

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

VLIV MONEPANTELU NA EXPRESI
BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ OVCE

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.

Hradec Králové 2015

Tereza Štolcová

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

Tereza Štolcová

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. RNDr. Lence Skálové Ph.D., Mgr. Lucii Stuchlíkové a Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a pomoc při jejím vypracování. Především děkuji za velmi vstřícný a ochotný přístup a trpělivost po celou dobu tvorby mé práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Tereza Štolcová

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.

Název práce: Vliv monepantelu na expresi biotransformačních enzymů ovce

Monepantel (MOP) představuje nové anthelmintikum ze skupiny amino-acetonitrilových derivátů, s odlišným mechanismem účinku oproti klasickým širokospektrým anthelmintikům. Používá se na léčbu a kontrolu gastrointestinálních nematodóz u ovcí a skotu. Tato práce se zaměřuje na vliv MOP na expresi vybraných cytochromů P450 (CYP) u ovcí *in vivo* a *in vitro*. K *in vivo* experimentům byla použita játra ovcí, kterým byl podán MOP v doporučené terapeutické dávce. Kontrolní skupině zvířat nebylo léčivo podáno. Při *in vitro* pokusech byly pozorovány změny v expresi mRNA vybraných CYP po 24 hodinové inkubaci primárních kultur ovčích hepatocytů s 10 μ M MOP. Ke stanovení transkripčních hladin mRNA byla využita metoda qPCR (kvantitativní PCR v reálném čase). Výsledky *in vivo* i *in vitro* experimentů svědčí o výrazném nárůstu v expresi isoformy CYP3A24. Indukční efekt monepantelu byl dokonce vyšší, než indukční efekt známého CYP3A induktoru rifampicinu. Indukce enzymů CYP3A může mít vážné farmakologické anebo toxikologické důsledky. Při současném (případně následném) podání jiných léčiv s MOP ovcím by na toto měl být brán ohled.

ABSTRACT

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

Candidate: Tereza Štolcová

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of monepantel on expression of biotransformation enzymes in sheep

Monepantel (MOP) represents a new anthelmintic drug from the amino-acetonitrile derivatives group with the different mode of action in comparison with commonly used broad-spectrum drugs. It is used for the treatment and control of gastrointestinal nematode infection in sheep and cattle. This study focuses on the effect of MOP on expression of selected cytochromes P450 (CYP) in sheep *in vivo* and *in vitro*. The sheep treated with the recommended therapeutic dose of MOP was used for the *in vivo* experiment. Non-treated animals represented the control group. Changes of mRNA expression of selected CYPs in primary cultures of ovine hepatocytes were observed after 24 h incubation with MOP (10 μ M) in the *in vitro* experiment. The qPCR method (real time quantitative PCR) was used for the quantification of transcription levels of mRNA. Both *in vivo* as well as *in vitro* results showed a significant up-regulation in CYP3A24 expression. The induction effect of MOP was even stronger than induction effect of well-known CYP3A inducer rifampicin. Induction effect of CYP3A enzymes may have serious pharmacological and/or toxicological consequences. These facts should be taken into account when other drugs together with or after MOP are administered to sheep.

OBSAH

1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Anthelmintika	9
2.1.1 Makrocyclické laktony	9
2.1.2 Benzimidazoly	10
2.1.3 Imidazothiazoly	10
2.1.4 Amino-acetonitrilové deriváty (AAD) - Monepantel	11
2.1.5 Rezistence na anthelmintika	14
2.1.6 Další možnosti terapie helmitóz	15
2.2 Cytochromy P450	18
2.2.1 Klasifikace	18
2.2.2 Indukce enzymů a její důsledky	20
2.3 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	22
2.3.1 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	23
3 Cíl práce	28
4 Experimentální část	29
4.1 Chemikálie a reagenty, přístroje a biologický materiál	29
4.1.1 Chemikálie a reagenty	29
4.1.2 Přístrojové vybavení	30
4.1.3 Biologický materiál	30
4.2 Pracovní postupy	31
4.2.1 Příprava pracovních roztoků	31
4.2.2 Příprava monepantelu	33
4.2.3 Izolace a inkubace hepatocytů	33
4.2.4 Izolace RNA TRI Reagentem	34
4.2.5 Odstranění DNA	35
4.2.6 Reversní transkripce	35
4.2.7 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	36
4.2.8 Agarosová elektroforesa	38
4.2.9 Statistická analýza	38

5 Výsledky	39
5.1 Koncentrace RNA	39
5.2 Návrh primerů	41
5.3 Ověření funkčnosti primerů	43
5.4 Ověření účinnosti primerů	44
5.5 Transkripční hladiny mRNA testovaných cytochromů	45
5.6 Vliv monepantelu na expresi CYP in vivo	48
5.7 Vliv monepantelu na expresi CYP in vitro	50
6 Diskuze	53
7 Závěr	56
8 Seznam použitých zkratk	57
9 Zdroje	58

1 ÚVOD

Choroby způsobené helminty představují výrazný problém nejen humánní, ale především veterinární medicíny. V důsledku poklesu produktivity hospodářských zvířat vlivem nákazy gastrointestinálními hlísticemi dochází k celosvětovým ekonomickým ztrátám. K předcházení a léčbě těchto infekcí byla do nedávna používána téměř výhradně širokospektrá anthelmintika ze skupin benzimidazolů, imidazothiazolů a makrocyclických laktonů. Rozsáhlé používání těchto léčiv však vedlo k rozvoji anthelmintické rezistence u nematod a podnítilo i vývoj multirezistentních kmenů (McKellar a Jackson 2004, Ducray *et al.* 2008, Epe a Kaminsky 2013).

Všeobecný rozvoj rezistence byl podnětem k hledání nových anthelmintik s odlišným mechanismem účinku, působících i na rezistentní kmeny. Tyto požadavky splňoval monepantel, nové anthelmintikum ze skupiny amino-acetonitrilových derivátů, které se vyznačuje dobrou snášenlivostí a nízkou toxicitou u savců (Kaminsky *et al.* 2008b).

Indukce biotransformačních enzymů může významně ovlivnit metabolismus nejen samotného induktoru, ale rovněž dalších léčiv podávaných zároveň s induktorem, či následně po něm a být tak příčinou lékových interakcí. To může v různé míře vést k selhání terapie a v některých případech i k intoxikaci organismu (Graham a Lake 2008). Tyto poznatky podtrhují důležitost monitorování indukčního potenciálu léčiv na biotransformační enzymy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anthelmintika

Jako anthelmintika označujeme léčiva používaná na léčbu a prevenci helmintóz, chorob způsobených dospělými helminty (parazitickými červy) nebo jejich infekčními vývojovými stádii. Jedná se převážně o syntetická, méně pak biosyntetická léčiva. Helmintózy bývají způsobeny nejčastěji červy ze tříd *Nematoda* (hlístice), *Trematoda* (motolice) a *Cestoda* (tasemnice). Podle účinnosti na jednotlivé taxonomické skupiny obvykle dělíme anthelmintika na antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Avšak velká část léčiv účinkuje zároveň proti více třídám helmintů a rovněž mohou působit i proti ektoparazitům (Lamka a Ducháček 2006).

Hlístice napadají většinu hospodářských i domácích zvířat. Proto bude dále věnována pozornost nematodózám jakožto nejrozsáhlejší skupině helmintóz. V současnosti mezi nejpoužívanější anthelmintika řadíme léčiva ze skupin makrocyclických laktonů, benzimidazolů a imidazothiazolů. V poslední době se na trhu objevují i nová léčiva odlišných struktur a mechanismu účinku, mezi něž patří mimo jiné i námi studovaný monepantel.

2.1.1 Makrocyclické laktony

Zástupci této skupiny léčiv bývají děleni na avermektiny a milbemyciny. Jedná se o biosyntetické látky používané k léčbě nematodóz, mimo to vykazují také antiectoparazitární účinnost (Lamka a Ducháček 2006).

Mechanismus účinku makrocyclických laktonů je založen na ovlivňování chloridových kanálů prostřednictvím receptorů pro glutamát. Výsledkem vazby na tyto receptory je zvýšená prostupnost chloridových kanálů, hyperpolarizace membrány a inhibice neurotransmise, což má za následek paralýzu a smrt parazita. Působení ovlivněním nervového přenosu zprostředkovaného γ -aminomáselnou kyselinou (GABA), které bylo dříve považováno za hlavní mechanismus účinku, se jeví jako druhotné (McKellar a Jackson 2004).

Nejvýznamnějším léčivem této skupiny stále zůstává historicky první ivermektin. Jedná se o polosyntetický derivát odvozený od fermentačních produktů

bakterie *Streptomyces avermitilis* (Holden-Dye a Walker 2014). Účinkuje proti dospělým i proti vývojovým stádiím hlístic a členovců. Podání je možné jak enterální, tak parenterální cestou, přičemž jednotlivá terapeutická dávka se pohybuje v rozmezí 0,2-0,3 mg/kg živé hmotnosti (Lamka a Ducháček 2006).

2.1.2 Benzimidazoly

Benzimidazoly tvoří velmi rozsáhlou skupinu širokospektrých anthelmintik. Jsou používána již od roku 1961, kdy byl objeven první zástupce thiabendazol, který je v současné době využívaný pouze jako antimykotikum (Holden-Dye a Walker 2014). Uplatňují se v léčbě nematodóz, trematodóz i cestodóz, výjimečně vykazují rovněž antimykotickou aktivitu (Lamka a Ducháček 2006).

Anthelmintická účinnost benzimidazolů je založena na inhibici tvorby mikrotubulů prostřednictvím vazby na β -tubulin. To má za následek narušení buněčného transportu, energetického metabolismu a celkové funkčnosti buňky parazita (McKellar a Jackson 2004). Díky mnohonásobně vyšší afinitě k parazitárnímu β -tubulinu oproti β -tubulinu zvířat vykazují benzimidazoly nízkou toxicitu pro léčená zvířata (Lamka a Ducháček 2006).

Délka přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních je pro anthelmintickou aktivitu zásadní. U polygastrických zvířat (např. skot, ovce) často postačí i jednorázové podání, oproti tomu monogastrická zvířata (např. kočka, pes) vyžadují k dosažení požadované účinnosti podání opakované (Lamka a Ducháček 2006).

Významným zástupcem benzimidazolových anthelmintik je například albendazol, mebendazol a fenbendazol. Časté podání benzimidazolů bohužel vede k poměrně rychlému vzniku resistance vůči celé skupině (Bodeček a Koudela 2010).

2.1.3 Imidazothiazoly

Léčiva této skupiny se vyznačují striktně antinematodními účinky, nejeví žádnou aktivitu vůči motolicím ani tasemnicím. Jako cholinergní agonisté na nikotinových receptorech způsobují jejich aktivaci, čímž dojde k prodloužené svalové kontrakci a následné paralýze helminta (Holden-Dye a Walker 2014).

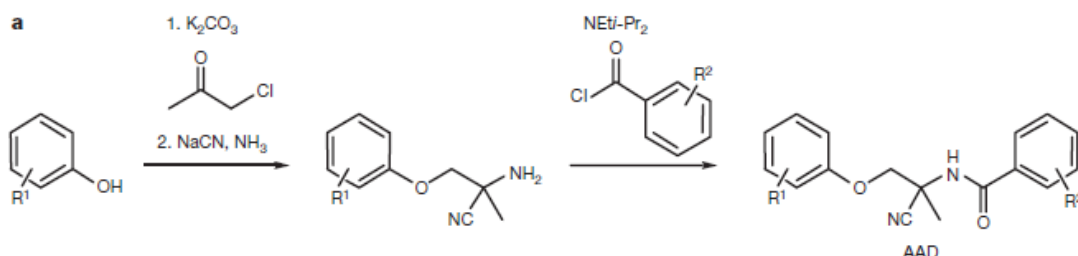
V současnosti používaný levamisol je levotočivým izomerem racemického tetramisolu. Využívá se při léčbě nemocí způsobených střevními a plicními hlísticemi (Holden-Dye a Walker 2014).

Stejným mechanismem působí také léčiva ze skupiny tetrahydropyrimidinů (např. pyrantel), která se tedy rovněž řadí mezi agonisty nikotinu (Holden-Dye a Walker 2014).

2.1.4 Amino-acetonitrilové deriváty (AAD) - Monepantel

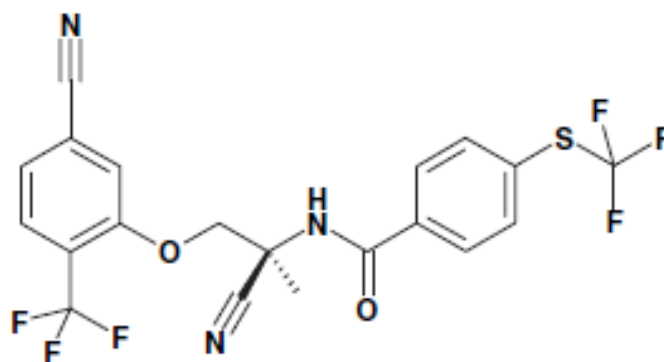
Tato poměrně nová skupina anthelmintik s výraznými antinematodními účinky byla objevena v roce 2008. Již dříve byly některé látky ze skupiny *N*-acyl amino-acetonitrilových derivátů známé pro své fungicidní, baktericidní, insekticidní a další účinky, avšak jejich anthelmintická účinnost zůstávala skrytá (Ducray *et al.* 2008).

Jedná se o nízkomolekulární syntetické látky nesoucí na amino-acetonitrilovém jádře různé aryloxy a aroyl skupiny (Ducray *et al.* 2008). Příprava zahrnuje alkylation fenolu chloroacetonem, následnou Streckerovu reakci a na závěr acylaci amino skupiny za použití aroyl chloridu (Kaminsky *et al.* 2008a).



Obr. 1: Chemická syntéza amino-acetonitrilových derivátů (převzato z Kaminsky *et al.* 2008a)

Z velké skupiny takto připravených sloučenin byl vybrán monepantel (ADD 1566) jako vhodný kandidát na nové léčivo. Tomu předcházela řada *in vitro* testů a byla rovněž sledována snášenlivost a účinnost u hlodavců, ovcí a dobytka. Monepantel se vyznačuje účinností i na rezistentní hlístice, výbornou snášenlivostí a nízkou toxicitou (Kaminsky *et al.* 2008b, Kaminsky a Rufener 2012).



Obr. 2: Chemická struktura monepantelu (Karadzovska *et al.* 2009)

Svým mechanismem účinku se monepantel a ostatní amino-acetonitrilové deriváty liší od ostatních anthelmintik (Lecová *et al.* 2014). Vazbou na specifický acetylcholinový receptor MPTL-1 (protein ACR-23), vyskytující se pouze u hlístic, dochází k otevření iontových kanálů. Zároveň je však zabráněno jejich opětovnému uzavření, což vede k neustálému proudění iontů, které má za následek depolarizaci membrán svalových buněk, jejich hyperkontrakci, paralýzu a v konečném důsledku smrt parazita. Ten je poté vypuzován z těla hostitele společně s výkaly (Kaminsky a Rufener 2012, Epe a Kaminsky 2013).

Poprvé byl monepantel registrován na Novém Zélandu (2009) pod komerčním názvem Zolvix (Novartis Animal Health) na léčbu rezistentních nematodóz u ovcí. Následovaly další země jako Austrálie, mnohé státy jižní Ameriky a Evropy včetně České republiky, kde byl schválen k veterinárnímu použití v roce 2011 (Epe a Kaminsky 2013).

Monepantel je podáván perorálně v dávce 2,5 mg/kg a je účinný vůči dospělým a vývojovým stádiím všech hlavních nematod gastrointestinálního traktu, včetně kmenů rezistentních na klasická anthelmintika (Hosking *et al.* 2008, Kaminsky *et al.* 2009, Epe a Kaminsky 2013).

Tab. 1: Účinnost (%) monepantelu a vybraných anthelmintik proti různým zástupcům nematod u ovcí (Kaminsky a Rufener 2012, upraveno).

	<i>H. contortus</i> Howick	<i>H. contortus</i> Haecon 51	<i>T.</i> <i>colubriformis</i>	<i>T.circumcincta</i>
Fenbendazol	0	-	0	25
Levamisol	0	-	80	21
Ivermektin	3	1	100	24
Monepantel	99,7	99,7	99,8	99,9

Účinnost byla definována jako snížení počtu helmintů.

Metabolismus monepantelu byl zkoumán z několika hledisek. Stuchlíková *et al.* (2012) se nejprve zaměřila na *in vitro* studie s využitím primárních kultur ovčích hepatocytů. Zde bylo nalezeno celkem dvanáct metabolitů, a to produktů jak první tak druhé fáze metabolismu.

Důležitost biotransformace monepantelu i v jiných orgánech, než jsou játra, vyplynula z porovnání výsledků *in vitro* a *in vivo* studií. Sedm z celkem třinácti metabolitů nalezených *in vivo* nebylo detekováno při *in vitro* testech a na druhou stranu šest *in vitro* metabolitů nebylo během studie *in vivo* nalezeno. Zbývajících 6 produktů metabolismu bylo shodných pro oba typy studií, byly tedy nalezeny kromě hepatocytů rovněž v ovčích exkrementech, přičemž hlavním metabolitem nalezeným shodně *in vitro* a *in vivo* zůstává již dříve popisovaný sulfon (Stuchlíková *et al.* 2012, 2014).

Bylo zjištěno, že reakce první fáze metabolismu monepantelu zahrnují S-oxidaci, hydrolýzu a hydroxylaci. Jako produkty druhé fáze biotransformace byly detekovány konjugáty s acetylcysteinem a glukuronidy (Stuchlíková *et al.* 2014).

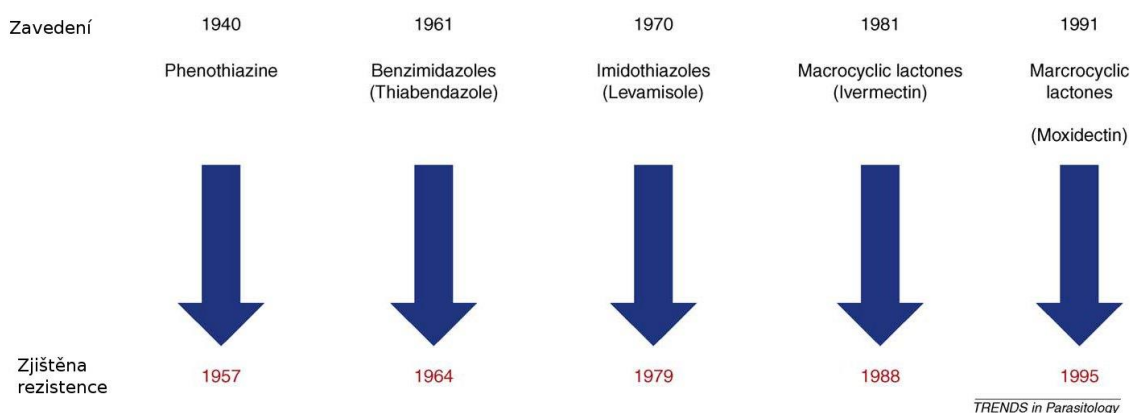
Z biotransformačních studií prováděných *ex vivo* u *H. contortus* (cílový organismus) byly zjištěny 4 metabolity, produkty hydrolýzy a S-oxidace (první fáze metabolismu), čímž se potvrzuje menší vybavenost helmintů biotransformačními enzymy (Stuchlíková *et al.* 2014).

Nalezení struktur metabolitů monepantelu umožnilo odhadnout, které enzymy se metabolismu účastní. Cytochromy P450 (CYP) či flavinové monooxygenasy nejspíš hrají roli při S-oxidaci. Z enzymů druhé fáze biotransformace se jedná o UDP-glukuronosyltransferasu účastnící se glukuronidace a glutathion-S-transferasy, které mají svou úlohu při konjugaci s acetylcysteinem (Stuchlíková *et al.* 2014).

2.1.5 Rezistence na anthelmintika

Rezistence je popisována jako stav, kdy vzrůstající počet jedinců v populaci přestává být ovlivňován obvyklou terapeutickou dávkou léčiva (k dosažení určitého účinku je zapotřebí vyšších dávek). Tento jev se v rámci populace dědí. Rezistence vůči konkrétnímu léčivu se většinou vztahuje i na ostatní zástupce dané anthelmintické třídy. Možný je rovněž rozvoj mnohočetné rezistence vůči několika skupinám anthelmintik zároveň (Wolstenholme *et al.* 2004).

Na přelomu 50. a 60. let minulého století se objevily první zprávy o rezistenci vůči fenothiazinu u *H. contortus* parazitujícího na ovčích. Thiabendazol, jako první širokospektré anthelmintikum s nízkou toxicitou vůči léčeným zvířatům byl představen v roce 1961. Používání thiabendazolu a následně dalších benzimidazolů se rychle rozšířilo, avšak během několika let byla rovněž popsána rezistence vůči těmto látkám (opět poprvé u *H. contortus*). Ten samý problém se opakoval po zavedení imidazothiazolů a makrocyclických laktonů. První případy multirezistentních kmenů byly popsány počátkem 80. let (Kaplan 2004).



Obr. 3: Vývoj rezistence vůči anthelmintikům (James *et al.* 2009, upraveno)

Vznik rezistence může být ovlivněn řadou faktorů, z nichž nejvýznamnějším je frekvence podávání léčiva. Časté a dlouhodobé podávání jednoho anthelmintika nebo anthelmintik majících stejný mechanismus účinku podněcuje rozvoj rezistence. Avšak příliš časté střídání různých tříd anthelmintik může vést ke vzniku multirezistentních kmenů. Proto se využívá tzv. pomalá rotace, při které dochází ke změně léčiva v ročních intervalech (Bodeček a Koudela 2010).

Důležité je také předcházet poddávkování, a to jednak použitím dostatečné dávky, ale také zvolením vhodné cesty podání. Zpravidla je lepší použití o něco větších dávek léčiva, protože nízké dávky mohou umožnit přežití heterozygotních jedinců s genem rezistence, což může v důsledku vést ke vzniku nové odolné populace (Bodeček a Koudela 2010).

Rezistence může vznikat několika různými mechanismy. Nejčastěji dochází ke změnám ve struktuře makromolekul, na které je léčivo cílené. Bylo popsáno několik bodových mutací, které mohou vést k záměně aminokyselin v cílové struktuře a tím pádem změnit afinitu léčiva k této struktuře. Například u benzimidazolů dochází vlivem těchto mutací ke změnám ve struktuře β -tubulinu (Wolstenholme *et al.* 2004, James *et al.* 2009).

Populační heterogenita u parazitů vede k rozdílným reakcím na léčbu. Tímto způsobem může docházet k rychlé selekci rezistentních kmenů. Proto se většina studií zaměřuje na hledání specifických mutací souvisejících se vznikem rezistence (James *et al.* 2009).

Dalším mechanismem vzniku rezistence mohou být změny v distribuci léčiva v cílovém organismu. Zde se mohou uplatňovat efluxní transportní mechanismy podobné lidskému P-glykoproteinu, které brání vstupu léčiva do parazita. V neposlední řadě se pak uplatňují změny v metabolismu anthelmintik, které vedou k zrychlené deaktivaci léčiva. Tyto mechanismy mohou mít za následek i vznik mnohačetné rezistence. (Wolstenholme *et al.* 2004, James *et al.* 2009).

2.1.6 Další možnosti terapie helmitóz

Vzhledem k nárůstu rezistence na anthelmintika je více než žádoucí použití a vývoj alternativních a doplňkových metod při léčbě a prevenci helmintóz. Mezi tyto metody patří například řízení pastvy, biologická kontrola, doplňky stravy a očkování.

Řízení pastvy

Většina parazitů napadá jen určité, případně blízké příbuzné (např. kozy a ovce) druhy zvířat. Střídání různých druhů pasoucího se dobytka je vhodnou cestou ke snížení kontaminace pastvin parazity, stejně tak střídání pastevectví s pěstováním různých plodin. Tímto způsobem lze přerušit životní cyklus parazita, což má příznivé dopady na snížení infekce (Sayers a Sweeney 2005, Stear *et al.* 2006).

Možností je také střídání mladých jedinců se staršími. U starších zvířat nalézáme menší počet vajíček v trusu a celkově jsou méně náchylná k infekci. Na druhou stranu nižší koncentrace vajíček může být převážena vyšší produkcí trusu (Stear *et al.* 2006).

Výhodné je i snížení počtu zvířat pasoucích se na určitém území. To vede ke snížení kontaminace pastviny a zvířata se tak nemusí pást v blízkosti infikovaných výkalů (Stear *et al.* 2006).

Další alternativou je rozdělení pastviny na jednotlivé úseky. Ty jsou spásány postupně a zvířata se nepohybují po celé rozloze pastviny. Bez kontaktu s hostitelem infekční stádia parazitů časem umírají. V ideálním případě by mělo dojít k odumření většiny těchto stádií před tím, než se zvířata vrátí na první úsek pastviny (Stear *et al.* 2006).

Byl zkoumán rovněž vliv různých druhů rostlin na pastvě. Výsledky studií naznačují, že některé druhy rostlin, například jetel, mohou pomoci zmírnit produkční ztráty vzniklé důsledkem nákazy helminty (Sayers a Sweeney 2005).

Biologická kontrola

Ke snížení počtu populací parazitů v hostiteli i na pastvině lze využít spóry nematofágních hub. Tyto houby využívají hlístice jako hlavní nebo doplňkový zdroj živin (Getachew *et al.* 2007). Zástupcem těchto hub je *Duddingtonia flagrans*, která snížením počtu infekčních larev napomáhá ke snížení intenzity a závažnosti infekce. Nevýhodou této metody je nutnost denního přísunu houbových spor (Stear *et al.* 2006).

Doplňky stravy

V boji s infekčními onemocněními hraje hlavní roli imunitní systém. U rezistentních hostitelů produkují helminté méně vajec, která mohou být životaschopná, a vývin v dospělé jedince trvá déle (Stear *et al.* 2006).

Strava obohacená o proteiny podporuje imunitní reakci, díky které dochází k větší úmrtnosti jak nově přijímaných, tak již stávajících larev v trávicím traktu hostitele. Následkem toho se snižuje počet vajíček v trusu, zvyšují se hmotnostní přírůstky zvířat a narůstá i produkce vlny (Sayers a Sweeney 2005). Obohacení stravy o proteiny pravděpodobně také zlepšuje obnovení poškozených sliznic (Stear *et al.* 2006).

Toto řešení naráží na poměrně vysokou cenu proteinových doplňků. Místo toho je možné podávání močoviny, která rovněž zvyšuje odolnost vůči některým parazitům.

To je zapříčiněno předpokládanou přeměnou močoviny na aminokyseliny a následně bílkoviny vlivem bakterií v bachoru přežvýkavců (Stear *et al.* 2006).

Kromě bílkovin má vliv na odolnost vůči parazitům také řada stopových prvků jako je železo, zinek, měď a molybden (Stear *et al.* 2006).

Očkování

Imunitní systém je rovněž možné podpořit očkováním. Vývoj vakcín proti parazitům trávicího traktu je velmi žádoucí a je rovněž dlouhodobým cílem mnoha výzkumných programů (Getachew *et al.* 2007). Ideální vakcína by neměla vyžadovat opakované podání během jedné sezony, měla by být účinná proti více druhům hlístic a v neposlední řadě by měla být dostatečně efektivní vzhledem k ceně (Sayers a Sweeney 2005).

Při vývoji nové vakcíny je zásadním problémem identifikace antigenu, schopného vyvolat ochrannou imunitní reakci (Sayers a Sweeney 2005). Za tímto účelem byla testována řada proteinů produkovaných parazity. Antigeny, které jsou při infekci rozpoznávány imunitním systémem hostitele, se nazývají přirozené nebo také konvenční. Oproti tomu „skryté“ antigeny nejsou za normálních okolností imunitním systémem rozpoznávány, avšak imunitní odpověď na ně se může za určitých podmínek rovněž rozvinout. Přirozené antigeny tvoří hlavně povrchové struktury a sekreční produkty parazitů. Vakcíny na této bázi mohou přispět ke snížení kontaminace pastvin, ale k ochraně jehňat před závažnou haemonchózou většinou nestačí (Getachew *et al.* 2007).

Skrytými antigeny mohou být například bílkoviny gastrointestinálního traktu parazita. V současné době je snaha vyrobit vakcíny na bázi protilátek proti těmto strukturám s využitím rekombinantních technologií (Stear *et al.* 2006).

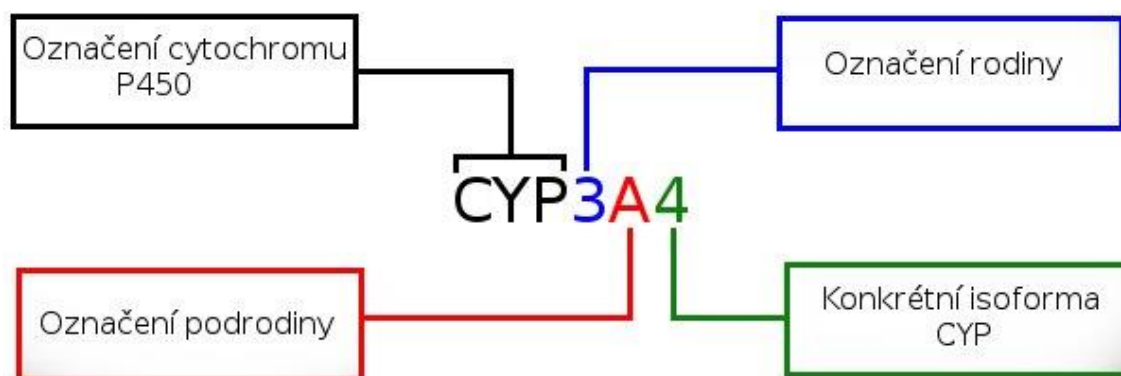
2.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) představují rozsáhlou nadrodinu enzymů první fáze biotransformace, přítomných v téměř všech živých organismech. Mají zásadní roli v metabolismu xenobiotik a podílí se také na metabolismu některých endogenních substrátů, jako jsou steroidy, eikosanoidy, vitaminy rozpustné v tucích, mastné kyseliny a žlučové kyseliny. Výjimečnost těchto hemoproteinů spočívá kromě jejich významu také v počtu substrátů, katalytických aktivit a indukovatelnosti (Skálová *et al.* 2011, Laing *et al.* 2015).

CYP nalézáme téměř ve všech orgánech, tkáních a specializovaných buňkách, přičemž nejvyšších koncentrací dosahují v játrech, která jsou jakýmsi centrem biotransformace xenobiotik (Ioannides 2006, Skálová *et al.* 2011). V lidském genomu je zakódováno 57 různých CYP, přičemž asi 75 % léčiv je metabolizováno 5 hlavními enzymy, z nichž CYP3A4 katalyzuje více než 50 % těchto reakcí (Laing *et al.* 2015).

2.2.1 Klasifikace

Nadrodina CYP je dále členěna do rodin, podrodin a jednotlivých isoform, podle shody v aminokyselinové sekvenci. Enzymy patřící do jedné rodiny se shodují minimálně ze 40 %, u podrodin je nutná shoda alespoň z 55 % (Anzenbacher a Anzenbacherová 2001, Skálová *et al.* 2011). Označení konkrétní isoformy znázorňuje následující obrázek.



Obr. 4: Nomenklatura CYP

Z rozdílů v aminokyselinové sekvenci jednotlivých isoform vyplývají i další odlišnosti, například v substrátové specifitě. Specifické substráty jsou metabolizovány

pouze jednou podrodinou CYP nebo dokonce konkrétní isoformou. Avšak mnohé látky jsou současně biotransformovány několika CYP a často vede přeměna za účasti několika isoform ke vzniku jednoho produktu (Skálová *et al.* 2011).

Odlišnosti nalézáme i mezi různými organismy. Jsou popsány isoformy CYP vyskytující se pouze u jednoho druhu, na druhou stranu u různých organismů se mohou vyskytovat téměř identické enzymy. Rozdílná účast jednotlivých isoform na metabolismu xenobiotik u různých druhů je způsobena rozdílným zastoupením a vlastnostmi (Skálová *et al.* 2011).

Za biotransformaci xenobiotik jsou zodpovědné převážně 3 hlavní rodiny – CYP1, CYP2 a CYP3, v menší míře také CYP4, zatímco zástupci ostatních rodin se podílí převážně na metabolismu endogenních látek. Farmakogenetická heterogenita je způsobena existencí mnoha alelických variant v rámci každé z těchto rodin (Nebert a Russell 2002, Ioannides 2006.)

Rodina CYP1

Členové této rodiny jsou zodpovědní za hydroxylace a další oxidativní přeměny mnoha aromatických látek, přičemž se jejich katalytické aktivity vzájemně překrývají. Biotransformace planárních polycyklických aromatických uhlovodíků je katalyzována CYP1A1, zatímco CYP1A2 upřednostňuje dusíkaté heterocyklické sloučeniny a aromatické aminy. CYP1A2 má velký význam v biotransformaci několika klinicky významných léčiv, a to díky relativně vysoké expresi v játrech. Podílí se rovněž na metabolismu endogenních substrátů, například prostaglandinů, estrogenů a kyseliny arachidonové (Nebert a Russell 2002, Zanger a Schwab 2013). Na rozdíl od CYP1A2 má CYP1A1 vyšší zastoupení v extrahepatálních tkáních (Skálová *et al.* 2011).

Rodina CYP2

Tato rodina je nejrozsáhlejší rodinou CYP u savců. Více než polovina běžně předepisovaných léčiv je u lidí metabolizována v různé míře CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Endogenními substráty těchto enzymů jsou některé steroidy a kyselina arachidonová (Nebert a Russell 2002). Přibližně 15 – 25 % všech klinicky používaných léčiv, zahrnujících prakticky všechny terapeutické třídy, je metabolizováno CYP2D6. Vzhledem k relativně nízké jaterní expresi tohoto enzymu je toto číslo velmi vysoké (Zanger a Schwab 2013).

Rodina CYP3

Rodina CYP3 je tvořena pouze jednou podrodinou CYP3A, která má významnou úlohu v metabolismu přibližně 30 % běžně užívaných léčiv z téměř všech terapeutických skupin (Zanger a Schwab 2013). Jejím nejvýznamnějším členem a současně nejvýznamnější isoformou CYP v metabolismu léčiv je CYP3A4. Jeho exprese je nejhojnější v játrech, ale i ve střevech (v enterocytech), čímž významně přispívá k first-pass metabolismu perorálních léčiv. CYP3A4 se účastní metabolismu až 50 % humánních léčiv různých chemických struktur. Velikost a flexibilita vazebného místa je příčinou nízké substrátové selektivity tohoto enzymu (Skálová *et al.* 2011, Zanger a Schwab 2013). Enzymy podrodiny CYP3A se rovněž podílí na biotransformaci endogenních substrátů, jako jsou steroidy či žlučové kyseliny (Nebert a Russell 2002).

Výrazná indukovatelnost enzymů této podrodiny vede k velké variabilitě v aktivitách mezi různými jedinci. Indukční schopnost konkrétních sloučenin se liší i mezidruhově (Nebert a Russell 2002, Skálová *et al.* 2011).

2.2.2 Indukce enzymů a její důsledky

Enzymovou indukcí rozumíme nárůst aktivity konkrétního enzymu, v důsledku jeho zvýšené syntézy nebo snížené degradace. Zvýšená syntéza enzymů je většinou důsledkem zvýšené genové transkripce. Jedná se v podstatě o obrannou reakci organismu před xenobiotiky (Skálová *et al.* 2011).

Mechanismy indukce můžeme rozdělit na transkripční, kam spadá zvýšení exprese mRNA, a netranskripční, které zahrnují stabilizaci mRNA a snížení degradace proteinu (Skálová *et al.* 2011).

Indukce CYP ovlivňuje metabolismus léčiv. Zrychlená biotransformace vede ke snížení plazmatických hladin léčiva a tím pádem i snížení terapeutického účinku. Pokud je však účinnou látkou metabolit, tak zvýšení aktivity biotransformačních enzymů vede k nárůstu plazmatických hladin této látky a může dojít až k intoxikaci. Indukce se nemusí projevit okamžitě, naopak zvýšená aktivita enzymu může být důsledkem dřívější expozice induktoru. Na délce expozice induktoru a na jeho koncentraci je závislý stupeň indukce. Působení některých induktorů vede k vzestupu aktivity pouze u konkrétní isoformy, avšak většina induktorů zvyšuje zároveň aktivitu více biotransformačních enzymů. (Skálová *et al.* 2011). Například rifampicin, který je

současně substrátem i induktorem CYP3A, způsobuje zároveň zvýšení biotransformace všech ostatních substrátů CYP3A. Mimo to rifampicin indukuje i několik CYP2C, čímž ovlivňuje také metabolismus jejich substrátů. Tyto lékové interakce pak mohou v různé míře komplikovat léčbu (Nebert a Russell 2002).

Indukční popř. inhibiční potenciál všech léčiv by měl být, vzhledem ke svým důsledkům, bedlivě zkoumán u všech léčiv (Skálová *et al.* 2011).

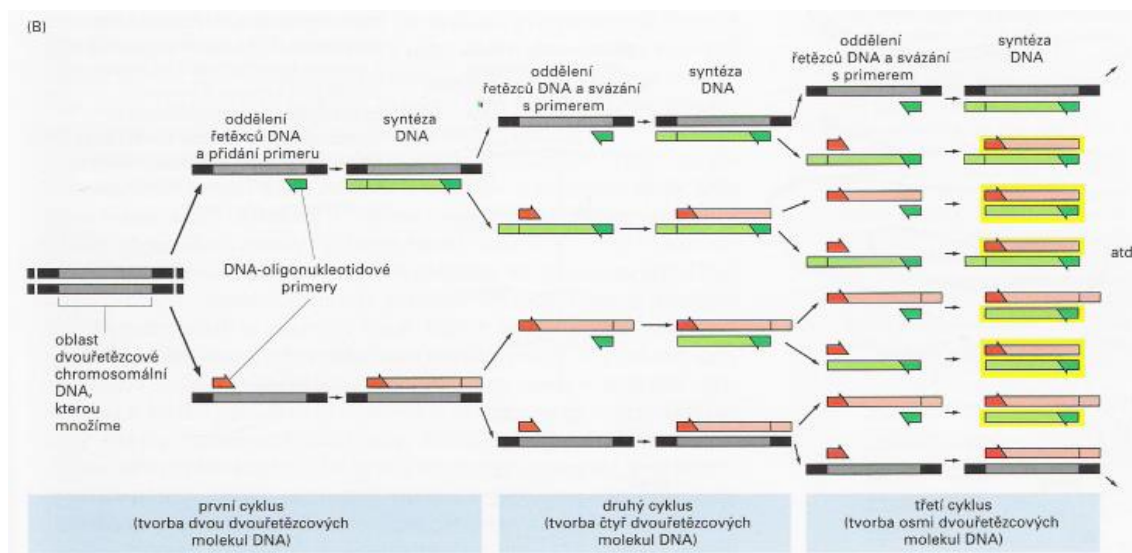
2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je rychlá a vysoce selektivní metoda, sloužící k namnožení vybraného úseku DNA *in vitro* (Alberts *et al.* 2005). Byla objevena roku 1983 Kary B. Mullisem, který byl za tento počín o deset let později oceněn Nobelovou cenou za chemii.

Při této reakci se využívá enzym DNA polymerasa, která podle templátové molekuly DNA vytváří DNA novou, která dále rovněž slouží jako templát pro další syntézu. Aby docházelo k namnožení pouze požadovaného úseku DNA, je nutné tento úsek ohraničit. K tomu slouží primery, krátké oligonukleotidy, které přisedají ke koncům vybraného úseku DNA (každý k jinému vláknu dvouřetězcové molekuly DNA), díky komplementaritě bazí (Alberts *et al.* 2005., LAB Guide 2014).

Metoda je založena na cyklických změnách teplot sestávajících ze tří kroků. Prvním krokem je denaturace za vysokých teplot, obvykle 95-98 °C, kdy dochází k potřebnému rozvolnění dvoušroubovice DNA. Následné nasedání primerů na specifická místa DNA probíhá po zchlazení na teplotu 40-60 °C (podle teploty tání primerů). Tato fáze bývá označována anglickým výrazem annealing. Vhodně zvolená teplota zde hraje velkou roli. Pokud by byla příliš nízká, docházelo by k nespecifickému nasedání primerů a vzniku nespecifického produktu, naopak příliš vysoká teplota může nasedání primerů zcela zabránit. K zabránění opětovného párování jednořetězcových molekul DNA je nezbytný nadbytek primerů. V posledním kroku je teplota opět zvýšena na cca 72 °C (může se lišit v závislosti na použité DNA polymeráze), kdy DNA polymerasa nasedá na primery a začíná syntetizovat nové vlákno DNA, komplementární k vláknu templátovému. Tyto tři kroky se opět opakují, až do dosažení požadovaného množství amplifikovaných molekul. Obvykle se používá třicet cyklů, po jejichž proběhnutí lze získat více než miliardu kopií. Zařízení, ve kterém PCR probíhá, se nazývá termocyklér (Alberts *et al.* 2005, Clark 2005). Průběh reakce znázorňuje obrázek 5.

Eukaryotní DNA polymerasa by podléhala denaturaci vysokými teplotami, proto je nutné použití termostabilních enzymů. Nejčastěji se používá Taq polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* (Clark 2005).



Obr. 5: Princip PCR (převzato z Alberts *et al.* 2005)

2.3.1 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR, real-time PCR) slouží ke stanovení množství produktů, vznikajících během každého cyklu PCR, které jsou přímo úměrné množství výchozí DNA. Existuje několik možností detekce, přičemž všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence (Ginzinger 2002).

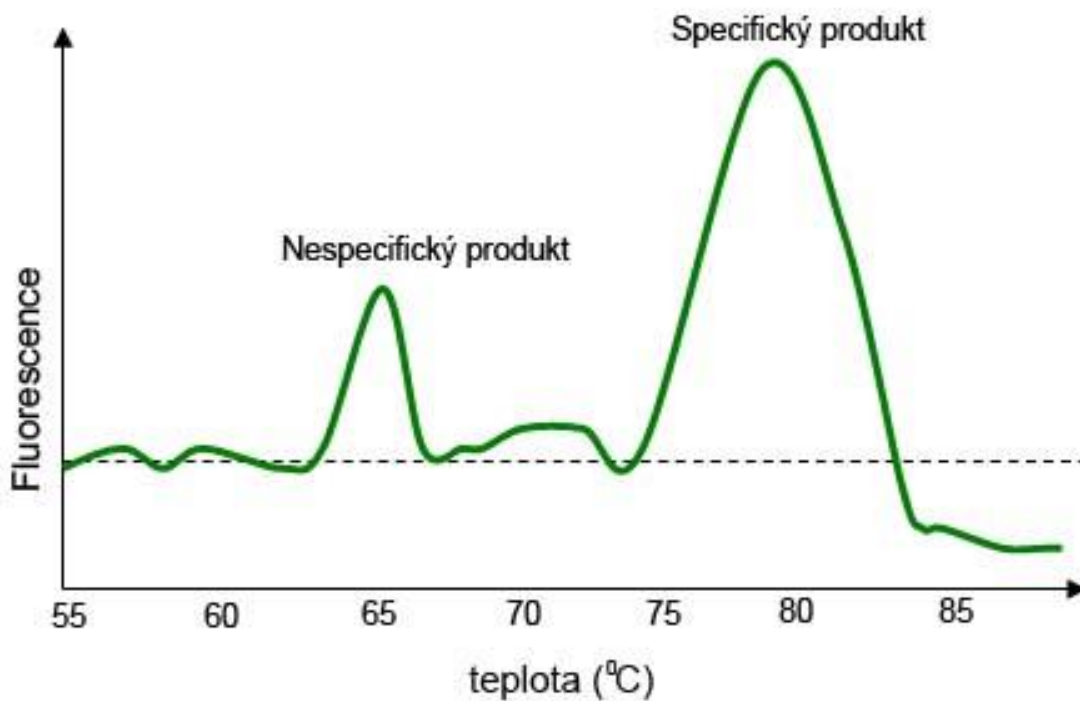
Detekce s využitím fluorescenčních barviv

Při této metodě se využívá fluorescenčních barviv, vážících se nespecificky na jakoukoli dvouřetězcovou DNA. Samotná barviva nevyzařují téměř žádnou fluorescenci, tu můžeme detekovat až po navázání na DNA. Nejpoužívanějším barvivem je interkalační látka SYBR Green I. V průběhu reakce se nárůst fluorescence střídá s jejím poklesem, protože v denaturační fázi cyklu dochází k uvolnění barviva z jednořetězcové DNA. Fluorescence je proto monitorována na konci každého cyklu (Sigma-Aldrich 2008).

Možnost využití pro jakýkoli templát a jakékoli obvyklé primery patří spolu s relativně nízkou cenou k největším výhodám fluorescenčních barviv (Sigma-Aldrich 2008).

Nevýhodou barviva SYBR Green I je, vzhledem k vazbě na jakoukoli dvouřetězcovou DNA, jeho nespecifičnost. K řešení tohoto problému mohou posloužit křivky tání, umožňující sledovat změny fluorescence při různých teplotách. Jak je

znázorněno na obrázku 6, vznik nespécifického produktu by se projevil jako další vrchol na této křivce, což je dáno odlišnými teplotami tání různých molekul DNA (Giulietti *et al.* 2001).



Obr. 6: Křivka tání (<http://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/melting-curve.jpg>)

Detekce s využitím fluorescenčních sond

Využití specifických sond zaručí kvantifikaci výhradně cílového úseku a ne veškeré dvouřetězcové DNA.

TaqMan sondy

Jedná se o hydrolyzační sondy využívající 5'-3' exonukleasové aktivity Taq polymerasy. Na 5' konci oligonukleotidu sondy je navázán fluorofor, jehož fluorescence je absorbována zhášečem navázaným na 3' konci, v důsledku jejich vzájemné blízkosti. Sonda navázaná na cílový úsek DNA je vlivem exonukleasové aktivity polymerasy hydrolyzována, čímž dojde k oddělení fluoroforu a zhášeče. To má za následek vzestup fluorescence. Hlavní výhodou je zde vysoká specifita detekce (Giulietti *et al.* 2001, Sigma-Aldrich 2008).

Molecular Beacons

Tento typ sond je podobně jako TaqMan sondy tvořen oligonukleotidovým řetězcem s fluoroforem navázaným na jednom konci a zhášedčem na konci druhém. Molecular beacons díky komplementaritě koncových částí oligonukleotidu vytváří jakousi vlásenku, čímž dochází k přiblížení fluoroforu a zhášedče. Nukleotidová sekvence uvnitř očka vlásenky je komplementární s cílovým úsekem. Navázáním na tento úsek dojde k rozevření vlásenky, čímž je zabráněno zhášení fluorescence. Výsledná fluorescence je pak přímo úměrná množství cílové DNA (Giulietti *et al.* 2001, Sigma-Aldrich 2008, LAB Guide 2014).

Molecular beacons jsou schopné rozeznat sekvence lišící se jediným nukleotidem a jsou tedy vhodné zvláště k identifikaci bodových mutací (Giulietti *et al.* 2001).

Scorpions

Jedná se o spojení primeru a fluorescenční sondy, která je stejně jako u molecular beacons ve formě vlásenky (LAB Guide 2014).

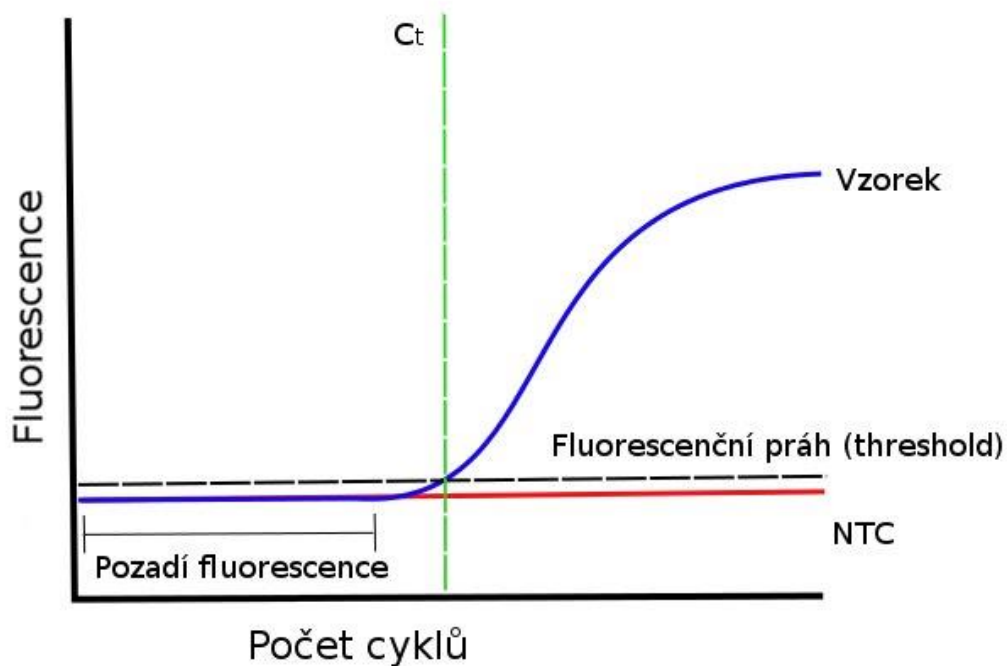
Ve srovnání s TaqMan sondami a molecular beacons je při použití scorpions silnější fluorescence a reakce probíhá rychleji. Největším přínosem je vztah jedna ku jedné mezi množstvím vytvořených amplikonů a emitovanou fluorescencí (Sigma-Aldrich 2008).

Hybridizační sondy

Hybridizační sondy tvoří systém složený ze dvou oligonukleotidů, z nichž jeden má na 3' konci navázaný donorový fluorofor a druhý má na svém 5' konci akceptorový fluorofor. Cílové sekvence sond leží v těsné blízkosti. Po navázání sond na tyto sekvence dojde k přenosu energie z donoru na akceptor a nárůstu fluorescence akceptorové molekuly, která je následně měřena. Tento jev se označuje jako FRET z anglického Fluorescence Resonance Energy Transfer (Giulietti *et al.* 2001).

Kvantifikace

Základním parametrem využívaným při kvantifikaci PCR je hodnota Ct (threshold cycle, cyklus prahu), která udává cyklus, ve kterém fluorescence překračuje detekční práh (fluorescenci pozadí). Tato hodnota je nepřímo úměrná množství výchozího templátu (Ginzinger 2002).



Obr. 7: Grafické znázornění průběhu PCR (<http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2015/06/PCR.png>, upraveno)

Výsledky qPCR je možné kvantifikovat dvěma základními způsoby. První postup využívá kalibrační přímky vzorku o známé koncentraci (vnějšího standardu). Ideální vnější standard obsahuje sekvence shodné, nebo jen mírně odlišné od cílové sekvence. Vzhledem k náročnosti konstrukce takových standardů je tato metoda využívána pouze v případech, kdy je absolutní kvantifikace nezbytná k dosažení spolehlivých výsledků, například při měření virové zátěže (Livak a Schmittgen 2001, Ginzinger 2002).

Častěji využívanou metodou je relativní kvantifikace, která porovnává množství cílového templátu s referenčním templátem ve vzorku. Využívá se zde matematických vzorců k výpočtu relativní exprese v porovnání s kontrolním vzorkem. Při stoprocentní účinnosti PCR reakce by byl výpočet možný jako $2^{\Delta Ct}$, kdy $\Delta Ct = Ct \text{ vzorku} - Ct \text{ kontroly}$ (LAB Guide 2014). Protože reakce většinou neprobíhá za těchto ideálních podmínek, je třeba použití vnitřní kontroly. K normalizaci Ct hodnot se takto využívají referenční geny. K výpočtu se pak používá metoda delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$):

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{cílový gen}} - Ct_{\text{referenční gen}})_{\text{vzorek}} - (Ct_{\text{cílový gen}} - Ct_{\text{referenční gen}})_{\text{kontrola}}$$

Aby bylo dosaženo spolehlivých výsledků, musí být účinnost amplifikace cílových a referenčních genů podobná (Giulietti *et al.* 2001, Livak a Schmittgen 2001).

Účinnost PCR

Jak již bylo naznačeno dříve, účinnost PCR je důležitým parametrem ovlivňujícím výsledky reakce. Závisí na mnoha faktorech, mezi které patří vlastní provedení studie, které je ovlivněno například přisedáním primerů. Dále na složení vzorku, který může obsahovat inhibitory a další látky ovlivňující průběh reakce. V podstatě všechna použitá činidla a jejich koncentrace mohou mít vliv na efektivitu PCR (Svec *et al.* 2015).

U vhodně navržené studie by měla být účinnost PCR pro všechny geny alespoň 90 %. Tuto hodnotu lze vypočítat ze směrnice kalibrační přímky pro daný templát, kterou získáme vhodným ředěním, obvykle desítkovým (Ginzinger 2002).

RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

Ke sledování genové exprese se využívá RT-PCR. Jedná se o spojení polymerasové řetězové reakce s reversní transkripcí. Jako templát zde slouží cDNA, vznikající přepisem mRNA činností reversní transkriptasy. V případě, že je gen exprimován dochází ke tvorbě charakteristických molekul mRNA. Pokud k expresi cílového genu nedochází, žádná mRNA nevzniká (Clark 2005). Metoda takto umožňuje pozorovat expresi cílového genu za odlišných podmínek, jak je znázorněno na obrázku 8 (v prvním případě dochází k expresi genu, zatímco v druhém nikoli).



Obr. 8: Sledování genové exprese s využitím RT-PCR (Clark 2005)

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda nové anthelmintikum monepantel ovlivňuje expresi vybraných isoform cytochromů P450 (CYP) u ovce domácí. Dílčími úkoly bylo:

- 1) Stanovit relativní expresi vybraných CYP v primární kultuře ovčích hepatocytů
- 2) Zjistit změny exprese vybraných CYP po inkubaci ovčích hepatocytů s monepantelem
- 3) Porovnat tyto změny s účinkem klasických induktorů CYP v ovčích hepatocytech
- 4) Stanovit relativní expresi vybraných CYP v játrech ovce
- 5) Porovnat expresi vybraných CYP v játrech kontrolních ovcí a ovcí léčených monepantelem

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a reagensie, přístroje a biologický materiál

4.1.1 Chemikálie a reagensie

Diethylpyrocarbonát (DEPC), Sigma-Aldrich

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich

DTT (dithiotreitol), Sigma-Aldrich

EDTA, Sigma-Aldrich

Ethanol 75 % ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Sigma-Aldrich

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich

Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), Sigma-Aldrich

Chlorid draselný (KCl), Sigma-Aldrich

Chlorid sodný (NaCl), Sigma-Aldrich

Chloroform (CHCl_3), Sigma-Aldrich

Isopropanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$), Sigma-Aldrich

Kolagenasa, Sigma-Aldrich

Kyselina boritá (H_3BO_3), Sigma-Aldrich

Náhodné hexamery, Generi Biotech

qPCR kit (FastStart SYBR Green Master, Roche)

Reversní transkriptasa (RT): ProtoScript II (NEB), Superscript II (Invitrogen)

Rifampicin, Sigma-Aldrich

Síran hořečnatý heptahydrát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich

SYBR Green I, Eurogentec

Směs dNTP, Sigma-Aldrich

TRI Reagent, Sigma-Aldrich

TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma-Aldrich

Trypanová modř, Sigma-Aldrich

Živné medium ISOM, Sigma-Aldrich

Živné medium s FCS, Sigma-Aldrich

4.1.2 Přístrojové vybavení

Automatické pipety, Eppendorf
Centrifuga, Eppendorf, Centrifuge 5810R
Centrifuga, Eppendorf, Centrifuge 5415D
Centrifuga, Heraeus, Biofuge Stratos
Hlubokomrazicí box, Trigon-plus, Juan VXE Series
Inkubátor – Hera cell, Heraeus
Koncentrátor, Eppendorf, Concentrator 5301
Laminární box, BioAir Instruments, Aura 2000 M.A.C.
Laminární box, UV-cabinet for PCR operations, UVC/T-AR
Mikroskop – B-350 Series, Optika Microscopes
Minicentrifuga – SproutTM, Heathrow Scientific
NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, Thermo Scientific
Termocyklér, BioRad, iQ5
Termocyklér, BioRad, MJ Mini
Termocyklér, Life Technologies, Quant Studio 6 Flex,
Systém čištění vody, Millipore – Milli - Q
Váhy – CP 225D, Sartorius
Vortex – V-1 plus, BioSan

4.1.3 Biologický materiál

Kastrovaní samci ovce domácí (*Ovis sp.*, stáří 9 měsíců, váha přibližně 20 kg) chovaní na farmě Běleč byli rozděleni do dvou skupin. První skupině byl perorální cestou podán monepantel v terapeutické dávce 0,1 ml/kg. Druhé skupině léčivo podáno nebylo a sloužila jako kontrolní. Po 24 hod. byla zvířata usmrcena. Z odebraných jater byla izolována RNA TRI Reagentem a hepatocyty pomocí dvoustupňové kolagenasové metody. Všechny experimenty probíhaly v souladu se zákonem 246/1992 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava pracovních roztoků

CaCl₂

4,0 g CaCl₂ bylo rozpuštěno v 50 ml redestilované vody a roztok byl uchováván v lednici.

DEPC H₂O

Redestilovaná voda byla ošetřena DEPC v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 0,1 % (v/v). Následně byla voda protřepána a přes noc ponechána stát. Na závěr byla sterilizována v autoklávu (120 °C/20 min).

Eurocollins

Roztok na promytí a transport jater byl připraven smísením KH₂PO₄ (2,05 g/l), K₂HPO₄ (7,40 g/l), KCl (1.12 g/l), NaHCO₃ (0,84 g/l) a glukosy (35.00 g/l) v destilované vodě.

Fosfátový pufr

2,4 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O a 0,4 g KH₂PO₄ bylo rozpuštěno v malém množství redestilované vody a následně doplněno v odměrné baňce o objemu 200 ml. Pufr byl uchováván zmrazený v plastických lahvích po 20 ml a dále použit na přípravu roztoků pro izolaci hepatocytů.

0,1 M HCl

0,883 ml 35% HCl bylo doplněno redestilovanou v odměrné baňce do 100 ml.

Roztok solí

80,0 g NaCl, 4,0 g KCl a 2,0 g MgSO₄ · 7 H₂O bylo v odměrné baňce doplněno do 1 litru redestilovanou vodou.

NaHCO₃ (1 M)

16,8 g NaHCO₃ bylo rozpuštěno v redestilované vodě a doplněno v odměrné baňce o objemu 200 ml.

0,1M NaOH

0,4 g NaOH bylo rozpuštěno v redestilované vodě a v odměrné baňce doplněno do 100 ml.

TRIS-borátový pufr (TBE) 10x

V cca 800 ml DEPC vody bylo rozpuštěno 108 g TRIS a 55 g H_3BO_3 . Následně bylo přidáno 40 ml 0,5 M EDTA a doplněno DEPC vodou v odměrné baňce o objemu 1 l.

TRIS-borátový pufr (TBE) 0,5x

Pufr byl připraven ze zásobního roztoku pufru (TBE 10x) ředěním v poměru 1:19, tedy smícháním 475 ml DEPC vody a 25 ml zásobního roztoku pufru TBE 10x.

EDTA (0,5 M; pH 8,0)

K 18,16 g EDTA bylo přidáno 80 ml DEPC vody. Následně byl přidáván za stálého míchání NaOH až do požadovaného pH. EDTA byla rozpuštěna až při blížícím se pH 8,0. Na závěr byl roztok doplněn vodou do objemu 100 ml.

EDTA (0,1 M; pH 8,0)

Roztok byl připraven naředěním zásobního 0,5 M roztoku v poměru 1:4 redestilovanou vodou.

Perfúzní roztoky pro izolaci hepatocytů

Smísením 1780 ml redestilované vody, 200 ml roztoku solí a 20 ml fosfátového pufru byl připraven zásobní roztok. Přidáním 1,6 ml $CaCl_2$ k 800 ml tohoto roztoku a úpravou pH na 7,4 (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH) byl připraven roztok C. Zbývajících 1200 ml zásobního roztoku bylo smíšeno s 31,2 ml 1M $NaHCO_3$, po dobu 7 minut bylo probubláváno pneumoxidem (vodní lázeň, 37 °C) a následně bylo upraveno pH na 7,4 (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH). Takto připravený roztok byl rozdělen na 2 části.

K prvním 700 ml bylo v 1 l Erlenmeyerově baňce přidáno 0,1 g EGTA za vzniku roztoku A, který byl následně umístěn na vodní lázeň (37 °C).

Zbývajících 500 ml bylo smíseno s 1,0 ml CaCl₂, čímž byl připraven roztok **B**. Přídavkem albuminu (2 g/200 ml B) bylo připraveno medium **B_v**, které bylo umístěno do lednice.

Dvě plastové nádoby obsahující po 30 ml roztoku **B** byly v odsávací baňce umístěny na vodní lázeň (37 °C) a těsně před promýváním jater do nich byla přidána kolagenasa (15 mg/25 ml B) za vzniku media **B_k**.

4.2.2 Příprava monepantelu

Monepantel pro *in vitro* studie byl připraven na Katedře anorganické a organické chemie (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika) podle Kaminsky *et al.* (2008) s drobnými úpravami. Výchozí hydroxyaceton byl nejprve převeden na tetrahydropyran-2-yl (THP) ether se 79% výtěžkem a následnou Streckerovou reakcí za použití kyanidu draselného, chloridu amonného a roztoku amoniaku v ethanolu. Byl získán produkt se 70% výtěžkem. Výsledný aminoacetonitril byl po reakci s benzoylchloridu převeden na derivát (4-trifluormethylsulfanyl) benzamid (výtěžek 71 %) a následně byla v mírně kyselém prostředí (pyridinium-*p*-toluensulfonát (PPTS) / methanol) odštěpena chránící skupina THP (97% výtěžek). Posledním krokem byla nukleofilní aromatická substituce s 4-fluor-3-trifluormethylbenzonitrilem a alkoholátem uvolněných z aminoacetonitrilového derivátu (AAD) pomocí čerstvého roztoku *tert*-butoxidu draselného (t-BuOK) v tetrahydrofuranu (THF) (výtěžek 27 %). Struktura a čistota připravené látky byla ověřena za použití nukleární magnetické rezonance (NMR) a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) (Stuchlíková *et al.* 2012).

4.2.3 Izolace a inkubace hepatocytů

Vzorek jater byl pomocí skalpelu upraven na vhodnou velikost a řezná plocha zarovnána. Vzorek byl přenesen do Büchnerovy nálevky umístěné nad odpadní nádobou. Následná perfúze jater byla prováděna postupnou a opakovanou kanylací všech cév na jaterním řezu. Játra byla promývána perfúzním roztokem bez vápníku (A) vzdušněným pneumoxidem (37 °C) bez recirkulace až do jejich odkrvení. Poté byla játra promývána mediem s kolagenasou a vápníkem (B_k) o teplotě 37 °C cca 7 – 10 minut, dokud nebyla jaterní tkáň dostatečně natrávena působením kolagenasy. K játrům

bylo přidáno medium s vápníkem a albuminem bez kolagenasy (B_v). Játra byla rozstříhána na malé kousky a pinzetou byly z tkáně vyklepávány hepatocyty do media. Suspenze hepatocytů byla zfiltrována přes nylonové sítko. Získaná suspenze hepatocytů byla pětkrát centrifugována za chlazení (4 °C) při 40 g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla zjištěna koncentrace hepatocytů v suspenzi a jejich životnost obarvením Trypanovou modří. Toto barvivo proniká přes porušenou buněčnou membránu mrtvých buněk, čímž dojde k jejich obarvení. U živých buněk, u nichž je integrita buněčné membrány a jejich transportních mechanismů zachována, je prostupu Trypanové modří zabráněno a tyto buňky zůstávají bezbarvé.

Suspenze hepatocytů byla zředěna na koncentraci 0,8 – 1,0 x 10⁶ živých hepatocytů/ml a nanesena na plastové sterilní Petriho misky potažené kolagenem. Následující 4 hodiny docházelo k přisedání hepatocytů na dno misek (37 °C, 5% CO₂). Poté byly přidány induktory rifampicin (50 μM) a β-naftoflavon (20 μM), předem rozpuštěné v DMSO (výsledná koncentrace DMSO 0,1 %). Tyto vzorky sloužily jako pozitivní kontrola, negativní kontrolu představovaly hepatocyty inkubované se samotným DMSO (0,1 %). Zároveň byly připraveny vzorky s monopantem (10 μM), který byl rovněž předem rozpuštěný v DMSO (0,1 %). Po 24hodinové inkubaci (37 °C, 5% CO₂) byly hepatocyty seškrabány a zamrazeny.

4.2.4 Izolace RNA TRI Reagentem

Principem reakce je selektivní izolace celkové RNA z malého množství tkáně nebo buněk pomocí TRI Reagentu – specifické směsi fenolu a guanidin isothiokyanátu. V průběhu homogenizace tkáně zůstává zachována integrita RNA. Po přidání chloroformu a následném zcentrifugování je směs rozdělena, přičemž ve vodné fázi se nachází RNA. Izolace čisté RNA je dosaženo selektivním vysrážením RNA pomocí isopropanolu.

K 50 mg tkáně bylo přidáno 400 μl TRI reagentu. Tkáň byla homogenizována pomocí zelených mikrohomogenizátorů. Nejprve byla rozmělněna, poté vložena do suchého ledu a znovu zhomogenizována, čímž bylo využito zmrzlého TRI Reagentu pro účinnější homogenizaci. Následně bylo přidáno 600 μl TRI Reagentu (do celkového objemu 1 ml) a směs byla nechána stát 5 minut při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 200 μl chloroformu a 15 sekund byla třepána v ruce. Po 2-3 minutovém stání při laboratorní teplotě byla směs zcentrifugována v předem vychlazené centrifuze na 4 °C po dobu 15 minut při 12 000 g. K oddělené vodní fázi bylo přidáno 500 μl

isopropanolu. Následně byla směs zcentrifugována 10 minut při 12 000 g (4 °C). Peleta byla omyta 75 % ethanolem, který byl čerstvě připraven naředěním absolutního ethanolu DEPC vodou. Směs byla zcentrifugována 5 minut při 7500 g (4 °C). Peleta byla na vzduchu usušena (cca 10 minut) a následně byla rozpuštěna ve 100 µl DEPC vody a důkladně promíchána. RNA byla ponechána asi 5 minut při laboratorní teplotě, ještě jednou promíchána a následně byla uložena na led.

Měření koncentrace Nanodropem: Do zkumavek bylo pipetováno 27 µl DEPC vody a 3 µl rozpuštěné RNA, čímž byl vzorek 10x zředěn. Následně byla změřena koncentrace RNA ředěného vzorku pomocí Nanodropu.

Pro lepší manipulaci byla RNA naředěna na koncentraci 1 µg/µl.

4.2.5 Odstranění DNA

K odstranění případné kontaminace RNA vzorků genomovou DNA slouží ošetření vzorků DNAsou selektivně štěpící DNA.

Reakce probíhala v 30 µl reakční směsi, mastermixu, skládající se z 3 µl příslušného pufru, 1 µl DNAsy, 10 µl RNA o koncentraci 1 µg/µl a 16 µl DEPC vody. Reakční směs byla inkubována ve stolním inkubátoru 25 minut při 37 °C za současného třepání (500 rpm). DNAsa byla inaktivována přidávkem 1,5 µl 0,1 M EDTA a následnou inkubací při 75 °C po dobu 10 minut. Na závěr bylo přidáno 18,5 µl DEPC vody, čímž bylo docíleno koncentrace RNA 0,2 µg/µl. Ošetřená RNA byla uchovávána při teplotě -70 °C a dále byla využita pro reversní transkripci.

4.2.6 Reversní transkripce

Metoda je založena na převedení RNA reverzní transkriptasou (RT) na jedno řetězcovou cDNA za použití náhodných hexamerů.

Smísením 5 µl RNA naředěné na koncentraci 0,2 µg/µl a 1 µl náhodných hexamerů byly připraveny dvě paralelní řady RNA vzorků. První řada byla využita na reverzní transkripci a druhá na noRT kontrolu (bez přidávané RT). Tato směs byla zahřívána v PCR cykléru 5 minut na 65 °C a následně zcentrifugována. Do jedné řady RNA bylo přidáno 14 µl reakční směsi RT+ a do druhé řady RNA 14 µl reakční směsi noRT.

Tab. 2: Příprava reakčních směsí RT+a noRT

RT+	noRT
4 µl pufr 5x	4 µl pufr 5x
2 µl DTT	2 µl DTT
4 µl dNTPs	4 µl dNTPs
0,5 µl RT	-
3,5 µl H ₂ O	4 µl H ₂ O

Reakční směs byla zahřívána v PCR cykléru 5 minut na 65 °C, následně 50 minut na 42 °C (syntéza cDNA) a na závěr 20 minut na 65 °C (denaturace RT). Po proběhnutí reakce bylo do směsi přidáno 80 µl redestilované vody, čímž byla připravená cDNA 5x zředěna. Do následných PCR bylo přidáváno 5 µl ředěné cDNA, což odpovídá 50 ng RNA.

4.2.7 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

K namnožení úseku DNA vymezeného primery pomocí DNA polymerasy slouží polymerasová řetězová reakce (PCR). Primery rozumíme krátké oligonukleotidy, které jsou komplementární k DNA. Pro namnožení obou řetězců DNA je nutno použít dva primery, f – forward a r – reverse.

Během této metody dochází k opakování teplotního cyklu, který se skládá ze tří kroků. Prvním krokem je denaturace, během níž dochází k rozvolnění obou řetězců DNA. Tato fáze probíhá obvykle za teploty 95 – 98 °C. V následujícím kroku, probíhající obvykle při 40 – 60 °C dochází k nasedání primerů. Teplota závisí na teplotě tání primerů, tzv. annealing temperature. Na závěr při 72 °C dochází k vlastní amplifikaci. Délka jednotlivých kroků se odvíjí od velikosti množené DNA a použité DNA polymerasy.

Při stanovení množství transkriptů (mRNA) vybraných genů se využívá qPCR, tedy kvantitativní PCR v reálném čase. U této metody je do PCR směsi přidáváno fluorescenční barvivo (SYBR GreenI) nebo hydrolyzační sonda (TaqMan), apod.

Po doběhnutí každého cyklu se měří fluorescence. Množství přepisované cDNA stanovovaného genu udává tzv. kvantifikační cyklus, který se stanovuje při překročení meze detekce.

Reakční směs byla připravena podle následujících schémat.

Tab 3: Reakční směs pro SYBR qPCR – finální koncentrace primerů 250 nM

	1X	Pro 14 reakcí
10x buffer mix	2,00	28,00
50mM MgCl₂	1,40	19,60
5mM dNTP	0,80	11,20
Hotgoldstar enzym	0,10	1,40
F Primer (5μM)	1,00	14,00
R Primer	1,00	14,00
FastStart SYBR Green	0,60	8,40
Redestilovaná voda	8,10	113,40
cDNA (ředěná 1:4)	5,00	-
Celkem	20,00	280,00

Tab. 4: Reakční směs pro SYBR qPCR – finální koncentrace primerů 100 nM

	1X	Pro 14 reakcí
10x buffer mix	2,00	28,00
50mM MgCl₂	1,40	19,60
5mM dNTP	0,80	11,20
Hotgoldstar enzym	0,10	1,40
F Primer (5μM)	0,40	5,60
R Primer	0,40	5,60
FastStart SYBR Green	0,60	8,40
Redestilovaná voda	9,30	130,20
cDNA (ředěná 1:4)	5,00	-
Celkem	20,00	280,00

Takto připravená reakční směs byla v iQ5 (Bio-Rad) PCR cykléru podrobena následujícímu programu.

95°C	95°C	60°C	72°C	65°C-95°C	4°C
10'	10''	20''	20''	á 0,5°C á 30''	∞
		40 cyklů	®	®	

Po doběhnutí programu byl zkontrolován průběh fluorescenčních křivek a křivek tání a z hodnot Ct následně pomocí metody delta-delta Ct byl proveden výpočet.

4.2.8 Agarosová elektroforesa

Tato separační metoda je založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu záporně nabitých molekul RNA směrem k anodě závisí nepřímou úměrou na jejich velikosti. V tomto případě byla metoda využita k hodnocení kvality a integrity RNA.

Příprava Gelu: Rozmícháním 0,6 g agarosy v 40 ml 0,5x TBE pufru a následným zahříváním v mikrovlnné troubě po dobu 1 – 1,5 minuty byl připraven 1,5% gel. Po zchlazení byly přidány 4 µl SYBR Safe barviva sloužícího jako interkalační činidlo pro vizualizaci RNA, gel byl nalit do připravené omyté aparatury a na závěr byl vložen hřeben.

Po zatuhnutí gelu a opatrném vyjmutí hřebenu byl gel otočen a celý zalit 0,5x TBE puftrem. Na parafilm byly připraveny kapky loading dye barviva, které bylo následně smícháno se vzorky (cca 1 µl loading dye barviva na 5 µl vzorku). Celý objem vzorku s barvivem byl opatrně přenesen do jamek gelu. Aparatura byla spuštěna na 60 V po dobu cca 90 min. Na závěr byl gel vyfocen.

4.2.9 Statistická analýza

Všechna data jsou uváděna jako aritmetický průměr ± SD. Výpočty byly prováděny pomocí programů Microsoft Excel a GraphPad Prism 6.0. Ke statistickému vyhodnocení rozdílů mezi skupinami podrobenými monepantelu a kontrolními skupinami byl použit nepárový Studentův *t*-test. Rozdíly byly považovány za signifikantní při $P < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Koncentrace RNA

Po izolaci RNA z jater tří kontrolních ovcí a tří ovcí, kterým byl podán monepantel, byla změřena její koncentrace spektrofotometricky pomocí Nanodropu. Při měření byla mimo jiné kontrolována čistota udávaná jako poměr absorbancí A260/A280, která značí kontaminaci proteiny. Tato hodnota by se měla blížit dvěma, což výsledky splňují.

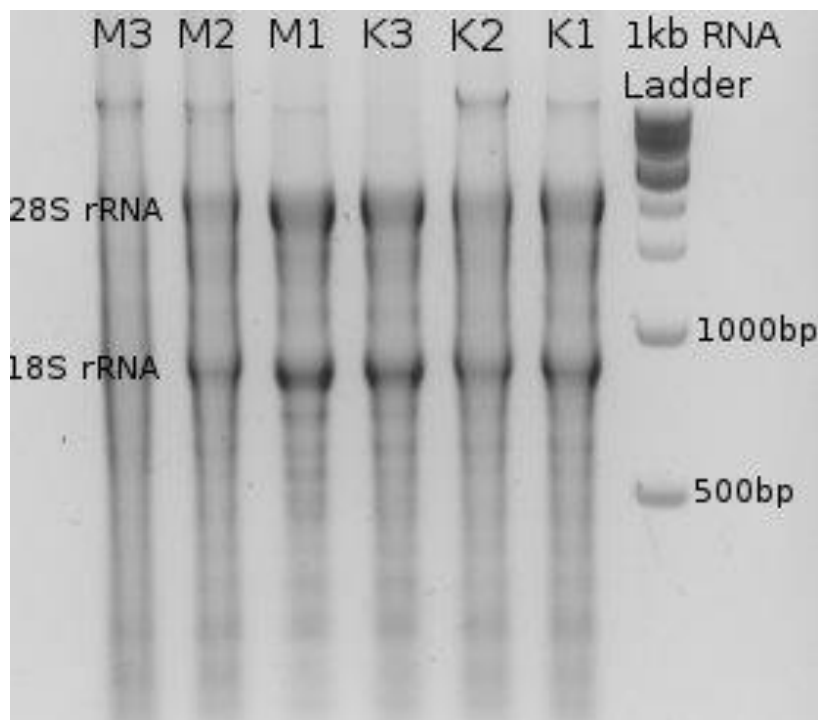
Na obrázku 9 je zobrazen agarosový gel z elektroforézy provedené po izolaci RNA z ovčích jater. Jako marker byl použit 1kb RNA Ladder.

Koncentrace RNA byla zjišťována také *in vitro* v ovčích hepatocytech. Výsledky shrnuje tabulka 6.

Tab. 5: Koncentrace RNA - játra

* OK1	Koncentrace RNA (µg/µl)	A260/A280
OK1	1,40	1,87
OK2	0,92	1,84
OK3	0,75	1,78
OM1	1,05	1,84
OM2	1,39	1,86
OM3	1,26	1,80

* OK = kontrolní ovce; OM = ovce, kterým byl podán monepantel



Obr. 9: Agarosový gel po provedení elektroforézy RNA

Tab. 6: Koncentrace RNA - hepatocyty

*	Koncentrace RNA (ng/μl)	A260/A280
K1	172,65	1,93
K2	165,88	1,92
K3	180,21	1,88
K4	182,29	1,91
M1	210,44	1,85
M2	171,59	1,95
M3	154,27	1,88
M4	172,97	1,92
R1	708,40	2,03
R2	801,33	1,99
R3	624,92	2,01
bNF1	211,40	1,87
bNF2	142,03	1,92
bNF3	200,83	1,86

* K = kontroly; M = hepatocyty po expozici monepantelu; R = hepatocyty inkubované s rifampicinem; bNF = hepatocyty inkubované s β -naftoflavonem

5.2 Návrh primerů

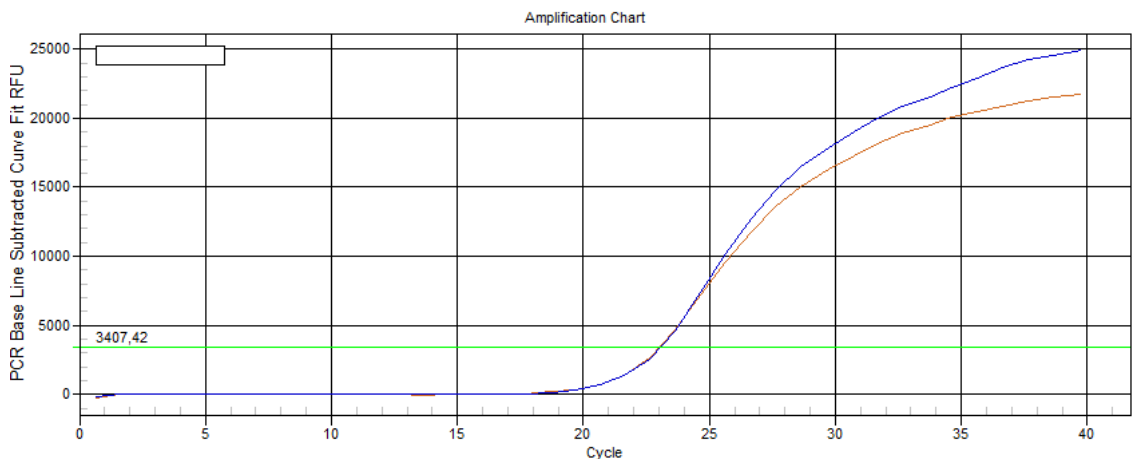
Primery pro sledování genové exprese vybraných cytochromů byly navrženy manuálně pomocí programu Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), parametry použité pro vyhledávání primerů byly většinou automaticky nastavené (např. délka primerů 18 – 23 nt). Pouze optimální teplota nasedání primerů byla nastavena na 60 °C a délka produktu byla nastavena na 50 – 200 nt. Program Primer3 vyhledal na zadané sekvenci pět optimálních sad primerů pro daný gen. V programu mFold (<http://mfold.rna.albany.edu/>) byly zkontrolovány pozice primerů – zda nenedávají na místa, kde i při 60 °C vznikají vlásenkové struktury. Dále byla kontrolována specifita vybraných primerů programem NCBI/primerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), kde byly sekvence primerů porovnány se všemi sekvencemi v genomu ovce. Pro každý testovaný cytochrom, byla nakonec vybrána jedna sada primerů, které byly otestovány. Navržené primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech v Hradci Králové.

Tab. 7: Primery používané pro PCR

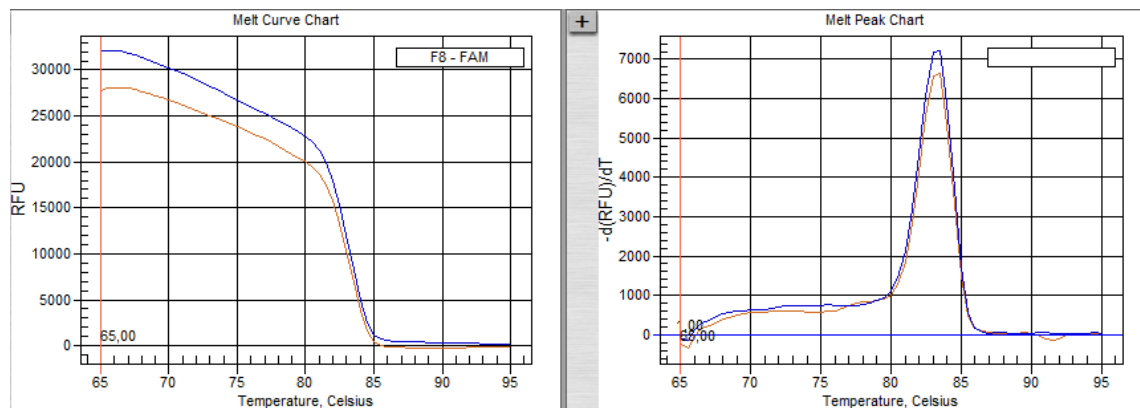
Gen	NCBI Accession No.	Forward primer	Reverse primer	Aplikon (nt)
CYP1A1	NM_001129905	CGCTATGACCACGATGACCA	CTTGAAGAGGTCCAGGGCAG	141
CYP1A2	XM_004017851	AGAGGTTCCCTGCAGTTCGTG	TCCCTGGACGCTGTTCTTGTGTC	73
CYP3A24	NM_001129904.1	TCTCCAACCTTCACCAGTGG	TGACGGACTTGCCCTTCTCT	112
CYP2B4	XM_004015700	GACCCACGCCCACTTTGAGAA	CCAAGCTCTCACCCAGACAG	133
CYP2C18	HQ263379	TCCGGATTATGAGCTCCCCA	TCAAATGTGAGGTCCCAGGGA	183
CYP2C19	NM_001205152	CTCTTCAAATGCTTTCCCTCTT	GGGTTATTGAGGTCCAGGGATTTC	137
CYP2E1	NM_001245972.1	TCATCGGCTTCGCTCCTTAC	CTCAGCCCCGTCTTGTCTT	82
GAPDH	NM_001190390	GTTCCACGGGCACAGTCAAGG	ACTCAGCACCCAGCATCACCC	116
YWHAZ	NM_001267887	CCCTGAGAAAGCCTGCTCTC	TTCCCCCTCCTTCTCCTGCTT	181

5.3 Ověření funkčnosti primerů

Z průběhu PCR křivek (Obr. 10), byla ověřena funkčnost daných primerů. Na amplifikačních křivkách byly zřetelné jednotlivé fáze (exponenciální, lineární, plateau). Specifita nasedání primerů a vznik jednoho produktu byl ověřen pomocí křivek tání (Obr. 11). Jeden vrchol na křivkách tání značí, že vzniká pouze jeden specifický produkt. Pro ilustraci jsou zde uvedeny křivky cytochromu 1A2.



Obr. 10: Amplifikační křivka CYP1A2

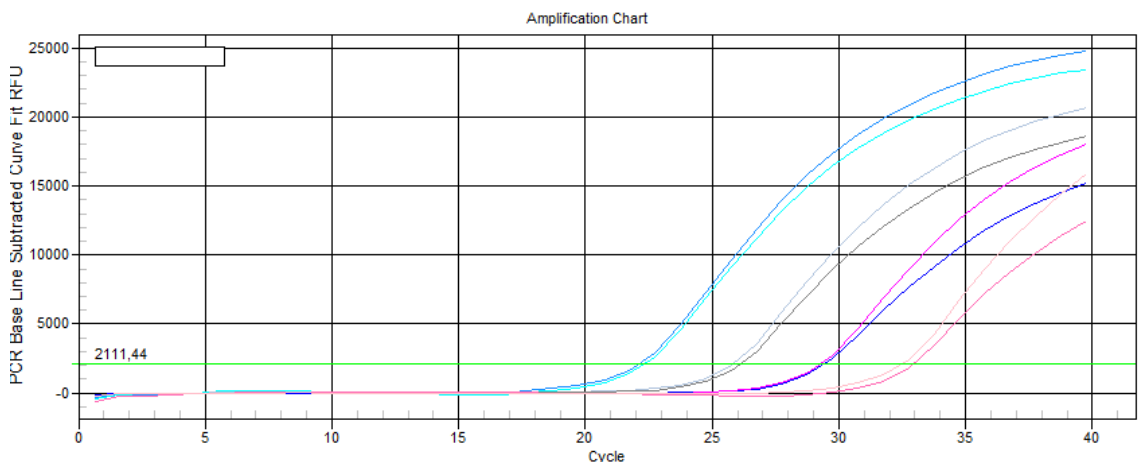


Obr. 11: Křivky tání CYP1A2

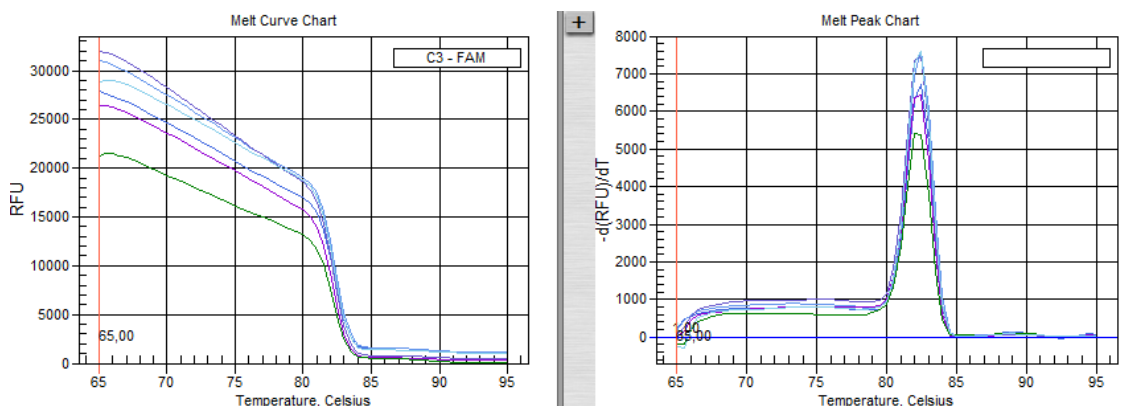
5.4 Ověření účinnosti primerů

U použitých primerů byla rovněž testována jejich účinnost. Ta byla vypočítána ze směrnice kalibrační přímky, která vyjadřuje vztah Ct hodnot ke vstupní koncentraci DNA.

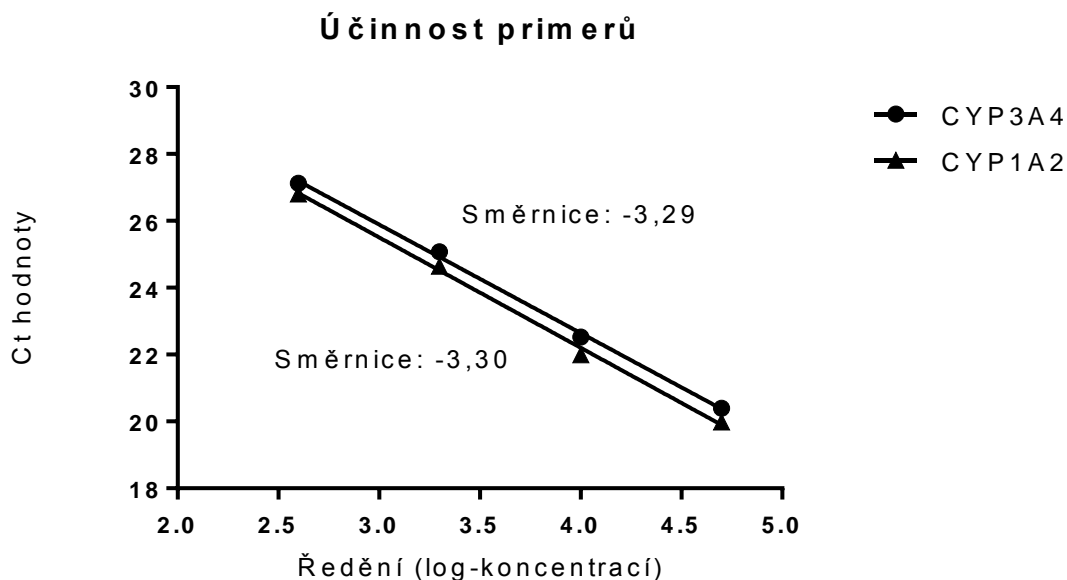
Podle zkušebního PCR byla pro každý primer připravena ředící řada templátové DNA. Jednotlivé vzorky této řady byly podrobeny Real-time PCR. Ze získaných Ct hodnot jednotlivých ředění byla vytvořena kalibrační přímka pro daný primer. Na obrázku 12, jsou pro ilustraci uvedeny amplifikační křivky ze stanovení účinnosti primerů pro detekci CYP3A4, včetně křivek tání pro vznikající produkty (Obr. 13). Na obrázku 14, jsou na ukázkou vytvořeny kalibrační přímky z hodnot naměřených pro CYP3A4 a CYP1A2, včetně získané směrnice pro výpočet účinnosti. Vypočítané účinnosti pro jednotlivé sady primerů jsou v tabulce 8.



Obr. 12: Amplifikační křivky CYP3A4 – stanovení účinnosti



Obr. 13: Křivky tání CYP3A4



Obr. 14: Kalibrační přímky vybraných primerů.

Výpočty byly prováděny podle rovnice $E = (10^{(-1/\text{směrnice})} - 1) \times 100$.

Příklad výpočtu pro CYP3A4: $(10^{(-1/-3,29)} - 1) \times 100 = 101\%$

Tab. 8: Účinnosti primerů pro sledované geny

Geny	Směrnice	Účinnost (%)
CYP1A1	-3,25	103
CYP1A2	-3,30	101
CYP2C19	-3,49	94
CYP3A4	-3,29	101
CYP2E1	-3,46	95
GAPDH	-3,39	97
YWHAZ	-3,28	102

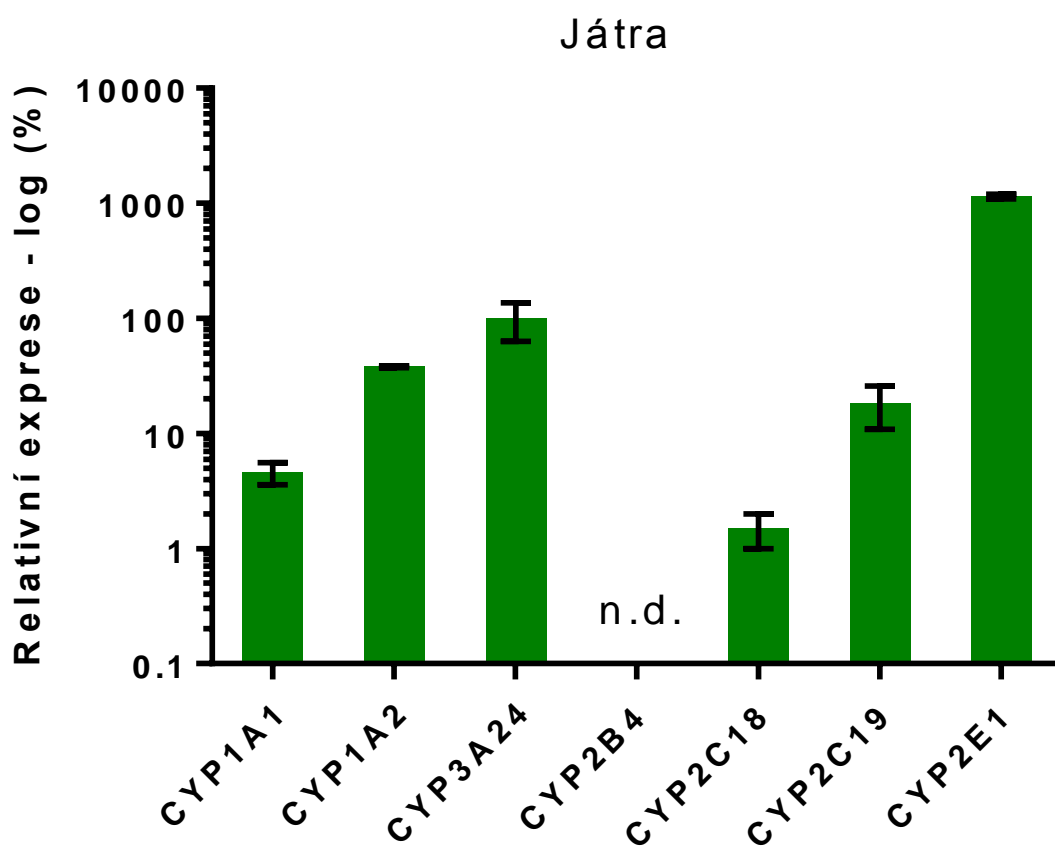
5.5 Transkripční hladiny mRNA testovaných cytochromů

Z PCR dat byla zjištěna relativní exprese mRNA různých cytochromů P450 v játrech a hepatocytech kontrolních ovcí. Naměřené Ct hodnoty byly normalizovány s použitím referenčních genů GAPDH a YWHAZ, které se ukázaly jako nejstabilnější ze čtyř testovaných.

Nejvyšší exprese byla v játrech zjištěna u isoformy CYP2E1, která je z 82 % shodná s lidským CYP2E1. Naopak mezi detekce nedosahoval CYP2B4, který se ze 70 % shoduje s lidskými isoformami CYP2B6 a CYP2B7. CYP3A24, který je považován za homolog lidského CYP3A4 vykazoval relativně vysoké hladiny jak v játrech, tak v hepatocytech. Ovčí isoforma CYP1A2 (85% shoda s lidským CYP1A2) dosahovala v játrech relativně vysokých hladin, zatímco v hepatocytech byla její exprese nízká. Nízké hladiny byly rovněž zaznamenány u homologu CYP1A1, u kterého je shoda s lidským CYP1A1 78 %. Z ovčích isoform CYP2C vykazoval značnou expresi pouze CYP2C19 a to převážně v hepatocytech. Hladina CYP2C18 byla v játrech nízká a v hepatocytech byla pod mezí detekce.

Tab. 9: Relativní exprese mRNA jednotlivých cytochromů P450 v játrech ovcí. Hodnoty představují průměr ± směrodatnou odchylku ze 3 měření. Jako 100% byla zvolena exprese CYP3A24

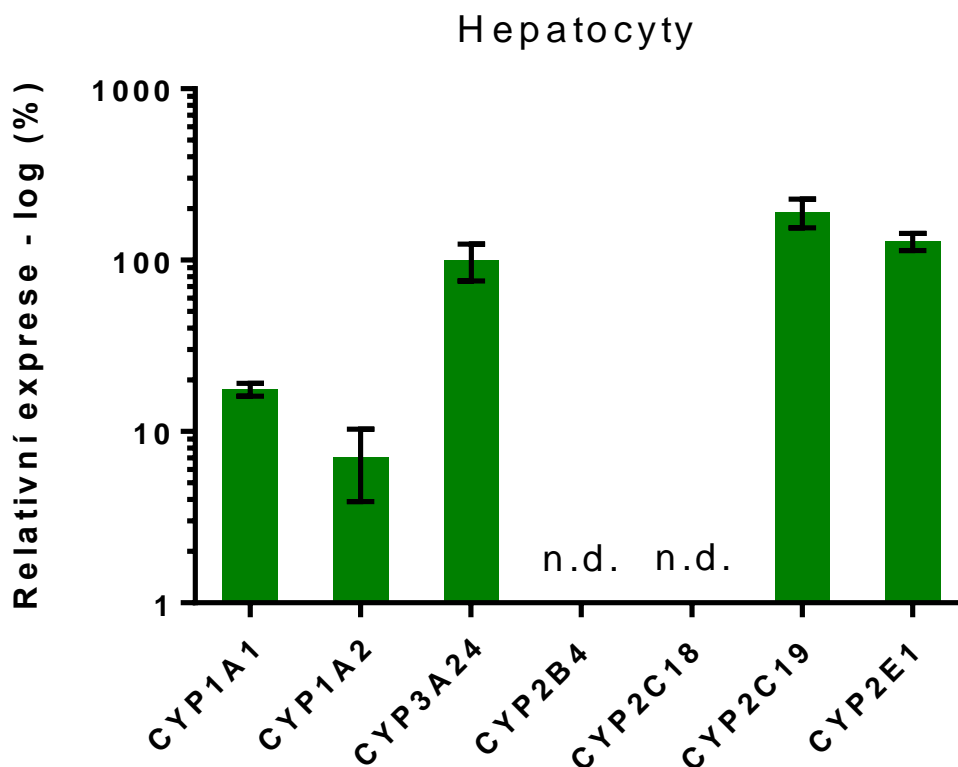
CYP	Relativní exprese (%)
CYP1A1	4,6 ± 1,0
CYP1A2	38,1 ± 0,7
CYP3A24	100,0 ± 36,9
CYP2B4	-
CYP2C18	1,5 ± 0,5
CYP2C19	18,4 ± 7,5
CYP2E1	1148,0 ± 56,0



Obr. 15: Grafické znázornění relativní exprese mRNA jednotlivých cytochromů P450 v játrech ovcí (n.d. – nebyl detekován).

Tab. 10: Relativní exprese mRNA jednotlivých cytochromů P450 v hepatocytech ovcí. Hodnoty představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze 3 měření. Jako 100% byla zvolena exprese CYP3A24.

CYP	Relativní exprese (%)
CYP1A1	17,6 \pm 1,5
CYP1A2	7,1 \pm 3,2
CYP3A24	100,0 \pm 24,3
CYP2B4	-
CYP2C18	-
CYP2C19	190,6 \pm 36,3
CYP2E1	128,6 \pm 14,7



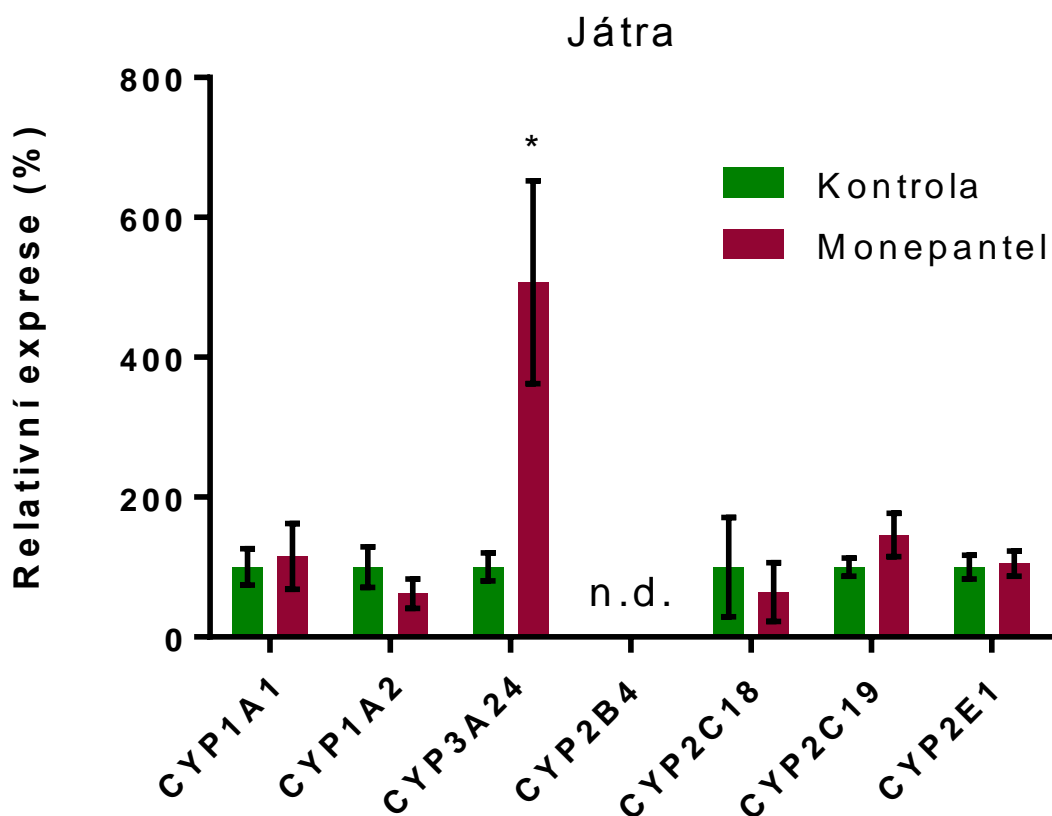
Obr. 16: Grafické znázornění relativní exprese mRNA jednotlivých cytochromů P450 v hepatocytech ovčí (n.d. – nebyl detekován).

5.6 Vliv monepantelu na expresi CYP *in vivo*

Po 24 hodinové expozici monepantelu ovčím (2,5 mg/kg), byly v játrech pozorovány relativní hladiny mRNA a porovnávány s ovci kontrolními, kterým monepantel podáván nebyl. K významnému vzestupu exprese došlo pouze u CYP3A24 cca 5x. Ostatní testované cytochromy byly nezměněny.

Tab. 11: Porovnání relativní exprese mRNA u kontrolních ovcí a ovcí, kterým byl podán monepantel. Exprese jednotlivých isoformů CYP u kontrolních ovcí byla vyjádřena jako 100 %.

CYP	Relativní exprese (%) – kontroly	Relativní exprese (%) – monepantel
CYP1A1	100 ± 26	115 ± 47
CYP1A2	100 ± 29	62 ± 21
CYP3A24	100 ± 20	507 ± 145
CYP2B4	-	-
CYP2C18	100 ± 71	64 ± 42
CYP2C19	100 ± 13	146 ± 31
CYP2E1	100 ± 17	105 ± 18



Obr. 17: Srovnání exprese mRNA jednotlivých CYP u kontrolních ovcí a ovcí, kterým byl podán monepantel (n.d. – nebyl detekován).

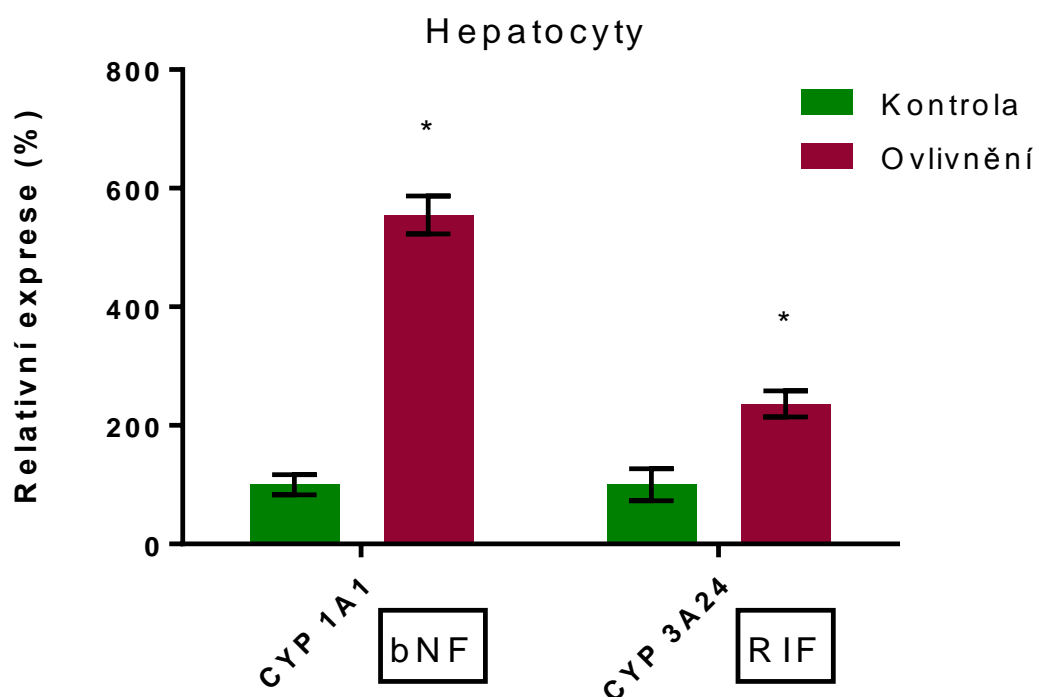
5.7 Vliv monepantelu na expresi CYP *in vitro*

Nejprve byla funkčnost celého testovaného systému *in vitro*, za použití primárních kultur ovčích hepatocytů a jejich ovlivňování, ověřena testem indukovatelnosti vybraných cytochromů známými induktory. Indukovatelnost CYP3A24 byla testována za použití rifampicinu a CYP1A1 beta-naftoflavonem. 50 μ M rifampicin zvýšil expresi mRNA u CYP3A24 cca 2,5x oproti kontrolám. Expresce CYP1A1 po inkubaci s beta-naftoflavonem (20 μ M) vzrostla cca 5,5x.

Tab. 12: Expresce CYP v hepatocytech kontrolních a ovlivněných rifampicinem a β -naftoflavonem

	Kontrola (%)	Ovlivněné (%)
CYP3A24	100 \pm 27	236 \pm 22 ^a
CYP1A1	100 \pm 17	555 \pm 32 ^b

^a rifampicin, ^b β -naftoflavon

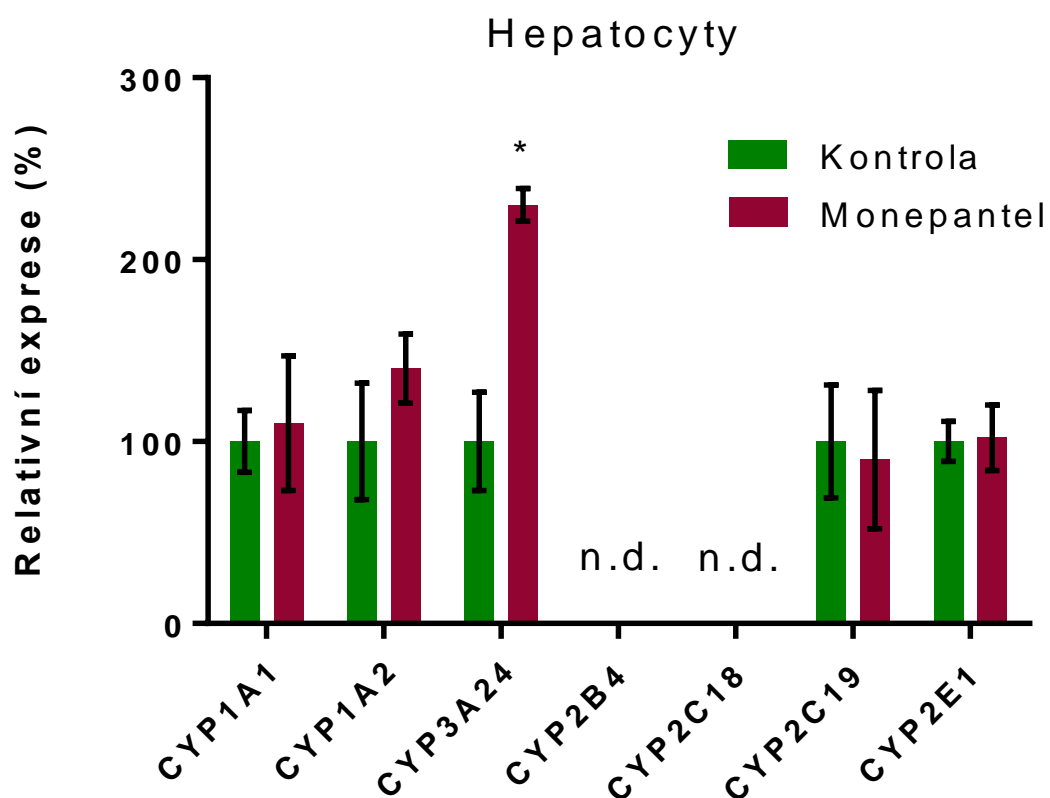


Obr. 18: Zvýšení exprese CYP1A1 v hepatocytech vlivem β -naftoflavonu a CYP3A24 vlivem rifampicinu

Stejným způsobem byly hepatocyty ovlivňovány monepantelem (10 μ M). Po izolaci RNA a reverzní transkripci byly stanovovány relativní změny v hladinách mRNA pro jednotlivé cytochromy. Stejně jako u stanovení *in vivo* jediný indukovaný cytochrom byl CYP3A24, jehož exprese vzrostla cca 2,5x.

Tab. 13: Porovnání relativní exprese mRNA v kontrolních hepatocytech a v hepatocytech inkubovaných s monepantelem. Exprese jednotlivých isoformů CYP v kontrolních hepatocytech byla vyjádřena jako 100 %.

CYP	Relativní exprese (%) – kontroly	Relativní exprese (%) – monepantel
CYP1A1	100 \pm 17	110 \pm 37
CYP1A2	100 \pm 32	140 \pm 19
CYP3A24	100 \pm 27	230 \pm 9
CYP2B4	-	-
CYP2C18	-	-
CYP2C19	100 \pm 31	90 \pm 38
CYP2E1	100 \pm 11	102 \pm 18



Obr. 19: Srovnání exprese mRNA jednotlivých CYP u kontrolních hepatocytů a hepatocytů po expozici monepantelu (n.d. – nebyl detekován).

Uvedená data představují průměr ze 3 měření \pm SD a jsou vyjádřena jako procentuální poměr oproti kontrolám (= 100%).

* $P < 0,05$

6 DISKUZE

Rostoucí rezistence na běžně používaná širokospektrá anthelmintika (benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony) u hospodářských zvířat byla podnětem k hledání nových léčiv s odlišným mechanismem účinku, dostatečnou účinností a bezpečností (Kaminsky *et al.* 2008b). Tyto podmínky splňuje monepantel, poměrně nové anthelmintikum ze skupiny amino-acetonitrilových derivátů. Jedná se o nízkomolekulární syntetickou látku účinnou proti všem hlavním původcům gastrointestinálních nematodóz, včetně rezistentních kmenů. Vyznačuje se výbornou snášenlivostí a nízkou toxicitou vůči léčeným zvířatům (Ducray *et al.* 2008, Kaminsky *et al.* 2008b, Kaminsky a Rufener 2012).

Monepantel je v současnosti registrován pod komerčním názvem Zolvix v mnoha zemích, včetně České republiky, a jeho doporučená denní dávka je 2,5 mg/kg (Hosking *et al.* 2008, Kaminsky *et al.* 2009, Epe a Kaminsky 2013).

Jako většina jiných léčiv i monepantel podléhá po vstupu do organismu biotransformaci za vzniku metabolitů lišících se od výchozí látky strukturou i biologickými vlastnostmi. Zásadní roli v metabolismu léčiv hrají cytochromy P450 (CYP). Zatímco enzymy z této nadrodiny byly u lidí a hlodavců důkladně zmapovány, údaje týkající se ostatních živočišných druhů, běžně léčených ve veterinární medicíně, jsou velmi nekompletní (Fink-Gremmels 2008). Expresi CYP u ovcí se doposud zabývalo jen velmi málo publikací. Například Maté *et al.* (2012) zkoumal expresi CYP3A v játrech a střevech ovcí po podání dexametazonu.

Všechny dostupné výsledky svědčí o výrazných mezidruhových rozdílech, jak v expresi, tak v indukovatelnosti CYP. Tyto odlišnosti znemožňují extrapolaci dat mezi různými živočišnými druhy. Proto byl účinek monepantelu na expresi CYP v této práci sledován u ovcí, jakožto cílového druhu monepantelu. Po expozici monepantelu byly pozorovány změny v expresi mRNA v játrech ovcí (*in vivo*) a primárních kulturách ovčích hepatocytů (*in vitro*). Ke znázornění aktuálního stavu ve veterinární praxi sloužily *in vivo* pokusy, zatímco *in vitro* testy na ovčích hepatocytech umožnily použití modelových induktorů CYP jakožto pozitivních kontrol.

Nejprve byly zjištěny transkripční hladiny mRNA vybraných CYP v játrech a hepatocytech ovcí. Naměřené hodnoty byly normalizovány za využití referenčních genů

GAPDH a YWHAZ. Relativní exprese jednotlivých isoform CYP se významně lišila, přičemž nejvíce byl v játrech zastoupen CYP2E1.

Následně byly pozorovány změny v expresi mRNA v játrech ovcí po 24hodinové expozici monepantelu. V porovnání s kontrolními zvířaty došlo k výraznému nárůstu hladin mRNA u isoformy CYP3A24, a to přibližně 5x. Expese ostatních testovaných CYP se po podání monepantelu výrazně nelišila od hodnot zjištěných u kontrolních ovcí.

V *in vitro* testech byla nejprve ověřena funkčnost celého námi používaného systému ověřením indukovatelnosti vybraných CYP známými induktory. Rifampicin sloužil k ověření indukovatelnosti CYP3A24, zatímco β -naftoflavon indukoval CYP1A1. Data získaná po inkubaci primárních kultur ovčích hepatocytů s monepantelem byla podobná těm z *in vivo* experimentů. Expese většiny testovaných CYP zůstala téměř nezměněna oproti kontrolám. K výrazné indukci monepantelem došlo pouze u CYP3A24. V porovnání s rifampicinem byla dokonce indukce monepantelem vyšší, přestože koncentrace monepantelu byla oproti rifampicinu pětinová.

Získaná data svědčí o výrazné indukovatelnosti CYP3A24 monepantelem u ovcí. Tento efekt lze předpokládat i u jiných živočišných druhů, avšak vzhledem k velké mezidruhové variabilitě v indukovatelnosti enzymů je nutné tuto možnost ověřit.

Zvýšená exprese mRNA naznačuje následný nárůst hladiny enzymu a tím pádem i zvýšení jeho aktivity. To může vést k intenzivnější biotransformaci substrátů indukovaného enzymu, v našem případě CYP3A24. Protože podrodina CYP3A je zodpovědná za metabolismus více než 50 % všech léčiv, může mít indukce těchto enzymů výrazný dopad na účinek mnoha léčiv. Při současném (případně následném) podání jiných léčiv, převážně substrátů CYP3A, s monepantelem tak může dojít k výraznému snížení jejich plazmatických koncentrací vlivem zvýšené biotransformace a tím pádem k selhání terapie. Na druhou stranu mohou tyto farmakokinetické lékové interakce na úrovni CYP vést u léčiv s aktivními metabolity k jejich kumulaci a následné intoxikaci organismu (Chu *et al.* 2009).

Mnoho infekcí u ovcí vyžaduje kombinovanou léčbu více anthelmintiky, čímž dojde k rozšíření spektra účinku. Využívá se jak současné, tak následné podávání různých druhů anthelmintik. To je často výhodné i z důvodu snížení rozvoje anthelmintické rezistence (Bartram *et al.* 2012). Avšak monepantel nelze vzhledem

k výrazné indukci CYP3A24 využít v kombinaci s jinými anthelmintiky, například benzimidazoly, protože enzymová indukce by pravděpodobně způsobila rychlejší biotransformaci těchto léčiv a snížení jejich účinku. Tímto způsobem může dojít k přežití většího počtu parazitů a následnému rozvoji anthelmintické rezistence.

7 ZÁVĚR

- 1) V primárních kulturách ovčích hepatocytů byla zaznamenána poměrně vysoká relativní exprese u isoform CYP2C19, CYP2E1 a CYP3A24. Transkripční hladiny mRNA CYP1A1 a CYP1A2 byly nízké, u CYP2C18 a CYP2B4 nedosahovaly mezí detekce.
- 2) Po 24hodinové inkubaci ovčích hepatocytů s monepantelem došlo k výraznému nárůstu hladiny mRNA pouze u CYP3A24. Exprese ostatních isoform CYP byla v porovnání s kontrolami prakticky nezměněna.
- 3) Indukční efekt monepantelu na CYP3A24 byl výraznější než indukční efekt rifampicinu, který je známým induktorem CYP3A, a to přesto, že koncentrace monepantelu byla 5x nižší než koncentrace rifampicinu.
- 4) Nejvyšší relativní exprese v játrech ovcí byla zaznamenána u CYP2E1. Poměrně vysokých hladin mRNA dosahoval rovněž CYP3A24 a CYP1A2. Z testovaných CYP2C dosahoval uspokojivých hladin pouze CYP2C19. Exprese CYP2C18 byla nízká, podobně jako u CYP1A1. CYP2B4 byl stejně jako v hepatocytech pod detekčním limitem.
- 5) Exprese CYP3A24 byla u ovcí léčených monepantelem cca 5 x vyšší než u kontrolních ovcí. Transkripční hladiny mRNA ostatních isoform CYP se u ovcí léčených monepantelem výrazně nelišily od hladin zjištěných u kontrolních ovcí.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAD	amino-acetonitrilové deriváty
bNF	β -naftoflavon
CYP	cytochromy P450
DEPC	diethylpyrocarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MOP	monepantel
NMR	nukleární magnetické rezonance
PCR	polymerasová řetězová reakce
PPTS	pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonát
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RIF	rifampicin
RT	reversní transkriptasa
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
<i>t</i> -BuOK	<i>tert</i> -butoxid draselný
TBE	TRIS-borátový pufr
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyran-2-yl
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

9 ZDROJE

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005): *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero Publishing, Ústí nad Labem, ISBN 80-902-9062-0.

Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, 737 – 747.

Bartram D. J., Leathwick D. M., Taylor M. A., Geurden T., Maeder S. J. (2012) The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*, vol. 186, 151 – 158.

Bodeček Š., Koudela B. Veterinární a chovatelská opatření proti vnitřním parazitům u koní [online]. Poslední revize 11.2010 [cit. 2015-07-15]. Dostupné z http://cehis.cz/publik_syst/files11/Veterinari%20a%20chovatelska%20opatreni%20p%20roti%20vnitrnim%20parazitum%20u%20koni.pdf.

Clark D. P. (2005) *Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution*. Academic Press, Burlington, ISBN 0121755517.

Dostálek M. (2006) Enzymatický systém cytochromu P450. *Postgraduální medicína*, Praha, roč. 8, č. 1, 46 – 54.

Ducray P., Gauvry N., Pautrat F., Goebel T., Fruechtel J., Desales Y., Schorderet Weber S., Bouvier J., Wagner T., Froelich O., Kaminsky R. (2008) Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 18, 2935 – 2938.

Epe C., Kaminsky R. (2013) New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology* vol. 29, 129 – 134.

Fink-Gremmels J. (2008) Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. *European Journal of Pharmacology*, vol. 585, 502 – 509.

- Getachew T., Dorcies P., Jacquet P. (2007) Trends and challenges in effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite* vol. 14, 3 – 14.
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu Ch. (2001) An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25, 386 – 401.
- Ginzinger D. G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, vol. 30, 503 – 512
- Graham M. J., Lake B. G. (2008) Induction of drug metabolism: Species differences and toxicological relevance. *Toxicology*, vol. 254, 184 – 191.
- Holden-Dye L., Walker R. J. (2014) Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1 – 29.
- Hosking B. C., Stein P. A., Mosimann D., Seewald W., Strehlau G., Kaminsky R. (2008) Dose determination studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Veterinary Parasitology*, vol. 157, 72 – 80.
- Chu V., Einolf H. J., Evers R., Kumar G., Moore D., Ripp S., Silva J., Sinha V., Sinz M., Skerjanec A. (2009) In Vitro and in Vivo Induction of Cytochrome P450: A Survey of the Current Practices and Recommendations: A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Perspective. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 37, 1339 – 1354.
- Ioannides C. (2006) Cytochrome P450 Expression in the Liver of Food-Producing Animals. *Current Drug Metabolism*, vol. 7, 335 – 348.
- 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, 328 – 335.
- Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Weber S. S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A., Mäser P. (2008a) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, vol. 452, 176 – 180.

Kaminsky R., Gauvry N., Schorderet Weber S., Skripsky T., Bouvier J., Wenger A., Schroeder F., Desaulles Y., Hotz R., Goebel T, Hosking B. C., Pautrat F., Wieland-Berghausen S., Ducray P. (2008b) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, vol. 103, 931 – 939.

Kaminsky R., Mosimann D., Sager H., Stein P., Hosking B. (2009) Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *International Journal for Parasitology*, vol. 39, 443 – 446.

Kaminsky R., Rufener L. (2012) Monepantel: From Discovery to Mode of Action. In: Caffrey C. R. (ed.) *Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines*. 1st ed Willey-Blackwell, San Francisco, ISBN 978-3-527-33059-1.

Kaplan R. M. (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, vol. 20, 477 – 481.

Karadzovska D., Seewald W., Browning A., Smal M., Bouvier J., Giraudel J. M. (2009) Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 32, 359 – 367.

LAB Guide, *Kvantitativní Real-Time PCR* [online] (2014) [cit. 2015-08-07]. Dostupné z <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

LAB Guide, *Polymerázová řetězová reakce (PCR)* [online] (2014) [cit. 2015-08-07]. Dostupné z <http://labguide.cz/metody/pcr/>

Laing R., Bartley D. J., Morrison A. A., Rezansoff A., Martinelli A., Laing S. T., Gilleard J. S. (2015) The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, vol. 45, 243 – 251.

Lamka J., Ducháček L. (2006) *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3. vyd. Karolinum, Praha, ISBN 80-246-1243-7.

Lecová L., Stuchlíková L., Prchal L., Skálová L. (2014) Monepantel: the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*, vol. 141, 1686 – 1698.

Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402 – 408.

Maté L., Lifschitz A., Sallovitz J., Ballent M., Muscher A. S., Wilkens M. R., Schröder B., Lanusse C., Virkel G. (2012) Cytochrome P450 3A expression and function in liver and intestinal mucosa from dexamethasone-treated sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 35, 319 – 328.

McKellar Q. A., Jackson F. (2004) Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*, vol. 20, 456 – 461.

Nebert D. W., Russell D. W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, vol. 360, 1155 – 1162.

Sigma-Aldrich, *qPCR Technical Guide* [online] (2008) [cit. 2015-07-28]. Dostupné z http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/qpcr_technical_guide.pdf

Sayers G., Sweeney T. (2005) Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Animal Health Research Reviews*, vol. 6, 159 – 171.

Stear M. J., Doligalska M., Donskow-Schmelter K. (2007) Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology*, vol. 134, 139 – 151.

Stuchlíková L., Jirásko R., Vokřál I., Lamka J., Špulák M., Holčapek M., Szotáková B., Bártíková H., Pour M., Skálová L. (2012) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, 1705 – 1712.

Stuchlíková L., Jirásko R., Vokřál I., Valát M., Lamka J., Szotáková B., Holčapek M., Skálová L. (2014) Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Testing and Analysis*, vol. 10, 1055 – 1062.

Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M. D., Kubista M. (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, vol. 3, 9 – 16.

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, 469 – 476.

Zanger U. M., Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 138, 103 – 141.