvena a dospělí červi byli získáni agarovou metodou podle Van Wyka et al. (1980) Tito čerstvě získaní červi byli třikrát omyti 0,01 M Na-fosfátovým pufrům s pH 7,4; obsahujícím 60 µg/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu.

## 4.2.3 BCA Stanovení bílkoviny

Stanovení je založeno na reakci proteinů s  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí.  $\text{Cu}^{2+}$  přechází na  $\text{Cu}^{1+}$ , která při pH 10 tvoří s kyselinou bicinchoninovou (BCA)

modrofialové komplexy. Mezi intenzitou zabarvení a množstvím bílkoviny je přímá úměra, měří se tedy absorbance při 562 nm.

Nejprve byly připraveny roztoky:

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

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

Roztok C: Byl připraven smícháním roztoku A s roztokem B v poměru 50:1

1% roztok hovězího sérového albuminu (BSA) byl připraven z výchozího 20% roztoku. 0,5 ml 20% BSA bylo doplněno redestilovanou vodou do 10ml

Kalibrační křivka byla připravena ředěním 1% roztoku.

Tab. 2 : Ředění BSA pro kalibrační křivku

|   | Koncentrace BSA ( $\mu\text{g/ml}$ ) | roztok 1% BSA ( $\mu\text{l}$ ) | redestilovaná voda ( $\mu\text{l}$ ) |
|---|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0                                    | 0                               | 500                                  |
| 2 | 200                                  | 10                              | 490                                  |
| 3 | 400                                  | 20                              | 480                                  |
| 4 | 600                                  | 30                              | 470                                  |
| 5 | 800                                  | 40                              | 460                                  |
| 6 | 1000                                 | 50                              | 450                                  |

Cytosol se naředil 10x redestilovanou vodou a udělala se dvě ředění a z každého 4 vzorky, dohromady 8 paralelních měření pro jeden cytosol.

Napipetovalo se 10  $\mu\text{l}$  bílkoviny (cytosol nebo BSA) do každé jamky na mikrotitrační destičce, kromě 1. jamky, kam se pipetovalo 10  $\mu\text{l}$  redestilované vody. Do každé jamky se pomocí multikanálové pipety napipetovalo 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku C, následně se opatrně promíchalo a inkubovalo se v Thermomixeru při 37 °C po 30 minut. (Smith et al. 1985)

Následně se na spektrofotometru Tecan změřila absorbance při 562 nm.

#### **4.2.4 Inkubace FLU s cytosolem in vitro**

##### **Inkubace**

Byla provedena *in vitro* inkubace cytosolické frakce pro kmeny ISE, BR, WR se zásobními roztoky FLU v DMSO v koncentracích 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  a jako koenzym 1 mM NADPH. Byla provedena 3 paralelní měření pro každou koncentraci. Dále byl připraven slepý biologický vzorek bez FLU a slepý chemický vzorek bez cytosolické frakce.

V 1 mikrozkušavce: 3  $\mu\text{l}$  roztoku FLU

97  $\mu\text{l}$  0,1 M Na-fosf. pufru, pH 7,4

100  $\mu\text{l}$  roztoku NADPH

100  $\mu\text{l}$  cytosolické frakce

Ve slepém chemickém vzorku byla cytosolická frakce nahrazena 100  $\mu\text{l}$  pufru a ve slepém biologickém vzorku byl FLU nahrazen DMSO. Předem se nastavil termostat na 37 °C. Následně se do mikrozkušavek napipetoval roztok FLU, Na-fosf. pufr a roztok NADPH, následně se směs dala do ledu a přidala se cytosolická frakce. Vše se inkubovalo 30 minut při 37 °C. Inkubace se ukončila zchlazením na 0 °C a přidáním 30  $\mu\text{l}$  koncentrovaného amoniaku.

##### **Extrakce a rekonstituce**

Ke směsi se přidalo 700  $\mu\text{l}$  etylacetátu, následně se vše 2 minuty třepalo na třepačce a potom se směs zcentrifugovala při 5000 otáčkách po 3 minuty. Následně se odpipetuje organická frakce a zkumavky s ní se dají odpařit do koncentrátoru (program 2; 45 °C). Vysušené vzorky se skladovaly v chladničce až do rekonstituce. Rekonstituce byla provedena rozpuštěním ve 400  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a fosfátového pufru (0,025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) v poměru 2:8. Rekonstitovalo se pomocí ultrazvuku na 10 minut.

##### **Vyhodnocení**

Vyhodnocení probíhalo na HPLC Shimadzu s detekcí pomocí UV-VIS při 290 nm. HPLC se skládalo z degaseru GT-154, pumpy LC-10ADvp, autosampleru SIL-10ADvp, termostatu kolony CTO-10Avp, UV/VIS detektoru SPD-M10Avp,



spektrofluorometrického detektoru RF-10AXL a řídicí jednotky SCL-10Avp. Celé kontrolováno programem Shimazu software CLASS-VP. Byla použita kolona Ascentis Express C18 (10 cm x 3,0 mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ) s předkolonou Supelguard Ascentis® C18 (20x4,0 mm; 3  $\mu\text{m}$ ). Eluce byla isokratická s použitím směsi 0,025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a acetonitrilu 7:3 s průtokem 0,7 ml/min. Nástřik byl 20  $\mu\text{l}$  a analýza jednoho vzorku trvala 22 minut. UV/VIS detektor detekoval v 246 nm a 300 nm (sken 195-380 nm). Spektrofluorimetrický detektor měl excitační vlnovou délku 290 nm a emisní 320 nm. (Bártíková et al. 2009)

#### **4.2.5 Transport FLU u *H. contortus***

##### **Import FLU**

Do destičky s 24 jamkami bylo umístěno 5 červů (hmotnost 6-8 mg) do každé jamky. Dále k nim bylo přidáno 0,5 ml RPMI média s penicilinem (60  $\mu\text{g/ml}$ ) a streptomycinem (100  $\mu\text{g/ml}$ ) takto byli inkubováni při 38 °C ve vlhké atmosféře s 5 %  $\text{CO}_2$ , následně bylo médium odstraněno a bylo přidáno nové médium s 5  $\mu\text{M}$  FLU a s přídatkem nebo bez 50  $\mu\text{M}$  verapamilu. Obě látky byly rozpuštěny v DMSO. Mrtví červi byli získáni vložením na 15 minut do mrazicího boxu s -80 °C. Následně byli červi s FLU, případně s verapamilem inkubováni 1; 5; 15; 30 a 60 minut. Každá inkubace byla udělána ve třech provedeních pro každý čas. Byly připraveny dva typy slepých vzorků jeden s FLU (+ verapamilem) bez biologického materiálu, druhý s červy ale bez FLU pouze s DMSO. Po inkubaci bylo médium přemístěno do mikrozkušavek, červi třikrát omyti 1 ml Na-fosfátového pufru a dáni do mikrozkušavek. Vzorky se skladovaly zmražené při -80 °C.

##### **Export FLU**

Probíhalo podobně jako import. Pět živých červů bylo dáno do jedné jamky a s RPMI médiem s 5  $\mu\text{M}$  FLU inkubováno 2 hodiny. Po inkubaci bylo médium odstraněno a červi byli třikrát omyti 1 ml Na-fosfátového pufru. Potom se k nim přidalo čerstvé RPMI médium bez FLU, které mohlo obsahovat 50  $\mu\text{M}$  verapamil. V intervalech 1; 5; 15; 30 a 60 minut bylo médium odstraněno, aby se určil export FLU do média. Byly provedeny tři paralelní měření pro každou zkoušku. Export z mrtvých *H. contortus* byl proveden stejně s tím, že červi byli umístěni po dvouhodinové inkubaci na 15 minut do -80 °C. Vzorky byly před analýzou uchovány v -80 °C.

## **Analýza vzorků**

Před analýzou byli červi zhomogenizováni v 0,2ml 0,1 M fosfátového pufru s pH 7,4 pomocí homogenizátoru Sonopuls, bylo přidáno 30  $\mu$ l 25 % amoniaku a 700  $\mu$ l etylacetátu. Z média bylo odebráno 0,4 ml, alkalizováno 40  $\mu$ l 25 % amoniaku a přidáno 1000  $\mu$ l etylacetátu. Následně byly vzorky 10 minut třepány na třepače a zcentrifugovány (10000 G; 3 minuty). Přídavek etylacetátu a následné třepání a centrifugace byly provedeny pro každý vzorek dvakrát, etylacetát byl přepipetován do mikrozkušavky a následně odpařen. Do analýzy byly vzorky skladovány v lednici.

Rekonstituce vzorků byla provedena 100  $\mu$ l mobilní fáze, která se skládala z  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufru (0,025 mol/l; pH 3) a acetonitrilu v poměru 72:28. Analýza byla provedena na chromatografu Agilent Technologies 1200SL, sestávajícího z degasseru, 1200 SL lampy, 1200 SL plus autosampleru, TCC Infinity 1290 termostatu kolony a 1200 SL diodového detektoru. Systém byl kontrolován programem Agilent ChemStation, verze B.04.02 rozšířený o spektrální modul. Byla použita předkolona Supelguard Ascentis® C18 (20x4,0 mm; 3  $\mu$ m) a kolona Ascentis® Express C18 (100x3,0 mm; 2,7  $\mu$ m). Průtok byl nastaven na 0,8 ml/min, chromatogramy zaznamenávány při 246 nm. Nástřik vzorku byl 80  $\mu$ l s trváním analýzy 13 minut. Retenční čas flubendazolu byl 7,1 minuty a verapamilu 10,2 minuty.

### **4.2.6 PCR**

#### **Izolace DNA pomocí kitu**

Jeden *H. contortus* byl rozmražen a vložen do mikrozkušavky. Potom k němu bylo přidáno 180  $\mu$ l pufru ATL a následně se přidalo 25  $\mu$ l proteinázy K. Mikrozkušavka se protřepala a následně se inkubovala 1 hodinu při 56 °C s občasným protřepáváním. Následně se přidalo 200  $\mu$ l pufru AL důkladně se protřepalo a přidalo se 200  $\mu$ l ethanolu a směs se opět důkladně protřepala. Celá směs se přepipetovala do kolonky s 2 ml mikrozkušavkou a zcentrifugovala (6000 G, 1 min) a následně se kolonka přesunula do nové mikrozkušavky. Přidalo se 500  $\mu$ l pufru AW1 zcentrifugovalo se (6000 G; 1 min) a kolonka se přesunula do nové mikrozkušavky. Zde se přidalo 500  $\mu$ l pufru AW2 a zcentrifugovalo se (20000 G, 3 min) a kolonka se přesunula do 1,5 ml mikrozkušavky a přidalo se 200  $\mu$ l elučního pufru AE. Následně

se počkalo 1 minutu a zcentrifugovalo se (6000 G; 1 min). Vzorky se do použití uchovávaly v lednici (4-8 °C).

### **Provedení PCR pomocí FastStart SYBR Green Master kitu**

Připravily se mastermixy pro citlivé a rezistentní alely. Před použitím se primery a DNA promíchaly a krátce zcentrifugovaly u kitu se promíchání provedlo pomocí pipety. Napipetovalo se 42,5 µl redestilované vody dále se přidalo 2,5 µl forward primeru pak 2,5 µl reverse primeru a následně 62,5 µl kitu. Toto množství bylo určeno pro provedení PCR s 5 vzorky. Tento mastermix se rozpipetoval po 22 µl do stripu a následně se přidalo 3 µl DNA. Pro citlivé alely se použily primery PN1 a PH4M / PH4, pro rezistentní PN1 a PH5M / PH5.

Následně se stripy daly do přístroje qPCR iQ5 (Bio-Rad) a nastavilo se provedení samotné PCR. Aktivační fáze má jeden cyklus při 95 °C a trvá 10 minut, následně bylo provedeno 40 cyklů kvantifikace (1. fáze 95 °C; 10 min, 2. fáze a) 95 °C, 15 s; b) 65 °C, 60 s; c) 72 °C, 55 s; 3. fáze: a) 72 °C 10 min; b) zchlazení 4 °C, doba neomezena).

### **Příprava 1,5 % agarózového gelu**

Do Erlenmayerovy baňky se navázilo 0,375 g práškové agarózy a přidalo se 50 ml elektroforetického TRIS-borátového pufru a celé se zamíchalo a zahřálo v mikrovlné troubě do rozpuštění. Roztok se nechal zchladnout na přibližně 55 °C. Přidalo se 50 µl roztoku ethidiumbromidu, zamíchalo a roztok se přelil do formy na gel s připraveným hřebínkem a nechalo se 45 minut tuhnout.

### **Gelová elektroforéza DNA**

Gel se vložil do elektroforetické vany a zalil elektroforetickým TRIS-borátovým puftrem. Vzorky DNA z PCR se smíchaly s 5 µl nanášecího pufru New England Biolabs, promíchaly a 20 µl směsi se napipetovalo do jamek v gelu. Hmotnostní standard se vytvořil z 1,5 µl nanášecího pufru a 0,5 µl „žebříčku“ (New England Biolabs), což je standardizovaná DNA o určitých délkách, podle které se porovnává velikost určované DNA, a napipetovalo se jej 2 µl do krajní jamky v gelu. Následně se uzavřel elektrický obvod a při napětí 105 V se nechalo rozdělovat přibližně 1 hodinu.

Po ukončení se gel přesunul na UV-transluminátor (GelDoc XR) a detekovaly se výsledky.

## 5. VÝSLEDKY

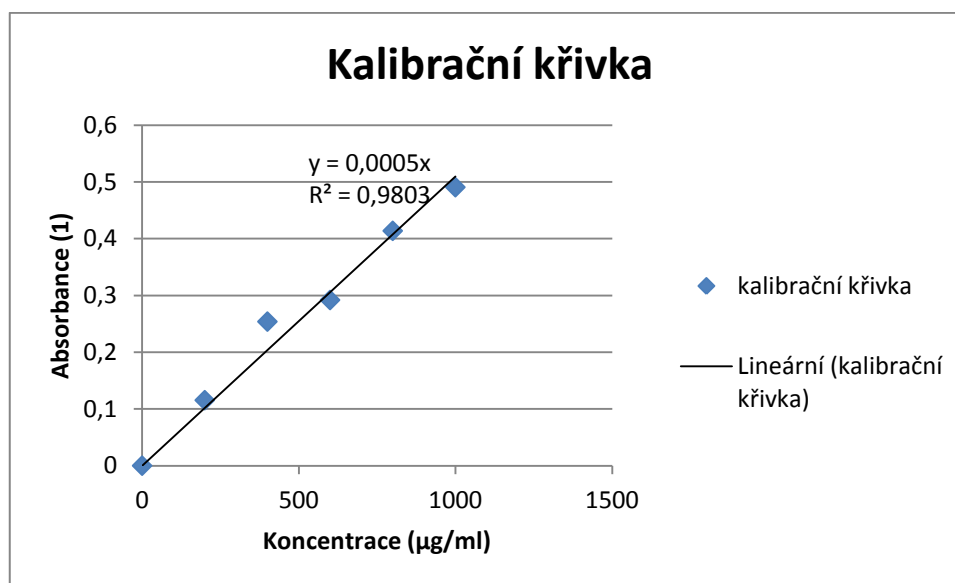
### 5.1 Stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích

Byly testovány vzorky cytosolické frakce se kterými se pracovalo v dalších částech. Byla vytvořena kalibrační křivka a z ní spočítány dané koncentrace. Stanovení proběhlo metodou BCA (Kapitola 4.2.3). Od hodnot absorbance byla odečtena hodnota slepého vzorku (koncentrace 0)

Z naměřených hodnot byla vytvořena následující kalibrační křivka.

Tab. 3: Závislost absorbance na koncentraci BSA

| Koncentrace standardu ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0 | 200      | 400     | 600      | 800      | 1000     |
|--|---|----------|---------|----------|----------|----------|
| Absorbance                                 | 0 | 0,115379 | 0,25383 | 0,291842 | 0,413692 | 0,490592 |



Obr. 8: Kalibrační křivka pro stanovení bílkoviny

Rovnice kalibrační křivky je  $y = 0,0005x$  a z ní byly vypočítány následující hodnoty (v tabulce, 16 měření pro každý vzorek)

Tab. 4: Koncentrace bílkoviny v cytosolické frakci kmenů *H. contortus*

| Kmen                          | ISE     | BR      | WR      |
|-------------------------------|---------|---------|---------|
| Koncentrace bílkoviny (mg/ml) | 3,55233 | 3,75396 | 7,01837 |
| Odchylka (%)                  | 10,57   | 10,08   | 7,07    |

## 5.2 Biotransformace FLU u citlivého (ISE) a resistantních (BR, WR) kmenů

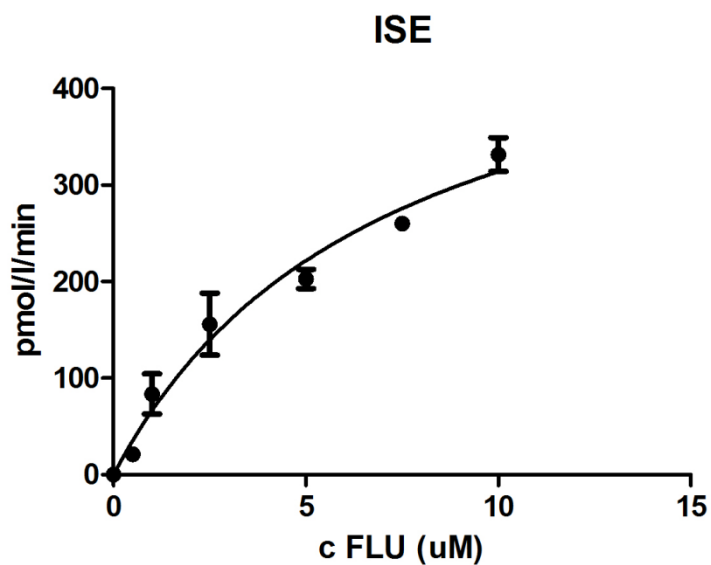
Při dřívějších experimentech bylo zjištěno, že *in vitro* dochází k redukci FLU pouze v cytosolické frakci s NADPH (Cvilink et al 2008). Byla provedena inkubace tří kmenů *H. contortus* (ISE, BR, WR) s koncentracemi FLU 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 a 10  $\mu\text{M}$  a koenzymem NADPH (1mM). Byly vytvořeny slepé biologické vzorky, které neobsahovaly FLU a slepé chemické vzorky neobsahující biologický materiál. Pomocí HPLC byla zjištěna koncentrace redukovaného FLU ve všech vzorcích (Kapitola 4.2.4). Výsledky z HPLC měření byly přepočítány na aktivitu pomocí programu MS Excel 07 a jsou průměrem ze tří paralelních pokusů. Přepočet probíhal podle vzorce:

$$\text{rychlost} = \frac{\text{koncentrace přepočtená na nástřik } 7 \mu\text{l}}{30} \times 1000 \quad (\text{pmol/min/l}).$$
 Grafy kinetik a kinetické veličiny byly vypočítány v programu Graphpad Prism.

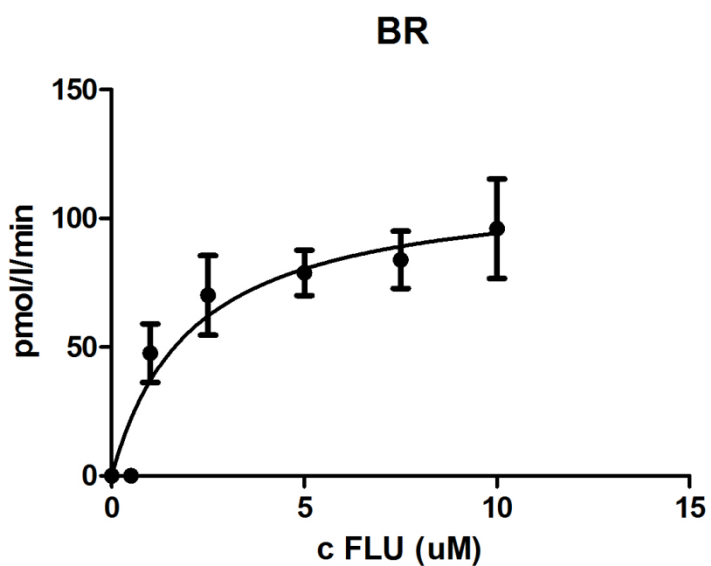
Tab. 5: Kinetika redukce FLU pro jednotlivé kmene *H. contortus*

| koncentrace FLU ( $\mu\text{M}$ ) | ISE                                 | BR                                  | WR                                  |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                   | rychlost (mol/min/l) $\pm$ odchylka | rychlost (mol/min/l) $\pm$ odchylka | rychlost (mol/min/l) $\pm$ odchylka |
| 0,0                               | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 0,0 $\pm$ 0,0                       |
| 0,5                               | 21,3 $\pm$ 0,0                      | 0,0 $\pm$ 0,0                       | 0,0 $\pm$ 0,0                       |
| 1,0                               | 83,6 $\pm$ 20,8                     | 47,7 $\pm$ 11,4                     | 11,5 $\pm$ 10,0                     |
| 2,5                               | 156,0 $\pm$ 32,3                    | 70,2 $\pm$ 15,4                     | 37,7 $\pm$ 3,4                      |
| 5,0                               | 202,8 $\pm$ 9,9                     | 78,9 $\pm$ 8,8                      | 93,2 $\pm$ 15,3                     |
| 7,5                               | 260,1 $\pm$ 7,4                     | 83,9 $\pm$ 11,1                     | 157,8 $\pm$ 8,5                     |
| 10                                | 331,6 $\pm$ 17,6                    | 96,0 $\pm$ 19,3                     | 190,9 $\pm$ 1,0                     |

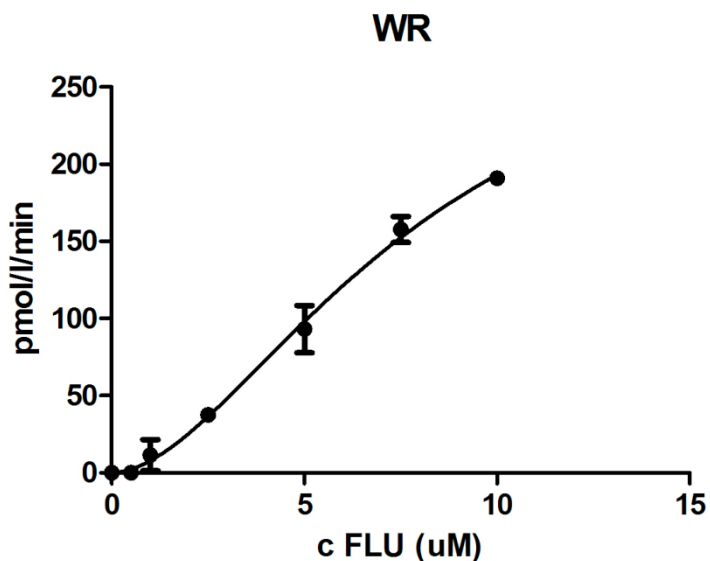
Při koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  byl redukovaný FLU detekovatelný pouze u kmene ISE, u kmenů WR a BR se nedal chromatografický pík rozlišit. Pro všechny koncentrace FLU byla rychlost nejvyšší u citlivého kmene ISE. U kmene BR byla vyšší rychlost u koncentrace 1,0; 2,5  $\mu\text{M}$  oproti kmeni WR, ale v koncentracích 5  $\mu\text{M}$  a výše je vyšší rychlost u kmene WR.



Obr. 9 : Kinetika redukce FLU u citlivého kmene ISE, osa x: koncentrace flubendazolu ( $\mu\text{M}$ ), osa y: rychlost reakce ( $\text{pmol/l/min}$ )

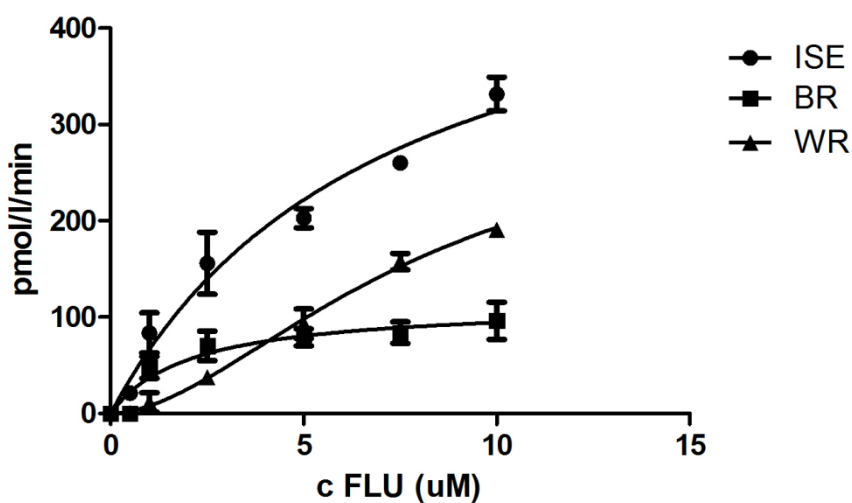


Obr. 10: Kinetika redukce FLU u kmene rezistentního na benzimidazoly BR, osa x: koncentrace flubendazolu ( $\mu\text{M}$ ), osa y: rychlost reakce ( $\text{pmol/l/min}$ )



Obr. 11: Kinetika redukce FLU u polyrezistentního kmene WR, osa x: koncentrace flubendazolu ( $\mu\text{M}$ ), osa y: rychlost reakce (pmol/l/min)

Kinetika reakcí má závislost Michaelis-Mentenové pro grafy kmenů ISE a BR. Pro kmen WR je závislost sigmoidální. Z grafu na obr. 12 je vidět, že kmen BR se rychle dostane na maximální rychlost, která je ovšem nižší než u zbývajících kmenů.



Obr. 12: Porovnání kinetiky u všech tří kmenů

Pomocí programu Graphpad Prism byly také vypočítány parametry kinetiky.



Tab 6: Kinetické parametry biotransformace FLU u kmenů ISE, BR, WR

|                         | ISE           | BR            | WR             |
|-------------------------|---------------|---------------|----------------|
| $V_{\max}$ (pmol/l/min) | 538,4 ± 93,00 | 113,9 ± 17,51 | 322 ± 60,24    |
| $K_m$ (μM)              | 7,146 ± 2,372 | 2,089 ± 1,008 |                |
| $K_{\text{prime}}$ (μM) |               |               | 39,89 ± 6,789  |
| h                       |               |               | 1,775 ± 0,2212 |

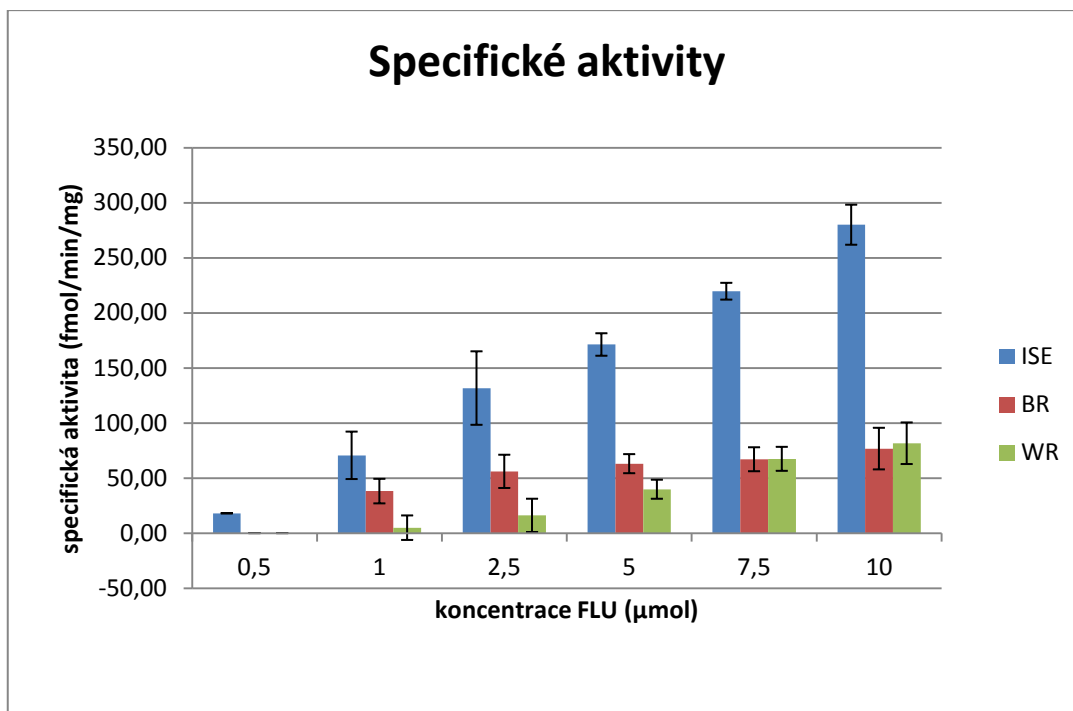
$V_{\max}$  označuje maximální rychlost reakce,  $K_m$  je Michaelisova konstanta, která označuje koncentraci substrátu, při které je maximální rychlost poloviční (čím nižší je tím je křivka strmější),  $K_{\text{prime}}$  je podobná Michaelisově konstantě pro sigmoidální závislost, h je Hillův koeficient, který u sigmoidální závislosti označuje, jestli další substrát ovlivňuje rychlost reakce pozitivně ( $h > 1$ ) nebo negativně ( $h < 1$ ).

Z hodnot je zřejmé, že nejvyšší rychlost je u citlivého kmene ISE a nejnižší u kmene rezistentního na benzimidazoly BR. Hodnoty  $K_m$  jsou u BR kmene naopak nejnižší, takže saturace enzymu a nástup maximální rychlosti je zde nejrychlejší. Hodnota h u kmene WR je vyšší než 1, což značí, že další substrát zvyšuje biotransformaci FLU.

Byla také vypočítána specifická aktivita reduktáz FLU vztažená na množství bílkoviny (enzymů) v cytosolu.

Tab 7: Specifické aktivity

|                      | ISE  | BR   | WR   |
|----------------------|--|--|--|
| koncentrace FLU (μM) | specifická aktivita (fmol/min/mg) ± odchylka | specifická aktivita (fmol/min/mg) ± odchylka | specifická aktivita (fmol/min/mg) ± odchylka |
| 0                    | 0,0 ± 0,0                                    | 0,0 ± 0,0                                    | 0,0 ± 0,0                                    |
| 0,5                  | 18,0 ± 0,0                                   | 0,0 ± 0,0                                    | 0,0 ± 0,0                                    |
| 1                    | 70,6 ± 21,5                                  | 38,1 ± 11,1                                  | 4,9 ± 5,2                                    |
| 2,5                  | 131,7 ± 33,4                                 | 56,1 ± 15,1                                  | 16,1 ± 1,8                                   |
| 5                    | 171,3 ± 10,2                                 | 63,1 ± 8,7                                   | 39,8 ± 8,0                                   |
| 7,5                  | 219,7 ± 7,6                                  | 67,1 ± 10,9                                  | 67,4 ± 4,4                                   |
| 10                   | 280,1 ± 18,2                                 | 76,7 ± 18,9                                  | 81,6 ± 0,6                                   |



Obr. 13: Porovnání specifických aktivit reductáz FLU citlivého a rezistentních kmenů *H. contortus*

Nejvyšší aktivitu reductáz FLU má kmen ISE ve všech koncentracích. Při nižších koncentracích má nejnižší aktivitu kmen WR ale s rostoucími koncentracemi FLU se jeho aktivita zvyšuje, až se u koncentrace 7,5 µM vyrovná aktivitě kmene BR. U koncentrace 10 µM je aktivita u kmene WR vyšší než u kmene BR.

### 5.3 Transport flubendazolu

Test importu a exportu flubendazolu byl proveden s živými i mrtvými *H. contortus*. Zaměřuje se především na funkci transportních proteinů (P-glykoproteinu). U flubendazolu se předpokládá, že do buněk parazita proniká sám díky své lipofilitě (Alvarez et al. 2007). Byly provedeny pokusy s přidáním verapamilu, který funguje jako inhibitor P-glykoproteinu.

#### 5.3.1 Import flubendazolu

Testování importu bylo provedeno inkubací červů s roztokem 5 µM flubendazolu a následně se pomocí HPLC zjišťovalo, kolik flubendazolu se dostalo do červů (Kapitola 4.2.5). Hodnoty koncentrace byly spočítány v poměru k hmotnosti červů.

Tab. 8: Hmotnost červů v reakci

|              | ISE     | BR       | WR       |
|--------------|---------|----------|----------|
| Hmotnost (g) | 0,00848 | 0,006085 | 0,007345 |

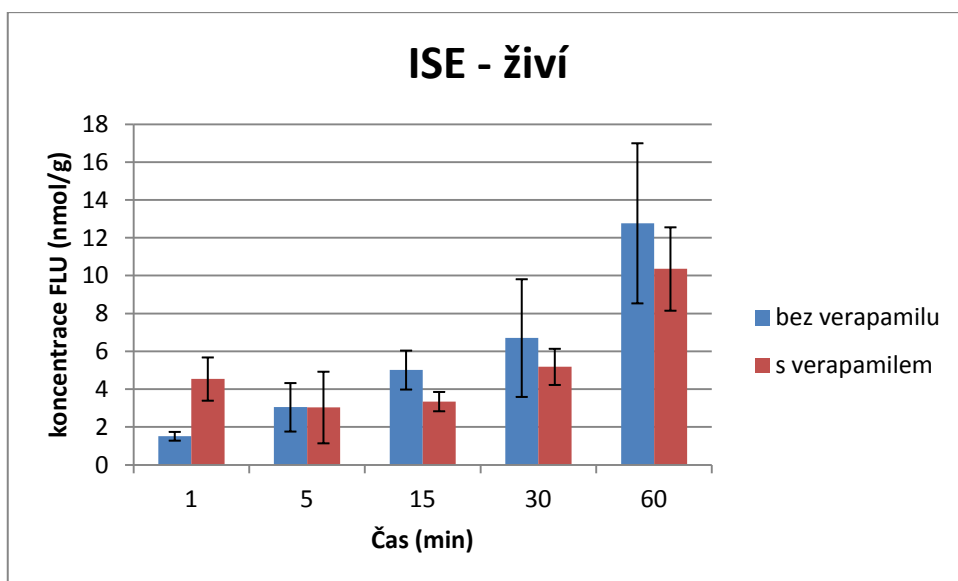
Tab. 9: Koncentrace FLU importovaného do *H. contortus*

|           | živí                                |                                     | mrtví                               | Kmen |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------|
|           | bez verapamilu                      | s verapamilem                       | bez verapamilu                      |      |
| Čas (min) | Koncentrace FLU (nmol/g) ± odchylka | Koncentrace FLU (nmol/g) ± odchylka | Koncentrace FLU (nmol/g) ± odchylka |      |
| 1         | 1,5 ± 0,2                           | 4,5 ± 1,1                           | 2,0 ± 0,3                           | ISE  |
| 5         | 3,0 ± 1,3                           | 3,0 ± 1,9                           | 4,0 ± 1,1                           |      |
| 15        | 5,0 ± 1,0                           | 3,3 ± 0,5                           | 8,0 ± 0,6                           |      |
| 30        | 6,7 ± 3,1                           | 5,2 ± 1,0                           | 9,6 ± 1,2                           |      |
| 60        | 12,8 ± 4,2                          | 10,4 ± 2,2                          | 11,2 ± 2,5                          |      |
| 1         | 4,3 ± 2,3                           | 2,1 ± 0,0                           | 2,4 ± 0,9                           | BR   |
| 5         | 10,4 ± 0,3                          | 7,5 ± 4,4                           | 2,8 ± 0,9                           |      |
| 15        | 8,1 ± 2,1                           | 6,4 ± 3,1                           | 4,1 ± 1,1                           |      |
| 30        | 14,0 ± 5,1                          | 11,8 ± 8,3                          | 5,2 ± 1,7                           |      |
| 60        | 24,7 ± 8,5                          | 12,4 ± 2,9                          | 8,5 ± 1,6                           |      |
| 1         | 3,5 ± 1,0                           | 3,7 ± 1,0                           | 2,8 ± 0,4                           | WR   |
| 5         | 4,1 ± 1,2                           | 3,3 ± 0,7                           | 4,4 ± 2,1                           |      |
| 15        | 11,1 ± 2,8                          | 3,1 ± 0,6                           | 6,4 ± 1,3                           |      |
| 30        | 9,6 ± 1,0                           | 5,9 ± 0,2                           | 7,0 ± 1,9                           |      |
| 60        | 17,8 ± 4,6                          | 13,4 ± 2,8                          | 9,7 ± 2,9                           |      |

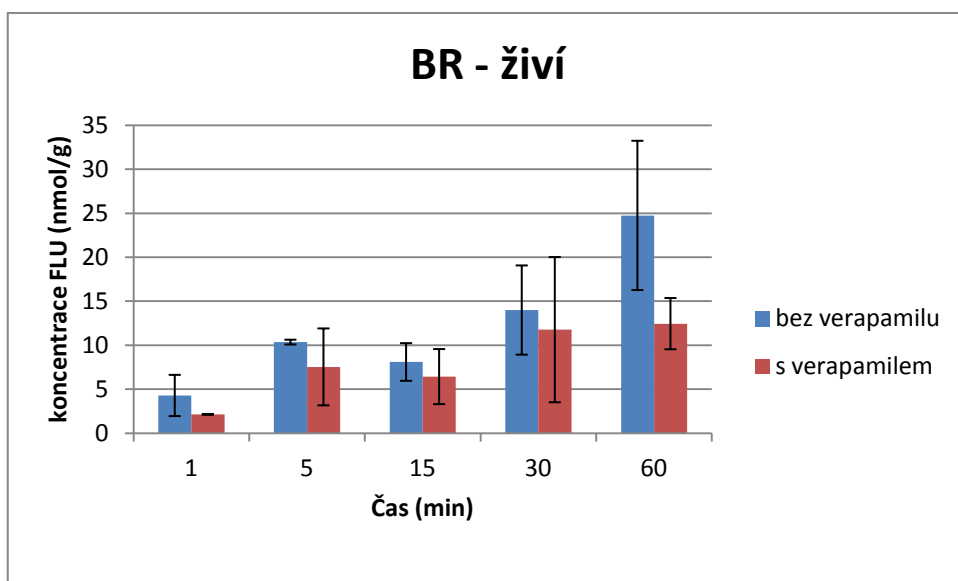
U kmene ISE se koncentrace FLU uvnitř vlasovek zvyšovala s časem ve všech případech. U kmene BR došlo u živých vlasovek ke snížení koncentrace v čase 15 min oproti koncentraci v 5. minutě. U kmene WR došlo ke snížení ve 30. minutě bez přídavku verapamilu a v 15. minutě s jeho přídavkem. U mrtvých vlasovek je koncentrace postupně se zvyšující s časem u všech tří kmenů.

Hodnoty byly následně zpracovány do grafů k porovnání různých hledisek

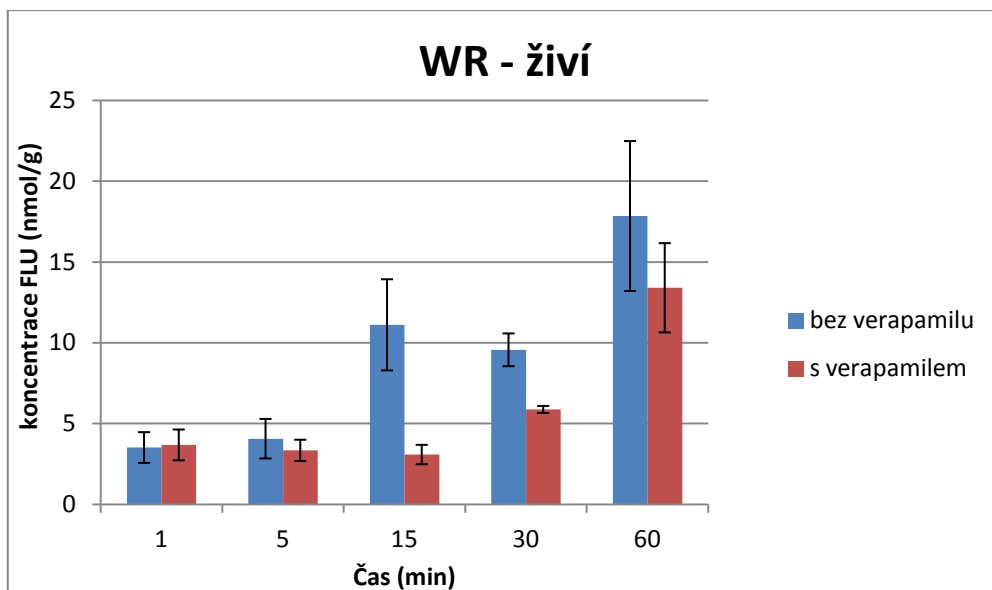
## Porovnání jednotlivých kmenů vzhledem k přidavku verapamilu do média



Obr. 14: Porovnání importu FLU s verapamilem a bez něho u živých *H. contortus* kmene ISE



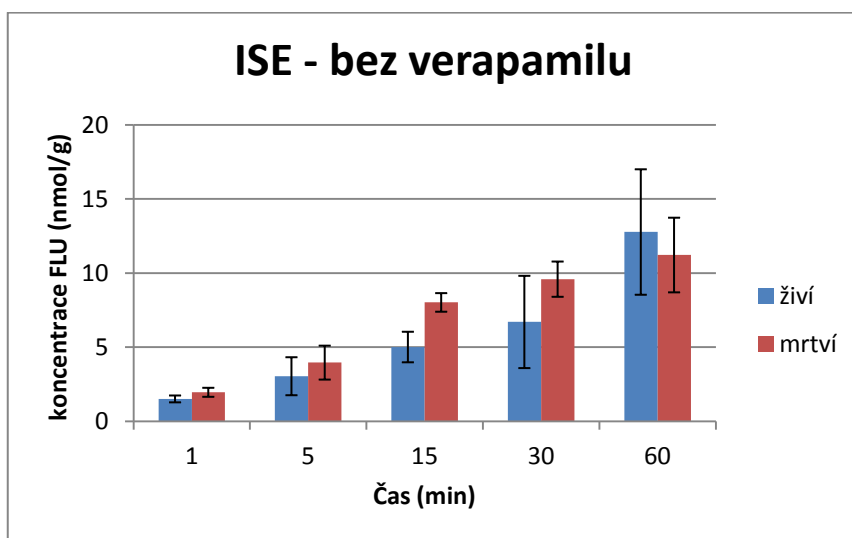
Obr. 15: Porovnání importu FLU s verapamilem a bez něho u živých *H. contortus* kmene BR



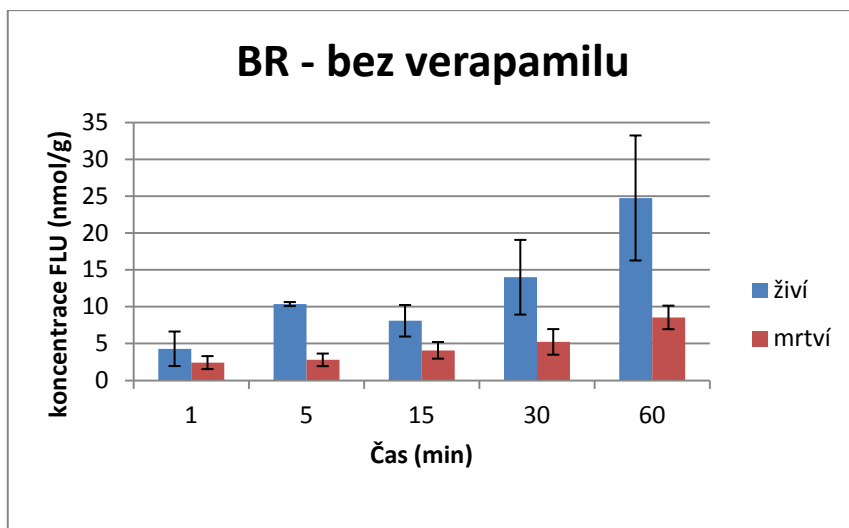
Obr. 16: Porovnání importu FLU s verapamilem a bez něho u živých *H. contortus* kmene WR

U většiny vzorků všech tří kmenů je vidět mírný pokles koncentrací u vzorků, kde byl přítomen verapamil jako inhibitor P-glykoproteinu. Pokles ovšem není statisticky významný a v některých vzorcích k poklesu vůbec nedošlo.

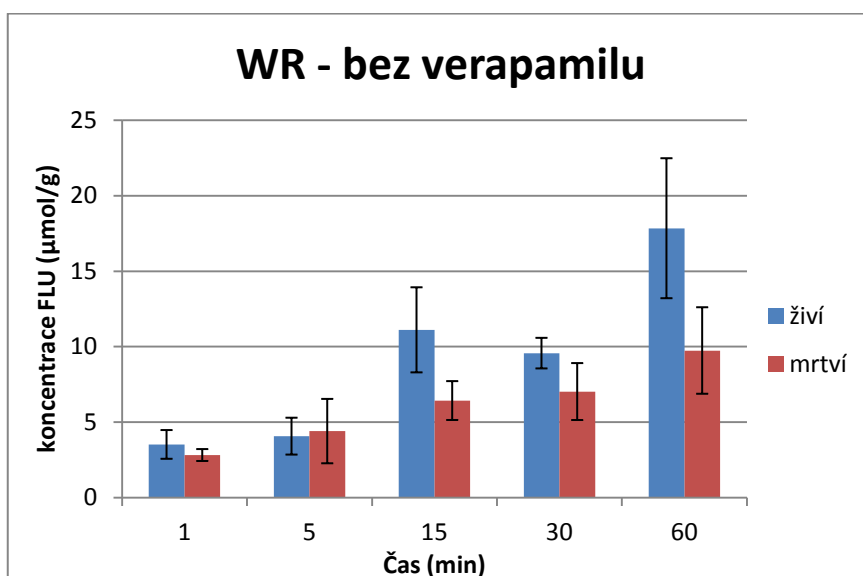
#### Porovnání importu u živých a mrtvých *H. contortus*



Obr. 17: Porovnání importu u živých a mrtvých *H. contortus* kmene ISE

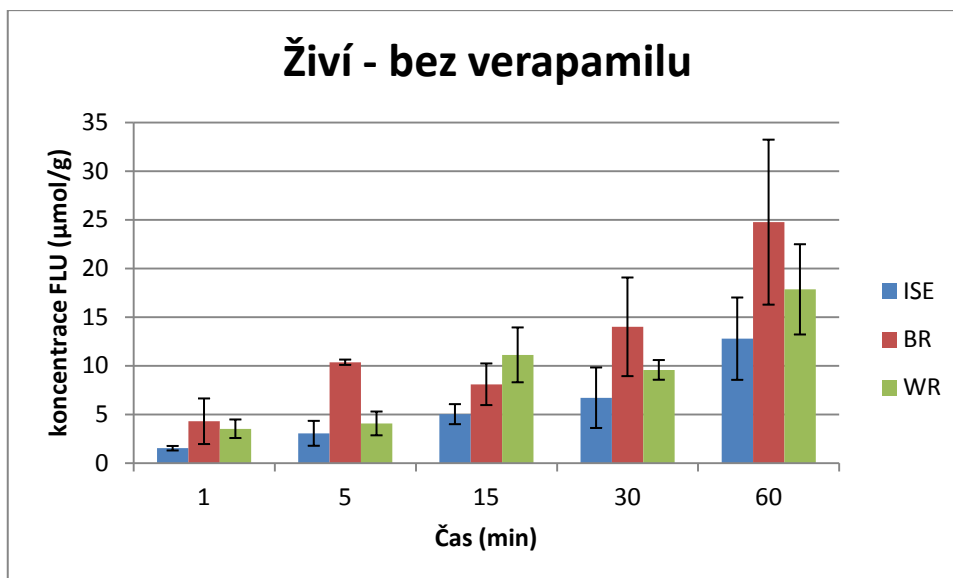


Obr. 18: Porovnání importu u živých a mrtvých *H. contortus* kmene BR

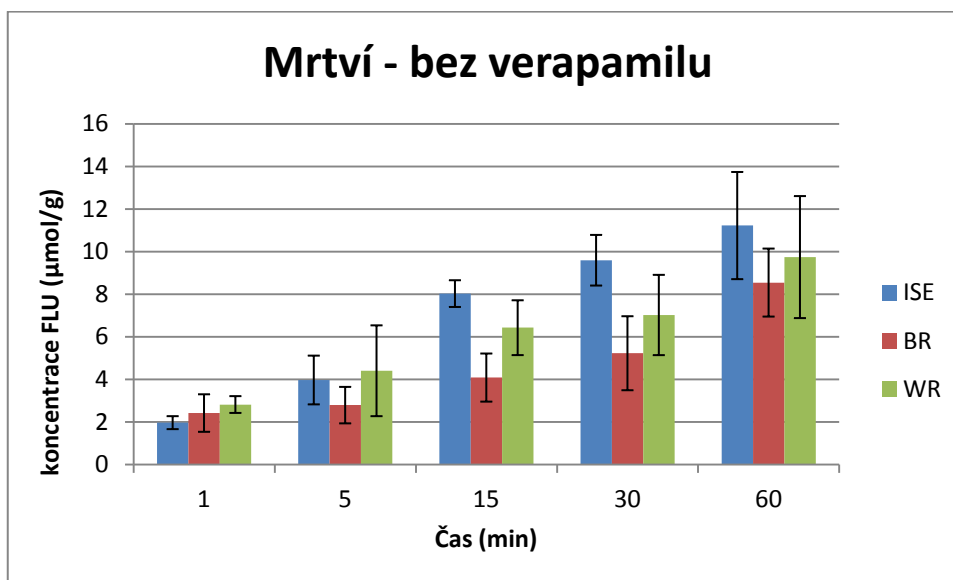


Obr. 19: Porovnání importu u živých a mrtvých *H. contortus* kmene WR

Kromě kmene ISE je u obou rezistentních kmenů větší koncentrace v živých červech než v mrtvých. U kmene ISE je v živých vyšší v čase 60 min, ale hodnoty jsou velmi podobné (rozdíly ovšem nejsou významné)



Obr. 20: Porovnání importu u živých jedinců všech tří kmenů



Obr. 21: Porovnání importu u mrtvých jedinců všech tří kmenů

Na těchto porovnáních můžeme vidět, že u živých vlasovek je koncentrace uvnitř vlasovky vyšší u kmenů rezistentních, zvláště pak u kmene BR, kdy kmen citlivý ISE má koncentrace nejnižší. Naproti tomu u mrtvých červů jsou koncentrace vyšší právě u citlivého kmene ISE a u kmene BR nejnižší.

### 5.3.2 Export flubendazolu z *H. contortus*

Export byl zkoumán tak, že červi byli nejprve inkubováni v médiu s 5µM flubendazolem a následně byli přemístěni do čistého média, které se následně odebíralo a zjišťovala se koncentrace vyloučeného flubendazolu (Kapitola 4.2.5). Hodnoty jsou vztaženy na litr média.

Tab. 10: Export FLU z *H. contortus*

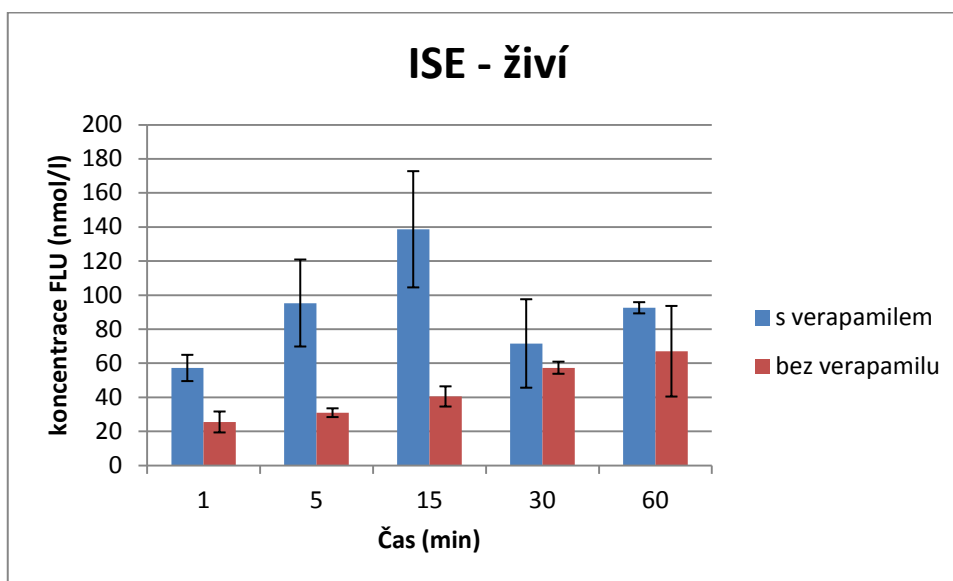
|     | živí                               |                                    | mrtví                              | Kmen |
|-----|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------|
|     | bez verapamilu                     | s verapamilem                      | bez verapamilu                     |      |
| čas | Koncentrace (nmol/l)<br>± odchylka | Koncentrace (nmol/l)<br>± odchylka | Koncentrace (nmol/l)<br>± odchylka |      |
| 1   | 25,4 ± 6,1                         | 57,2 ± 7,7                         | 31,6 ± 1,5                         | ISE  |
| 5   | 30,9 ± 2,6                         | 95,3 ± 25,5                        | 44,1 ± 7,8                         |      |
| 15  | 40,4 ± 5,9                         | 138,6 ± 34,1                       | 61,9 ± 17,1                        |      |
| 30  | 57,3 ± 3,6                         | 71,5 ± 26,0                        | 51,7 ± 3,4                         |      |
| 60  | 67,0 ± 26,6                        | 92,5 ± 3,3                         | 85,8 ± 6,7                         |      |
| 1   | 30,4 ± 5,9                         | 38,8 ± 6,2                         | 37,7 ± 7,0                         | BR   |
| 5   | 37,6 ± 10,8                        | 66,0 ± 8,0                         | 42,1 ± 11,5                        |      |
| 15  | 72,6 ± 17,1                        | 80,4 ± 8,2                         | 46,4 ± 4,7                         |      |
| 30  | 82,2 ± 19,9                        | 65,9 ± 5,3                         | 78,4 ± 18,9                        |      |
| 60  | 142,9 ± 44,7                       | 118,1 ± 16,9                       | 146,4 ± 44,4                       |      |
| 1   | 38,9 ± 10,1                        | 30,7 ± 4,8                         | 24,0 ± 3,7                         | WR   |
| 5   | 30,2 ± 8,1                         | 50,3 ± 6,4                         | 37,3 ± 12,0                        |      |
| 15  | 40,5 ± 11,9                        | 64,9 ± 20,5                        | 45,9 ± 6,2                         |      |
| 30  | 73,2 ± 22,0                        | 75,9 ± 30,1                        | 57,3 ± 4,4                         |      |
| 60  | 69,8 ± 8,8                         | 94,0 ± 30,1                        | 75,9 ± 6,9                         |      |

Hodnoty koncentrace exportovaného FLU jsou s časem rostoucí, kromě inkubace kmene ISE s přidáním verapamilu, kdy jsou hodnoty rostoucí do 15. minuty a v 30. minutě klesnou a v 60. opět stoupají, ačkoli ne až k hodnotám v 15. minutě. Propad v koncentracích je také vidět u živých vlasovek s přidáním verapamilu kmene BR v 30. minutě. U mrtvých vlasovek došlo k poklesu u kmene ISE v 30. minutě.

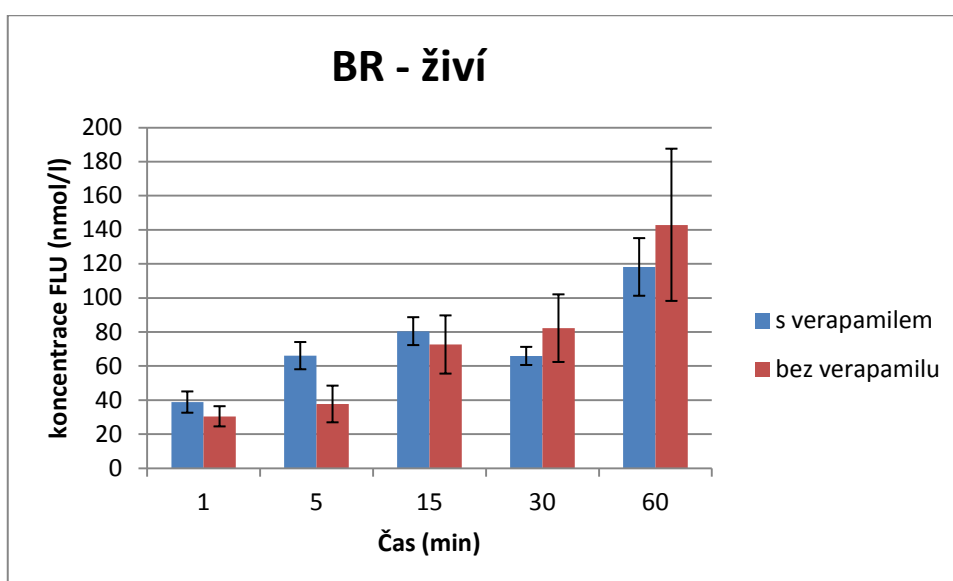
Z těchto hodnot byly opět vytvořeny grafy:



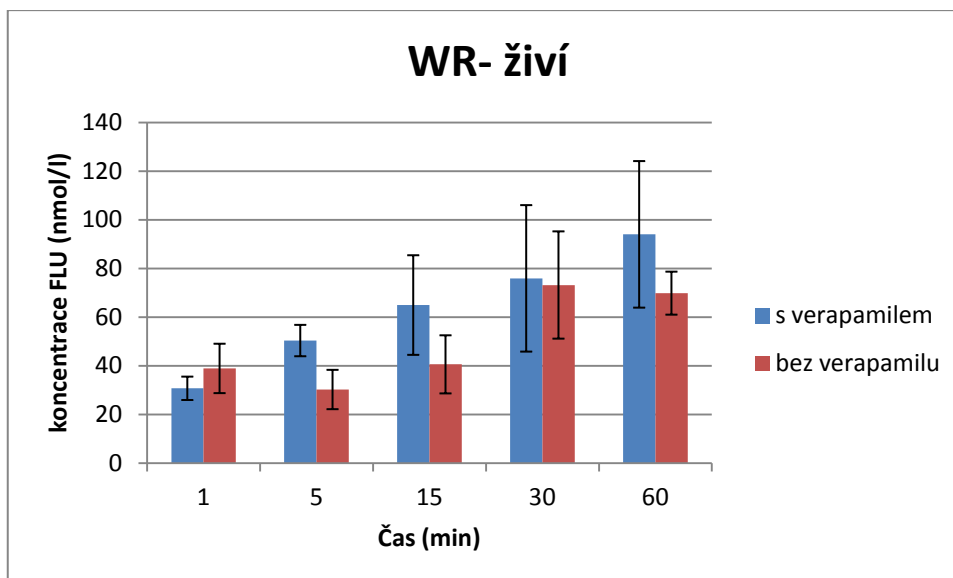
## Porovnání exportu FLU jednotlivých kmenů vzhledem k přidavku verapamilu do média



Obr. 22: Porovnání exportu FLU s verapamilem nebo bez u živých *H. contortus* kmene ISE



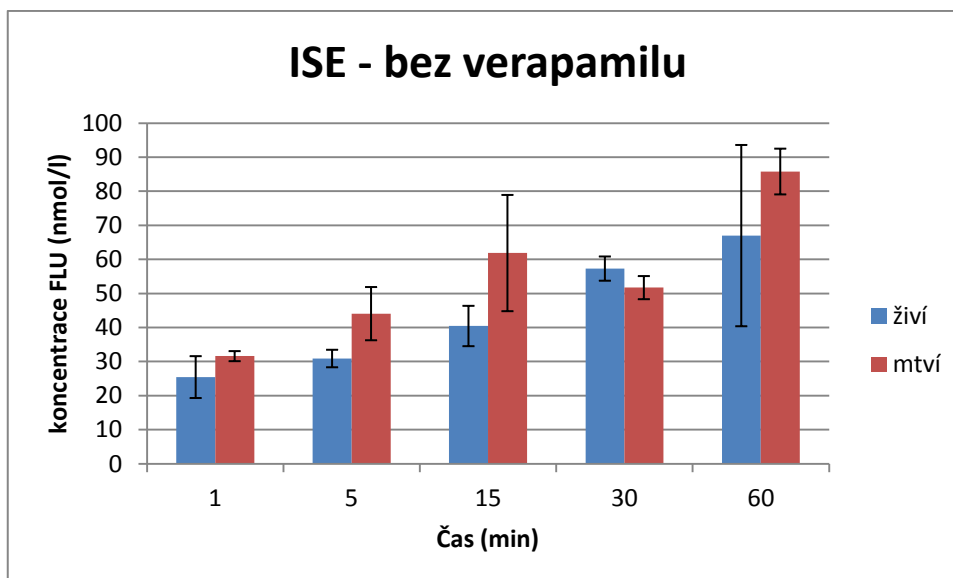
Obr. 23: Porovnání exportu FLU s verapamilem nebo bez u živých *H. contortus* kmene BR



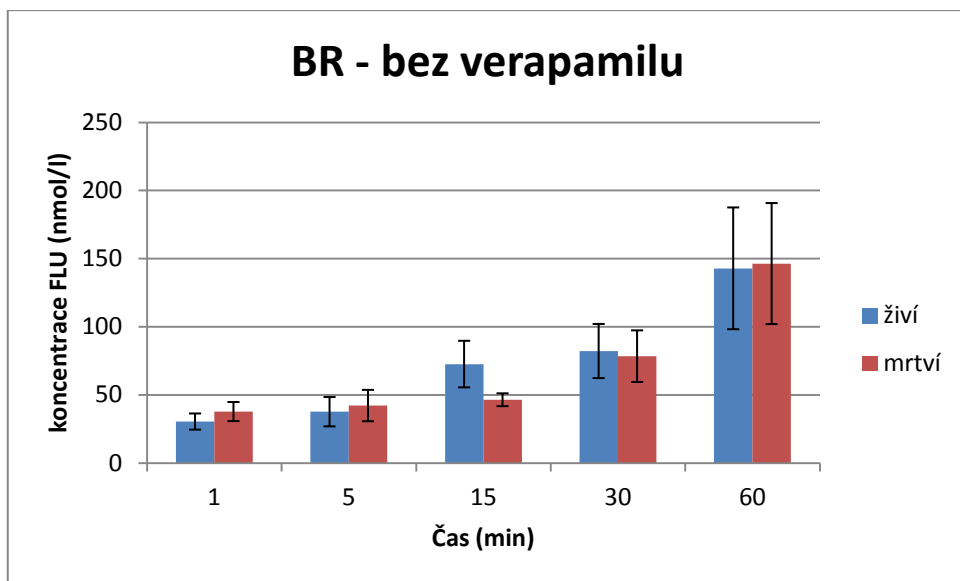
Obr. 24: Porovnání exportu FLU s verapamilem nebo bez u živých *H. contortus* kmene WR

U kmenů WR a BR se hodnoty s verapamilem a bez něho výrazněji neliší U kmene ISE je větší koncentrace u vlasovek s verapamilem a to především v časech 1, 5, a 15 minut. Ve 30. a 60. minutě je množství ve vlasovkách s verapamilem jen o málo vyšší než bez něho.

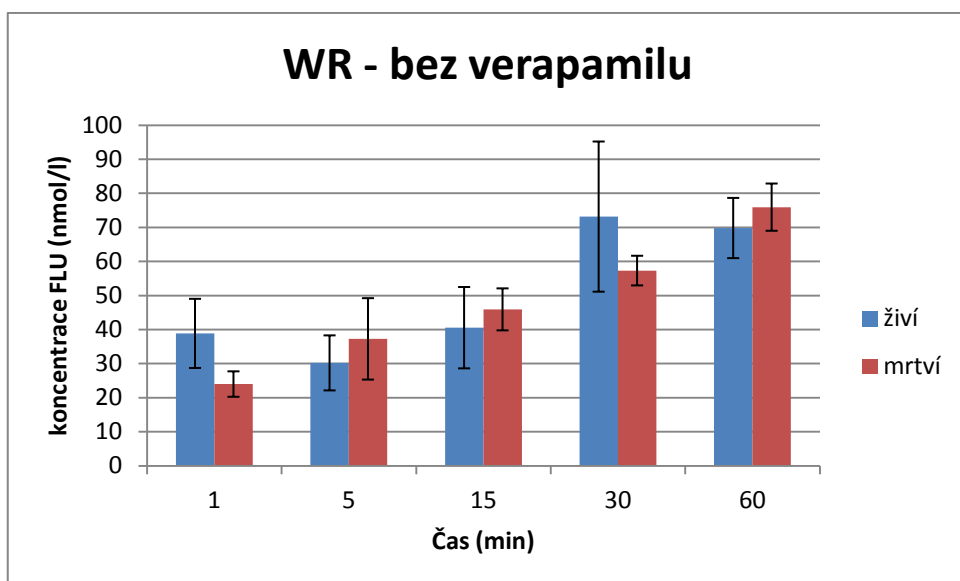
#### Porovnání importu u živých a mrtvých *H. contortus*



Obr. 25: Porovnání exportu FLU u živých nebo mrtvých jedinců *H. contortus* kmene ISE

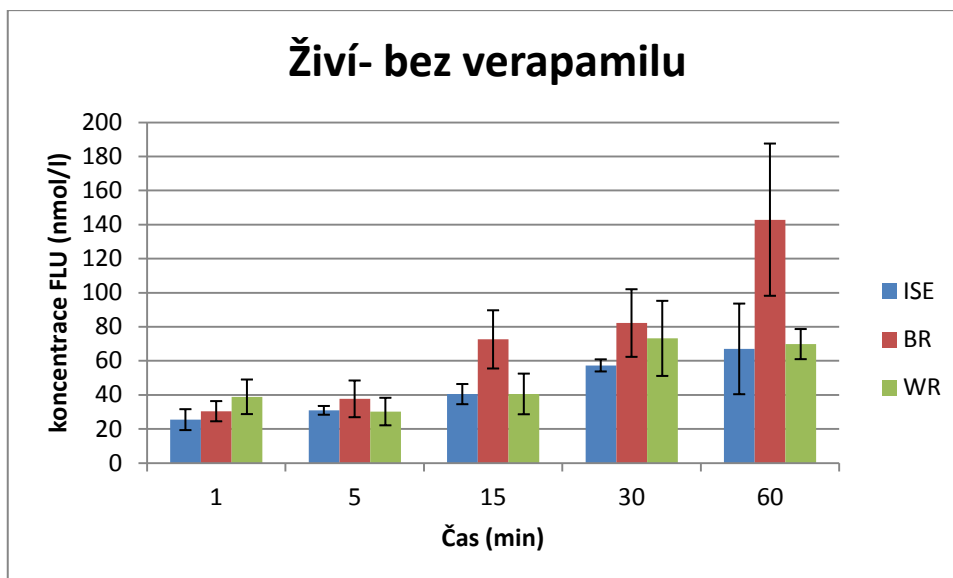


Obr. 26: Porovnání exportu FLU s verapamilem nebo bez u živých *H. contortus* kmene BR

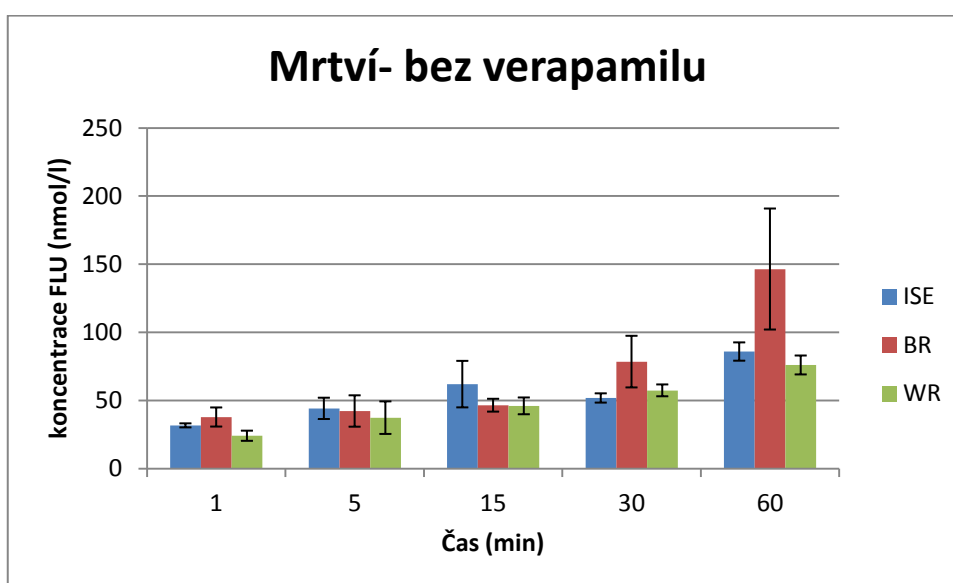


Obr. 27: Porovnání exportu FLU s verapamilem nebo bez u živých *H. contortus* kmene WR

Na předcházejících grafech je vidět, že většinou jsou množství vyloučeného FLU stejná, v některých případech (kmeny ISE a WR) dokonce je vyšší u mrtvých červů ale rozdíly nejsou statisticky významné.



Obr. 28: Porovnání exportu FLU u všech tří kmenů živých červů



Obr. 29: Porovnání exportu FLU u všech tří kmenů mrtvých červů

Z obou grafů je vidět, že hodnoty jsou velmi podobné jak u živých tak u mrtvých vlasovek a i navzájem se příliš neliší u jednotlivých kmenů. Jediné výrazně vyšší hodnoty jsou v 60. minutě u BR kmene ale ani ty nejsou statisticky významné.

#### **5.4 PCR (polymerázová řetězová reakce)**

Pomocí PCR se zjišťovalo, jestli je u kmenů přítomna rezistentní mutantní alela se záměnou na 200. bílkovině. Nejdříve byly využity reverzní primery PH4 pro citlivý a PH5 pro rezistentní alely. Potom byly využity takzvané mismatch primery PH4M a PH5M, u kterých je záměrně vytvořena chyba, což zvyšuje jejich selektivitu pro dané

místo na řetězci (Kapitola 4.2.6). Po provedení PCR byly získány výsledky v tab. 11 a tab. 12. Následně byla provedena gelová elektroforéza namnožené DNA.

### 5.4.1 PCR s primery PH4 a PH5

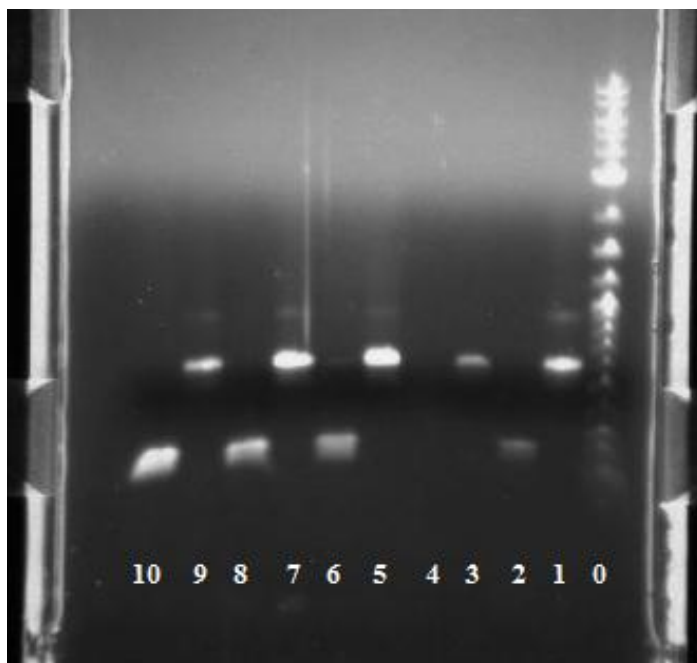
Tab. 11: Výsledky PCR s použitím primerů PH4 a PH5

| vzorek | C <sub>t</sub><br>citlivé | C <sub>t</sub><br>rezistentní |
|--------|---------------------------|-------------------------------|
| ISE 1  | 23,24                     | 31,48                         |
| ISE 2  | 24,98                     | 40,68                         |
| WR 1   | 29,29                     | 26,82                         |
| WR 3   | 31,89                     | 28,56                         |
| BR 2   | 38,42                     | 46,84                         |
| BR 3   | 28,23                     | 35,25                         |

C<sub>t</sub> označuje cyklus, kdy koncentrace produktu překročí určitou mez (treshold) – kdy začíná být množství produktu statisticky významné pro pokus.

Na těchto výsledcích je vidět, že velmi často docházelo k nasednutí primeru na oba typy alel a výsledek by se dal interpretovat jako přítomnost heterozygotů v takřka všech případech.

Vzorky ISE se dají vyhodnotit oba jako homozygotní citlivé alely, zatímco rezistentní i polyrezistentní jedinci, zde vykazují přítomnost obou alel a jsou tedy heterozygoty.



Obr. 30: Agarózový gel pod UV po provedení elektroforézy se vzorky z předchozí PCR. Dráha 0: žebříček, dráha 1: ISE1 citlivý primer, dráha 2: ISE1 rezistentní primer, dráha 3: ISE2 citlivý primer, dráha 4: ISE2 rezistentní primer, dráha 5: WR1 citlivý

primer, dráha 6: WR1 rezistentní primer, dráha 7: WR2 citlivý primer, dráha 8: WR2 rezistentní primer, dráha 9: BR3 citlivý primer, dráha 10: BR3 rezistentní primer. Začátek elektroforézy se nacházel nahoře. Citlivé alely mají velikost 0,6 kb a rezistentní 0,2 kb.

I z elektroforetického gelu je patrné, že ISE 2 je citlivý homozygot, u ISE 1 se jedná také spíše o homozygota, kdy rezistentní alely vznikly omylem. Rezistentní kmeny jsou všechny heterozygotní.

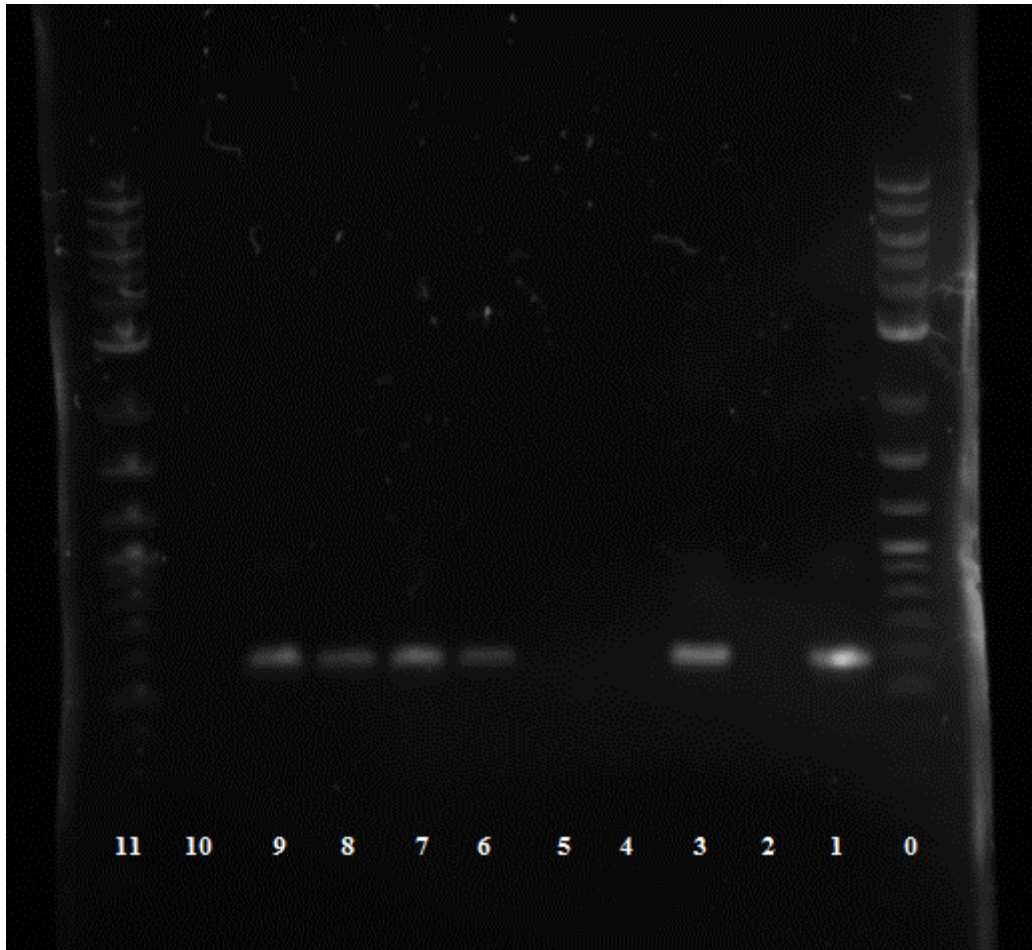
#### **5.4.1 PCR s primery PH4M a PH5M**

Tab. 12: Výsledky PCR s využitím mismatch primerů PH4M a PH5M

| vzorek | C <sub>t</sub><br>citlivé | C <sub>t</sub><br>rezistentní |
|--------|---------------------------|-------------------------------|
| ISE 4  | 32,95                     | 0                             |
| ISE 5  | 32,72                     | 0                             |
| BR 4   | 0                         | 40,97                         |
| BR 5   | 0                         | 0                             |
| BR 6   | 0                         | 0                             |
| WR 4   | 34,89                     | 39,17                         |
| WR 5   | 36,75                     | 0                             |

Z údajů je vidět, že nasednutí primeru na správné místo na vlákne, je zde mnohem specifitější, bohužel zde také došlo pravděpodobně k chybě v pipetování nebo přípravě DNA u vzorků BR 5 a BR 6 a není zde žádný produkt.

Vzorky kmenu ISE jsou citliví homozygoti, zatímco vzorek BR je homozygotem rezistentním. U kmene WR jeden ze vzorků (WR 4) je heterozygot, zatímco WR 5 je citlivým homozygotem.



Obr. 31: Agarózový gel s mismatch primery. Všechny produkty zde mají délku 0,6 kb  
 Dráha 0: žebříček, dráha 1: ISE4 citlivý primer, dráha 2: ISE4 rezistentní primer,  
 dráha 3: ISE5 citlivý primer, dráha 4: ISE5 rezistentní primer, dráha 5: BR4 citlivý  
 primer, dráha 6: BR4 rezistentní primer, dráha 7: WR4 citlivý primer, dráha 8: WR4  
 rezistentní primer, dráha 9: WR5 citlivý primer, dráha 10: WR5 rezistentní primer,  
 dráha 11: žebříček. Začátek elektroforézy se nacházel nahoře.

Výsledky elektroforézy potvrzují spektrofotometrická měření z přístroje (qPCR iQ5 Bio-Rad), kdy oba zástupci kmene ISE jsou citliví homozygoti, zástupce BR kmene je rezistentním homozygotem a WR4 je heterozygotem. Vzorek WR5 se i zde jeví citlivým homozygotem.

## 6. DISKUZE

Vlivem parazita vlasovky slézové vzniká onemocnění přežvýkavců nazývaní se haemonchóza. Projevuje se především anémií a může být pro napadené zvíře i smrtelné. Je celosvětově rozšířená a napadá jak volně žijící zvířata, tak i druhy hospodářské, kde působí značné ztráty především u chovu malých přežvýkavců, jako jsou kozy nebo ovce (Angulo-Cubillán et al. 2007).

Proti haemochóze se používají širokospektrá anthelmintika založená na několika principech hubení parazitů. Nejčastěji jde o benzimidazolové deriváty a dále pak o makrocyclické laktony nebo levamisol. Mimo farmakoterapie se využívají i další opatření, která mají snížit počet nakažených zvířat a předcházet rezistenci vlasovek na léčiva. (Getachew et al. 2007)

Právě rezistence na mnohá anthelmintika je dnes u vlasovek stále vážnějším problémem. Existuje několik mechanismů jejich vzniku a často dochází i k jejich kombinacím a vznikům multirezistentních kmenů. U benzimidazolů (BZ) je rezistence většinou způsobená mutací ve 200. kodonu genu pro  $\beta$ -tubulin, který je cílovou strukturou pro BZ. Podobně u rezistence na ivermektin dochází ke změně glutamátém řízeného chloridového kanálu. Další možností ochrany parazita je zvýšené odbourávání léčiva, čímž nedochází k nahromadění dostatečné dávky léčiva. Biotransformace je rozdělena na fázi, kdy dochází k úpravám molekuly, aby se zvýšila její hydrofilita a na fázi konjugace s endogenní sloučeninou, která usnadní vyloučení léčiva. Dalším důležitým mechanismem je eliminace látek z buněk parazita, takže opět nevzniká dostatečná koncentrace léčiva.

Cílem této práce bylo právě studium biotransformace BZ léčiva flubendazolu a jeho transport u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) a zjišťování rezistentních alel u těchto kmenů. Práce zahrnuje tři kmeny *H. contortus*. Kmen ISE je citlivý na BZ, kmen BR je rezistentní na BZ a kmen WR je polyrezistentní, mimo jiné je rezistentní na BZ a ivermektin.

Byla sledována kinetika a specifická aktivita přeměny flubendazolu (FLU) *in vitro*. Biotransformace FLU u vlasovky probíhá pouze redukcí karbonylové skupiny. Reduktázy katalyzující tuto přeměnu byly identifikovány pouze v cytosolické frakci, takže se v práci pracovalo pouze s ní. Jako koenzym využívá tato reakce pouze NADPH



(Cvilink et al. 2008). U cytosolické frakce všech tří kmenů bylo třeba stanovit koncentraci bílkoviny pomocí metody BSA, aby bylo možné stanovit specifické aktivity enzymů.

Kinetika a aktivita byly sledovány při inkubaci cytosolu všech tří kmenů s koncentracemi FLU 0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. V nejnižší koncentraci 0,5  $\mu$ M byla aktivita reduktáz neměřitelná, kromě vzorku kmene ISE. Nejvyšší specifickou aktivitu vykazuje citlivý kmen ISE. Rezistentní kmeny BR a WR mají aktivitu mnohem nižší. Kmen WR má při nižších koncentracích nižší specifickou aktivitu, ale se vzrůstající koncentrací roste i aktivita reduktáz.

Z porovnání kinetických parametrů je vidět, že nejvyšší maximální rychlosti dosahuje právě kmen ISE. Ale nejvyšší afinitu enzymu k substrátu, tedy nejnižší  $K_m$ , má kmen BR, ale zároveň má i nejnižší maximální rychlost, takže enzym velmi rychle dosahuje této maximální rychlosti, ale ve výsledku zmetabolizuje méně léčiva. Vysoká maximální rychlost u citlivého kmene může znamenat, že pro tento kmen se jedná o jedinou možnost obrany před BZ, takže zde dochází ke zvýšení exprese genů pro reduktázy, což by ovšem naznačovalo, že již došlo ke kontaktu s léčivem. Na kmene BR je vidět, že postupem času dochází k selekci reduktáz s nejvyšší afinitou ale celkové množství enzymu není tak vysoké. U rezistence na ivermektin dochází také k selekci určitých alel P-glykoproteinu (James et al. 2007). Snížení množství je možné, že díky ochraně pomocí mutace ve 200. aminokyselině postupně sníží expresi některých obraných enzymů. Křivka kinetiky biotransformace FLU u kmene WR je sigmoidální, takže vázání substrátu (FLU) na enzym je ovlivněno další molekulou, která zde účinkuje jako efektor ( $h > 1$ ). Tímto efektozem by mohly být další molekuly FLU, kdy při vyšší koncentraci dochází k saturaci jak efektorových míst, tak i aktivních center. U kmene WR se dá předpokládat, že jeho enzymatická výbava je upravená na větší množství substrátů, takže bude nižší substrátová specifita ale i nižší afinita substrátu k enzymu. Z koncentrace bílkovin v cytosolu (Tab. 5) je patrné, že množství bílkovin (enzymů) je zde takřka dvojnásobné oproti zbývajícím kmenům. Toto množství bílkoviny ovlivňuje i výpočet specifické aktivity, kdy se u tohoto kmene dá předpokládat větší paleta biotransformačních enzymů, ale reduktázy budou zřejmě tvořit pouze malou část.

Zvýšený transport xenobiotik z buňky je významným faktorem rezistence na mnohá léčiva. Velmi často může být příčinou vzniku kmenů rezistentních na více typů léčiv. Velkou roli při transportu xenobiotik hrají ABC proteiny, z nichž pro rezistence je jedním z nejdůležitějších P-glykoprotein. P-glykoprotein je transportérem, který obstarává eflux léčiv jako je například ivermektin ven z buněk parazita. Může být inhibován různými léčivy například verapamilem. Například u některých motolic rodu *Fasciola* není vázána rezistence na triklabendazol na změnu v genomu ale předpokládá se, že je zprostředkována transportem a odbouráváním (Wolstenholme et al. 2004).

Druhá část této práce se věnuje právě transportu flubendazolu *ex vivo* u *H. contortus*. Inkubací vlasovek s médiem s FLU se zjišťoval import FLU do těla vlasovek. Některé vlasovky měly v médiu navíc verapamil jako inhibitor P-glykoproteinu.

Při srovnání importu u vlasovek s verapamilem a bez verapamilu se dá zjistit, že inhibice P-glykoproteinu se na výsledcích takřka nepodílí. Z průběhu v čase je vidět, že v 15. minutě je u rezistentních kmenů koncentrace nižší než v minutě 5. Je zde vidět, že tyto kmeny jsou zřejmě lépe vybaveny pro export xenobiotik než citlivý kmen ISE. Zvýšení exprese a selekce některých alel pro P-glykoprotein se odhaduje za alespoň částečný mechanismus rezistence na ivermektin (James et al. 2007, Wolstenholme et al. 2004).

Na případech rozdílů mezi živými a mrtvými vlasovkami kmene ISE je možné pozorovat, že transkutikulární cesta je přinejmenším pro flubendazol velmi důležitá. Tento systém dává léčivům výhodu, protože snižuje nutnost rozpuštění a absorpce hostitelem, aby došlo k účinku na parazita. Dle Alvareze et al. (2007) zde je výhoda pro lipofilní částice jako je například albendazol nebo fenbendazol, ale úplný prostup do těla vlasovek může být problematický díky bazicitě BZ a jejich ionizaci v některých vrstvách kutikuly. Na rozdílech mezi živými a mrtvými vlasovkami rezistentních kmenů se dá pozorovat zvýšení v případě živých vlasovek. V porovnání s výsledky v rozdílech u vlasovek s použitím verapamilu by mohlo naznačovat, že FLU je do parazita importován i aktivním importem. Tento aktivní transport je pravděpodobně indukován, protože v porovnání jednotlivých kmenů jsou zde vyšší hodnoty u kmenů WR a BR než u kmene ISE, který má vyšší hodnoty pouze u mrtvých parazitů.

Export FLU z těl vlasovek se zjišťoval inkubací vlasovky, která byla předtím v médiu s FLU, v čistém médiu a sledovalo se kolik FLU vyloučí za určitý čas. Opět v některých případech byl použit verapamil jako inhibitor P-glykoproteinu. Hodnoty exportu u vlasovek inkubovaných s verapamilem nebo bez něho jsou ve stejných časech takřka stejné, z čehož se dá vyvodit, že P-glykoprotein, který je verapamilem inhibován, nebude mít na exkreci FLU výraznější vliv. Z pokusů na živých a mrtvých vlasovkách jsou hodnoty FLU v médiu také velmi podobné v daných časech, takže můžeme předpokládat, že vliv transportérů na export bude u FLU zanedbatelný a FLU z jejich těla uniká především po koncentračním gradientu. V případě porovnání kmenů by se na základě dřívějších výzkumů (Wolstenholme 2004, James et al. 2007, Jones a George 2005) dalo očekávat, že by export mohl být zvýšen u kmene WR, který je rezistentní na více skupin látek mimo jiné i na ivermektin, u kterého byla zjištěna zvýšená aktivita P-glykoproteinu. Tímto se jen potvrzuje, že P-glykoprotein nemá vliv na transport FLU u *H. contortus*.

Třetí část této práce se zabývá zjišťováním přítomnosti mutace v genu pro  $\beta$ -tubulin, což je prozatím hlavní mechanismus rezistence na BZ. Byla zjišťována u mutace na 200. kodonu pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) na DNA izolované z kmenů ISE, BR a WR. Byly využity různé sady primerů a různé podmínky pro PCR. Nejlepšími primery se ukázaly mismatch primery, které mají záměrně ještě další chybu v řetězci, čímž se váží více selektivně. Při použití primerů bez chyb docházelo i k nasednutí jak na místo s mutací tak i bez ní. V případě kmene ISE se jednalo vždy o homozygoty s citlivou alelou, takže se zdá, že rezistence zprostředkovaná mutací je přítomna již od jedné alely a bude tedy dominantní. U rezistentních vlasovek byla rezistentní alela vždy přítomna, kromě zástupce WR5, který se zdál citlivým homozygotem, ale tento výsledek značí spíše chybu v přípravě vzorku a jednalo by se tak o heterozygota. Dle Wolstenholma et al. (2004) je u *H. contortus* rezistence podmíněna právě mutací na místě 200 na rozdíl například od *Teladorsagia circumcincta*, kdy je rozhodující mutace v místě 167. U *Caenorhabditis elegans* je zase velké rozpětí v mutacích pro místo 200 a u části rezistentů chybí úplně (James et al. 2007). Že by došlo k vymizení mutace je také velmi nepravděpodobné, protože dle Jacksona a Coopa (2000) by se sice mohla ztratit, kdyby bylo v populaci dostatečné množství heterozygotů, ale při pokusu, kdy ovce byly léčeny jinými

anthelmintiky po několik let, došlo k jejímu návratu okamžitě po opětovném uvedení BZ do léčby.

## 7. ZÁVĚR

Rezistence na anthelmintika, zvláště pak na benzimidazolová, je v dnešní době velkým problémem při chovu přežvýkavců. Vzhledem k omezeným možnostem prevence a léčby bez jejich využití je studium mechanismů rezistence velmi důležité.

V práci byly využity tři kmeny vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*). Kmen citlivý na léčbu ISE, kmen rezistentní vůči benzimidazolovým léčivům BR a kmen WR, který disponuje rezistencí na více skupin léčiv včetně benzimidazolů. Jako modelové léčivo byl použit benzimidazolový derivát flubendazol.

Při inkubaci flubendazolu s cytosolem tří kmenů *in vitro* bylo zjištěno, že citlivý kmen ISE v určeném čase zredukoval nejvíce flubendazolu. U rezistentních kmenů došlo k různé úpravě enzymů, u kmene BR byla zjištěna vysoká afinita flubendazolu k enzymu ale nízká rychlost a u kmene WR byl zjištěn odlišný způsob redukce než u dalších dvou kmenů.

Při testování transportu flubendazolu u *H. contortus* se zjistilo, že do těla parazita proniká flubendazol pasivní difuzí. Dále se zjistilo, že na export flubendazolu z parazita nemá vliv P-glykoprotein a pravděpodobně ani žádné další transportéry.

Pomocí PCR bylo zjištěno, že u citlivého kmene se vyskytují pouze homozygotní jedinci s citlivými alelami. U kmenů rezistentních byli nalezeni jak rezistentní homozygoti, tak heterozygoti, čímž se potvrdil předpoklad nutnosti mutace v e 200. aminokyselině u rezistentních kmenů.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|       |   |
|-------|---|
| ABC   | typ transportních proteinů závislých na navázání ATP  |
| ATP   | adenosintrifosfát                                     |
| BCA   | kyselina bicinchoninová                               |
| BR    | kmen rezistentní na bezimidazolová anthelmintika      |
| BSA   | hovězí sérový albumin                                 |
| BZ    | benzimidazolová anthelmintika                         |
| DMSO  | dimethylsulfoxid                                      |
| DNA   | deoxyribonukleová kyselina                            |
| EDTA  | kyselina etylendiamintetraoctová                      |
| FECRT | test redukce počtu vajíček v trusu                    |
| FLU   | flubendazol   |
| GABA  | kyselina gama-aminomáselná                            |
| GTP   | guanosintrifosfát                                     |
| ISE   | kmen citlivý na anthelmintika                         |
| HPLC  | vysokoučinná kapalinová chromatografie                |
| NADPH | redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát         |
| PCR   | polymerázová řetězová reakce                          |
| TRIS  | tris(hydroxymethyl)aminomethan                        |
| WR    | kmen rezistentní na běžná anthelmintika (White-River) |

# ZDROJE

## Literatura

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005):  
Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing

Alvarez I. L., Mottier M. L., Lanusse C. E. (2007): Drug transfer into target helminth  
parasites. Trends in Parasitology, vol. 23, No. 3, 98-104

Angulo-Cubillán F. J., García-Coiradas L., Cuquerella M., de la Fuente C., Alunda J.  
M. (2007): *Haemonchus contortus*-Sheep Relationship: a review. FCV-LU, Vol XVII,  
No. 6, 577-587

Bártíková H., Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Skálová L., Szotáková B. (2009):  
Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in heathy sheep and  
sheep with haemochosis. J. vet. Pharmacol. Therap. 33, 56-62

Beech R. N., Prichard R. K., Scott M. E. (1994): Genetic variability of the  $\beta$ -tubulin  
genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*.  
Genetics 138, September, 103-110

Chien A., Edgar D. B., Trela J. M. (1976): Deoxyribonucleic acid polymerase from the  
extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of bacteriology, Sept., 1550-1557

Cvilink V., Lamka J., Skálová L. (2009): Xenobiotic metabolizing enzymes and  
metabolism of anthelmintics in helminths. Drug Metabolism Reviews,; 41(1): 8-26

Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M.,  
Kuběnová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L. (2008): Biotransformation of  
flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. Veterinary  
Parasitology 151, 242-248

Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G.,  
Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. (2006): The detection of anthelmintic  
resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology 136, 167-185

Crompton D. W. T., Newton B. A. (1982): Trends and Perspectives in Parasitology 2, volume 2, Cambridge University Press

Český lékopis (2009): Grada publishing, Praha,

Dubey A. K., Sanyal P. K. (2010): Benzimidazoles in a Wormy World. **VetScan**, Vol. 5, No. 2, Article 63

Getachew T., Dorciesz P., Jacquet P. (2007): Trends and challenges in effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review, Parasite, 14, 3-14

Gill J. H., Redwin J. M., van Wyk J. A., Lacey E. (1995): Ivermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*- Effects of ivermectin resistance. International journal for Parasitology, Vol. 25, No.4, 463-470

Jackson F., Coop R. L. (2000): The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Parasitology, 120, 95-107

James C. E., Hudson A. L., Davey M. W. (2007): Drug mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. Trends in Parasitology, vol. 25, No.7, 328-335

Jones P. M., George A. M. (2005): Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. International Journal for Parasitology, 35, 555-566

Jasmer D.P., Yao C., Rehman A., Johnson S. (2000): Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. Mol. Biochem. Parasitol., Jan 5, 105(1), 81-90.

Klimeš J. a kolektiv (2008): Kontrola léčiv I. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum

Lamka J., Ducháček L. (2006): Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum

Martin R. J. (1997): Modes of action of anthelmintic drugs. The veterinary Journal, 154, 11-34



Nobilis M., Vybíralová Z., Krízová V., Kubíček V., Soukupová M., Lamka J., Szotáková B., Skálová L. (2008): Sensitive chiral high-performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its phase I metabolites in blood plasma using UV photodiode-array and fluorescence detection. Application to pharmacokinetic studies in sheep. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* Dec 1, 876(1), Epub, Nov 1, 89-96

Rahman W. A., Hamib S. A. (2007): Morphological characterization of *Haemonchus contortus* in goats (*Capra hircus*) and sheep (*Ovis aries*) in Penang, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 24(1), 23–27

Roos M. H., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra J. G., Lenstra J. A. (2004): Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*, Jan, 34(1), 109-15.

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

Sood M. L., Kalra S. (1977): Histochemical studies on the body wall of nematodes: *Haemonchus contortus* (Rud., 1803) and *Xiphinema insigne* Loos, 1949. *Z Parasitenkd.* Apr, 15, 51(3), 265-73

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. *Vet. Res.* 33, 509–529

van Wyk J. A., Malan F. S., Gerber H. M., Alves R. M. (1987): Two field strains of *Haemonchus contortus* resistant to rafoxanide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* Jun, 54(2), 143-146.

van Wyk J. A., Gerber H. M., Groeneveld H. T. (1980): A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. *Onderstepoort J. Vet. Res. Sep.*; 47(3), 147-58

von Samson-Himmelstjerna G., Walsh T. K., Donnan A. A., Carrière S., Jackson F., Skjuce P. J., Rohn K., Wolstenholme A. (2009): Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology*, 136, 349-358.

Wells A. (1999): Integrated parasite management for livestock, ATTRA,

Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N.C. (2004): Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, Vol.20, No.10, October, 469-476

### **Internetové zdroje**

Haemonchus Parasite. Buckeye veterinary service. [online] poslední změna 2012 [cit 2012-5-2]. Dostupné z: <http://www.buckeyevet.org/Haemonchus.html>

Ramel G., The Nematodes (Phylum Nematoda). [online]. poslední změna 2010. [cit 2012-3-5] Dostupné z: <http://www.earthlife.net/inverts/nematoda.html>

Sendow J. (2003): ADW: *Haemonchus contortus*: INFORMATION. [online]. Animal Diversity Web. [cit 2012-3-5] Dostupné z: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Haemonchus\\_contortus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Haemonchus_contortus.html)