

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických vied



---

Úloha UDP-glykosyltransferas  
vo vývoji liekovej rezistencie u parazitických hlístovcov

---

Dizertačná práca

Mgr. Diana Dimunová

Vedúci dizertačnej práce:

doc. Ing. Petra Matoušková, Ph. D.

Hradec Králové, 2022

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

Hradec Králové, 2022

Mgr. Diana Dimunová

## POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rada poďakovala svojej školiteľke **doc. Ing. Petre Matouškovej, Ph. D.** za svedomité vedenie, trpezlivosť, optimistický prístup a podporu po celý čas môjho doktorského štúdia. Taktiež by som rada poďakovala **prof. RNDr. Lenke Skálovej, Ph. D.** a **prof. Ing. Barbore Szotákovej, Ph. D.** nielen za pomoc a cenné rady pri plnení cieľov mojej vedeckej činnosti, ale aj za vytváranie priateľskej atmosféry vo Výskumnej skupine pre štúdium liekovej rezistencie a interakcii liečiv.

Moje poďakovanie patrí celému pracovnému kolektívu na **Katedre biochemických vied** za udržiavanie príjemného pracovného prostredia a ich ochotu s čímkoľvek pomôcť, pričom špeciálne poďakovanie patrí pani **Alene Pakostovej** za neustálu starostlivosť o prevádzku našich laboratórií.

V neposlednom rade, ďakujem svojej rodine za podporu počas celého môjho štúdia.

Za finančnú podporu ďakujem Grantovej agentúre Českej Republiky projekt 17-11954Y a Univerzite Karlovej projekt SVV 260 550.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických vied**

**Kandidát:** Mgr. Diana Dimunová

**Školiteľ:** doc. Ing. Petra Matoušková, Ph. D.

**Názov dizertačnej práce:**

Úloha UDP-glykosyltransferas vo vývoji liekovej rezistencie u parazitických hlístovcov

Ochorenia spôsobené parazitickými hlístovcami predstavujú závažný problém ohrozujúci zdravie hospodárskych zvierat, pretože ich farmakoterapiu komplikuje rozšírená anthelmintická rezistencia. Poznanie mechanizmov rezistencie a obranných stratégií parazitov voči liečivám je dôležité pre zachovanie účinnosti súčasných anthelmintík a vývoji nových prístupov ku kontrole týchto infekcií. K rozvoju rezistencie môže prispievať schopnosť parazitov inaktivovať anthelmintika prostredníctvom ich metabolizmu, ktorý je zabezpečený biotransformačnými enzýmami.

Nadrodina UDP-glykosyltransferas (UGT) môže chrániť parazity pred toxickým účinkom anthelmintík modifikáciou liečiv na inaktívne metabolity glykosidy. Tieto metabolity boli identifikované v metabolizme benzimidazolov vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch *H. contortus*, čo nasvedčuje zapojeniu UGT do anthelmintickej rezistencie.

V genóme tejto parazitickej nematody bolo nájdených 32 génov kódujúcich UGT, ktoré sú rozdelené do 15 rodín. Ďalšia charakterizácia spomínanej skupiny enzýmov odhalila aj rozdielnu úroveň transkripcie niektorých génov UGT v citlivom a rezistentnom kmeni v priebehu života nematody, ktorá ukazuje rôznu úlohu jednotlivých enzýmov UGT v *H. contortus*. Okrem toho, expresia niektorých génov UGT bola indukovaná vystavením *H. contortus* anthelmintiku albendazol (ABZ) buď za laboratórnych podmienok alebo priamo v kontaminovanom prostredí. Následná, biotransformácia ABZ v takto ovplyvnených vzorkách mala za dôsledok zvýšenú produkciu metabolitov, čo ukazuje možný dôvod rozvoja rezistencie v spojitosti s prítomnosťou anthelmintík subletálnych dávkach v *H. contortus*. Testovanie inhibičného účinku sulfinpyrazonu (SP) na UGT aktivitu v dospelých červoch spôsobilo zníženie produkcie metabolitov ABZ-glykosidov. Získané výsledky potvrdzujú prepojenie enzýmov UGT s anthelmintickou rezistenciou.

# Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Mgr. Diana Dimunová

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

**Title of Doctoral Thesis:**

The role of UDP-glycosyltransferases in drug resistance in parasitic nematodes

The diseases caused by parasitic nematodes represent a serious problem, which threatens livestock's health, because pharmacotherapy is complicated by widespread anthelmintic resistance. Understanding of the mechanisms of parasite drug resistance and defense strategies is important to maintaining the effectiveness of currently used anthelmintics and developing new approaches to controlling these infections. The ability of parasites to inactivate anthelmintics through their metabolism, which is provided by biotransformation enzymes, may contribute to the development of drug resistance.

The UDP-glycosyltransferases (UGT) superfamily can protect parasites from the toxic actions of anthelmintics by modifying drugs to inactive glycoside metabolites. These metabolites have been identified in benzimidazole metabolism to an increased extent in a resistant strain of *H. contortus*, which suggests the involvement of UGTs in anthelmintic resistance.

In the genome of this parasitic nematode, 32 genes encoding UGTs divided into 15 families have been found. Further, characterization of these enzymes also revealed different transcription levels of some UGT genes in the susceptible and resistant strain during the nematode lifetime, which shows the different roles of individual UGT enzymes in *H. contortus*. Moreover, the expression of some UGT genes was induced by exposure of *H. contortus* to anthelmintic albendazole (ABZ), either under laboratory conditions or directly in a contaminated environment. Subsequently, the biotransformation of ABZ in pre-exposed nematodes resulted in increased production of metabolites that indicate a possible reason for the development of resistance associated with the presence of anthelmintic in sublethal doses in *H. contortus*. Exposition of *H. contortus* adults to the UGT inhibitor sulfinpyrazone (SP) caused a reduction in the production of ABZ-glycosides, which confirmed the involvement of UGTs in the biotransformation. In summary, the obtained results underline the association of UGTs with anthelmintic resistance in *H. contortus*.

## Obsah

<b>1.</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>Gastrointestinálne hlístovce (nematody) prežúvavcov</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1.</b>	<b><i>Haemonchus contortus</i></b> .....	<b>9</b>
2.1.1.	Životný cyklus.....	10
2.1.2.	Haemonchóza .....	11
2.1.3.	Diagnostika.....	11
<b>2.2.</b>	<b>Liečba haemonchózy</b> .....	<b>12</b>
2.2.1.	Anthelmintika.....	13
2.2.2.	Ďalšie možnosti terapie a prevencie .....	15
<b>2.3.</b>	<b>Anthelmintická rezistencia</b> .....	<b>17</b>
2.3.1.	Mechanizmus.....	17
2.3.2.	Diagnostika rezistencie.....	20
2.3.3.	Prevencia .....	20
<b>3.</b>	<b>Biotransformácia anthelmintík</b> .....	<b>21</b>
3.1.1.	Fáza I. ....	23
3.1.2.	Fáza II.....	24
<b>3.2.</b>	<b>UDP-glykosyltransferasy (UGT)</b> .....	<b>25</b>
<b>4.</b>	<b>Ciele práce</b> .....	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>Výsledky a diskusia</b> .....	<b>30</b>
5.1.	Metabolizmus vybraných benzimidazolov v dospelých červoch <i>H. contortus</i> .....	30
5.2.	Rodina UDP-glykosyltransferas v <i>H. contortus</i> .....	32
5.3.	UDP-glykosyltransferasy a metabolizmus albendazolu v juvenilných štádiách <i>H. contortus</i> .....	34
5.4.	Vplyv environmentálnej cirkulácie anhelmintika albendazolu na <i>H. contortus</i> .....	36
5.5.	Úloha UDP-glykosyltransferas v xenobiotickej rezistencii .....	38
5.6.	Indukcia a inhibícia UDP-glykosyltransferasy v metabolizme albendazolu v <i>H. contortus</i> .....	39
<b>6.</b>	<b>Záver</b> .....	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Podiel autorky na publikáciách zahrnutých v dizertačnej práci</b> .....	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>Zoznam skratiek</b> .....	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>Zoznam použitej literatúry</b> .....	<b>45</b>
<b>10.</b>	<b>Prílohy</b> .....	<b>53</b>
10.1.	Publikácie vzťahujúce sa k téme práce.....	53
10.2.	Zoznam publikácii nevzťahujúcich sa k téme práce.....	54
10.3.	Zoznam prezentácií na vedeckých konferenciách .....	55

# 1. Úvod

Helmintózy sú ochorenia spôsobené rozmanitou skupinou parazitických červov vyskytujúcich sa po celom svete. Tieto ochorenia postihujú nielen ľudí, ale aj voľne žijúce či hospodárske zvieratá. K pôvodcom helmintóz patria aj parazitické nematody (hlístovce). Infekcie spôsobené gastrointestinálnymi nematodami zostávajú jedným z najrozšírenejších problémov ohrozujúcich malé prežívavce. Z ekonomického hľadiska je dôraz kladený na výskum hospodárskych zvierat. Nematody totiž spôsobujú zníženú produktivitu zvierat, alebo môžu dokonca viesť až k rozsiahlym úhynom stád, preto je dôležitý rozvoj účinnej kontroly a liečby ochorenia.

Eliminácia nematod je vo veľkej miere založená na podaní anthelmintík. Intenzívne a často nevhodné použitie týchto liečiv viedlo k zvýšeniu odolnosti nematod proti pôvodne anthelminticky účinným látkam. Dokonca je lieková rezistencia hlásená voči všetkým skupinám anthelmintík a to už po niekoľkých rokoch od ich zavedenia na trh. Táto skutočnosť výrazne komplikuje liečbu helmintóz.

Mechanizmy vzniku rezistencie zahrňujú radu procesov od zmeny cieľovej štruktúry účinku liečiva, po zvýšený metabolizmus a inaktiváciu anthelmintika. Nematody disponujú biotransformačnými enzýmami, ktoré do značnej miery ovplyvňujú biologickú aktivitu cudzorodých látok ako sú liečivá. Medzi tieto enzýmy patria UDP-glykosyltransferasy, ktoré katalizujú konjugáciu endogénnej molekuly s lipofilnou zlúčeninou a tak podporujú jej vylúčenie z organizmu. Odhalenie zapojenia UDP-glykosyltransferasy v rezistencii anthelmintík prostredníctvom zvýšenej biotransformácie týchto liečiv by mohlo prispieť k lepšiemu pochopeniu rozvoja a mechanizmu anthelmintickej rezistencie. Náplňou tejto dizertačnej práce je preto rozšíriť doterajšie poznatky a priniesť nové informácie o biotransformácii bezimidazolových anthelmintík so zameraním na úlohu UDP-glykosyltransferas v nematodach *H. contortus* s rôznou úrovňou rezistencie.

## 2. Gastrointestinálne hlístovce (nematody) prežúvavcov

Gastrointestinálne (GI) nematody spôsobujú jedno z najzávažnejších ochorení prežúvavcov. Mnoho týchto parazitických druhov je schopných infikovať viacero hostiteľských druhov od voľne žijúcich jeleňov po hospodárske zvieratá, napríklad ovce a kozy. Životný cyklus nematod zahŕňa čiastočný vývoj mimo hostiteľa, kedy infekčné štádia pretrvávajú v prostredí, na pastvinách a vo vodných zdrojoch. Riziko prenosu parazitov medzi hospodárskymi zvieratami a voľne žijúcimi zvieratami v oboch smeroch je redukované sledovaním životných biorytmov, regulovaním voľne žijúcich zvierat poľovníkmi a okrem toho je ovplyvnené komplexnými interakciami medzi biotopom, klimatickými podmienkami, najmä teplotou a vlhkosťou [1, 2].

**Tabuľka 1.:** Najvýznamnejšie druhy gastrointestinálnych nematod prežúvavcov [3, 4]

Rodina	Druh	Lokalizácia v hostiteľovi
<i>Trichostrongylidae</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	žalúdok - slez (abomasum)
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	žalúdok - slez (abomasum)
	<i>Ostertagia ostertagi</i>	žalúdok - slez (abomasum)
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	tenké črevo
<i>Cooperiidae</i>	<i>Cooperia oncophora</i>	tenké črevo
<i>Molineidae</i>	<i>Nematodirus filicollis</i>	tenké črevo
	<i>Nematodirus spathiger</i>	tenké črevo
<i>Chabertiidae</i>	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	hrubé črevo
	<i>Chabertia ovina</i>	hrubé črevo

Dospelé nematody s charakteristickým pohlavným dimorfizmom, prítomné v tráviacom trakte hostiteľov, produkujú vysoké množstvo vajíčok, ktoré je vylučované trusom. Týmto spôsobom života zabraňujú prílišnému premnoženiu parazita v danom hostiteľovi a nadlimitnému odčerpávaniu zdroja výživy, čo by mohlo viesť k rýchlemu usmrteniu hostiteľa. Zároveň tak neustále kontaminujú prostredie, ktoré je potom zásadným ohniskom nákazy pre ďalších prežúvavcov a ich odstránenie je obťažné [5]. Priebeh infekcie závisí na druhu parazitov a často vedie k parazitárnej gastroenteritíde (PGE) spojenej so znížením príjmom potravy a absorbovaním živín vedúcou k zhoršenej produktivite zvierat, zníženiu rastu a strate hmotnosti. Bez účinnej liečby môže dôjsť až k úmrtiu hostiteľa [3].



Závažnosť infekcie je ovplyvnená viacerými faktormi súvisiacimi s hostiteľom, parazitom a environmentálnym prostredím [4]:

- Hostiteľ = vek, pohlavie, druh, genetická odolnosť, výživa, zdravotný a imunitný stav.
- Parazit = druh, intenzita infekcie a virulencia parazita.
- Environmentálne faktory = typ vegetácie, ročné obdobie, počasie a podnebie.

Nákaza hospodárskych zvierat predstavuje jedno z ekonomicky najvýznamnejších ochorení. Dopyt po produkcii masa a mliečnych výrobkov sa stále zvyšuje, aby uspokojila požiadavky rastúcej a meniacej sa svetovej populácie, preto infekcie prežúvavcov nematodami sú hlavným obmedzením efektívnej celosvetovej živočíšnej výroby. Prílišné spoliehanie sa na liečbu antihelmintikami vedie k vzniku nematod odolných voči liekom, čo sa považuje za hlavnú prekážku udržateľného chovu hospodárskych zvierat [6]. Pochopenie vplyvu globálnych zmien na epidemiológiu parazitárnych infekcií, ako aj distribúciu, šírenie a príčiny vzniku antihelmintickej rezistencie je základným kameňom pre vytvorenie lepších strategických a integrovaných prístupov kontroly parazitov [3].

## 2.1. *Haemonchus contortus*

*Haemonchus contortus* je celosvetovo najvýznamnejší hematofágný parazit, ktorý infikuje široké spektrum malých prežúvavcov, ale uprednostňuje ovce a kozy. Dospelé červy, nitkovitého tvaru sídlia v sleze hostiteľa, kde sa živia krvou. Samičky dosahujú dĺžky 2-3 cm a samce 1-2 cm. Priemerná dĺžka života červa je približne 50 dní [7, 8].

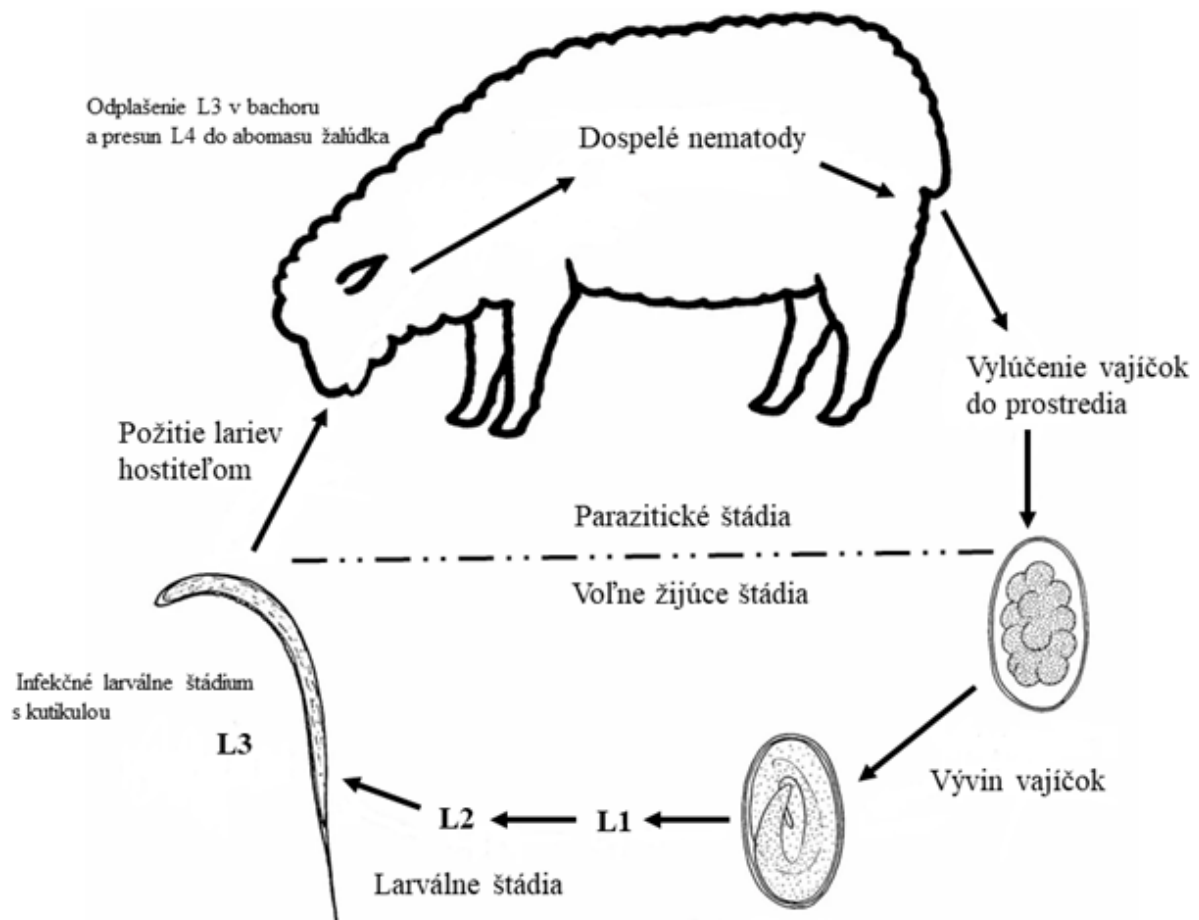


**Obrázok 1.:** Dospelé červy izolované zo slezu ovce.

### 2.1.1. Životný cyklus

*H. contortus* patrí medzi geohelminty, ktoré prechádzajú monoxenným vývojovým cyklom bez prítomnosti medzihostiteľa [5]. Životný cyklus je znázornený na Obrázku 2. Samička vyprodukuje 1300 až 7000 vajíčok za deň, ktoré sa spolu s exkrementami dostávajú do prostredia. Pokiaľ majú vajíčka vhodné podmienky podstupujú vývoj cez viaceré larválne štádia, ktoré sa živia baktériami. Tento vývoj vyžaduje minimálnu teplotu 9 °C a dostatočnú vlhkosť. Krátka vývojová fáza (trvajúca 6 – 16 dní) v kombinácii s vysokou plodnosťou červov umožňuje rýchlu expanziu populácie za optimálnych podmienok. Navyše, *H. contortus* má jedinečnú vlastnosť, ktorá sa týka inhibície endogénneho vývinu, nazývanú hypobioza. Zabezpečuje tak prežívanie lariev za nepriaznivých životných podmienok [8].

*H. contortus* bol najprv považovaný predovšetkým za parazita tropických oblastí, ale vďaka ekologickej prispôsobivosti poskytovanej jeho vysokou úrovňou genetického polymorfizmu a vysokému biotickému potenciálu sa stal prítomný v širšom rozsahu klimatických zón. [9].



Obrázok 2.: Životný cyklus *H. contortus* [4].

### 2.1.2. Haemonchóza

Klinické príznaky haemonchózy sú spojené hlavne s anémiou, ktorá sa vyvíja ako dôsledok kŕmenia sa parazitov krvou. Strata krvi začína vývojom lariev L4, pričom anémia je prvýkrát zistiteľná 10 – 12 dní po infekcii. Jednotlivé dospelé červy odoberajú 30 – 50  $\mu$ l krvi denne. Rozvoj infekcie do značnej miery závisí od rýchlosti a množstva príjmu infekčných lariev a schopností hostiteľa ich odmietnuť alebo nahradiť stratenú krv [7].

V nadväznosti na anémiu a zníženie hematokritu sú pozorovateľne bledé sliznice, hypoalbuminemia a často celkový pokles proteínov. Následne sa telové tekutiny hromadia v oblasti dolnej čeľuste, brušnej a hrudnej dutiny. Okrem toho, parazity narušujú produkciu HCl a zvyšujú pH v žalúdku, čím zhoršujú absorpciu a trávenie potravy. Zviera nahradzuje straty živín zo svojich zásob, čo sa prejavuje stratou hmotnosti, letargiou, zníženou produkciou mlieka a kvality vlny [10, 11].

Podľa priebehu ochorenia môžu byť haemonchózy klasifikované:

- Hyperakútna = 30 000 červov, anémia s hemoragickou gastritídou vedúca k úmrtiu jedinca.
- Akútna = 2 000 – 20 000 červov, postupný nástup anémie.
- Chronická = malé množstvo prítomných červov bez výraznej klinickej manifestácie.

### 2.1.3. Diagnostika

Diagnostika ochorenia je vo všeobecnosti uskutočňovaná na základe klinických príznakov anémie a pozorovaní celkového zdravotného stavu zvierat'a:

- FAMACHA (Dr Faffa Malan - **F**Affa **M**Alan **CH**Art) = analýza jednotlivých stupňov anémie prejavujúcej sa zmenou farby spojivkovej mukózne membrány v okolí očí z tmavo červenej u zdravých ovci, cez odtiene ružovej až k prakticky bielej uskutočnená fotografovaním a určením hematokritu (Obrázok 3.) [12].



Obrázok 3.: FAMACHA test a jeho hodnotiaci systém (*wormx.info*)

Z dôvodu zabezpečenia použitia vhodnej liečby je nevyhnutné identifikovať kľúčový druh parazita zodpovedného za príznaky choroby [4, 7, 13]:

- Morfológická identifikácia = je časovo náročná a vyžaduje skúsený personál.
  - FEC (Fecal egg counts)- test počítania vajícok vo výkaloch hostiteľa.
  - LC (larval culture)- kultivácie výkalov k rozlišovaniu jednotlivých lariev nematod.
  - Post-mortem vyšetrenie - dokázanie dospelého vývojového štádia parazita.
- Molekulárne metódy diagnostiky = identifikácia jednotlivých druhov pomocou genetických markerov v jadrovej ribozomálnej DNA prostredníctvom PCR a jeho modifikáciami predstavuje efektívny spôsob diagnostiky s nutnosťou prístrojového vybavenia.
  - multiplex-tandem PCR [14] – rozlíšenie viacerých druhov nematod pomocou sady primerov špecifické pre jednotlivé druhy označené sondami.
  - LAMP [15] – modifikácia konvenčnej PCR, izotermická kvantifikácia DNA.
  - ddPCR (droplet digital PCR) [16] – metóda využívajúca mikrofluidný čip s možnosťou identifikácie a absolútnej kvantifikácie DNA viacerých druhov nematod.
- Imunologické metódy diagnostiky = detekcia antigénov parazitov prítomných v infikovaných hostiteľoch alebo antiparazitárnych protilátok a buniek sprostredkujúcich imunitné reakcie [13].

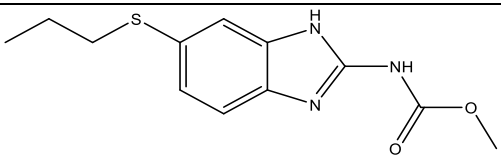
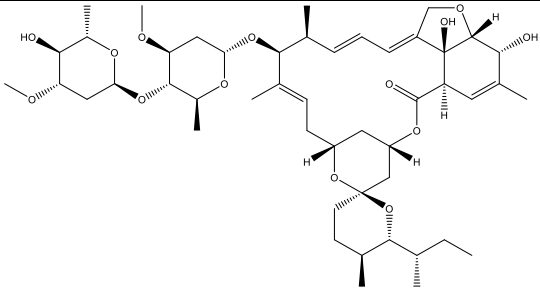
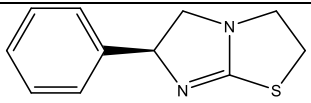
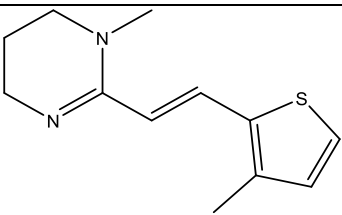
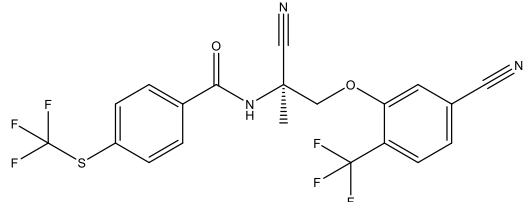
## 2.2. Liečba haemonchózy

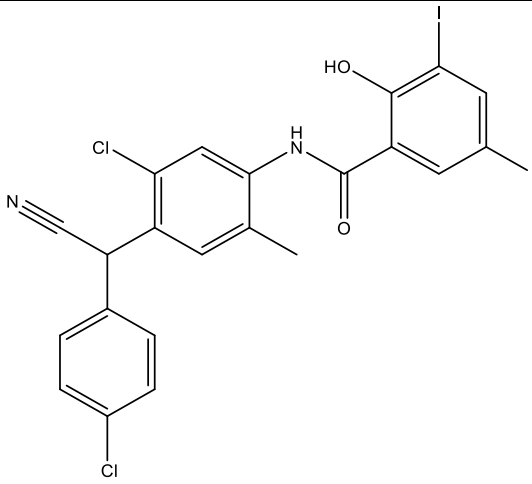
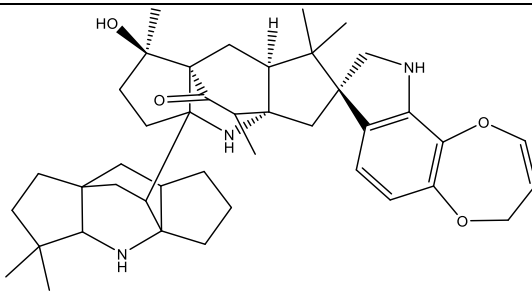
Terapia ochorenia spôsobeného parazitickými nematodami spoľieha prevažne na chemicky založené prístupy využitím anthelmintík. Na zabezpečenie efektívnej liečby je nevyhnutné dosiahnutie účinnej koncentrácie liečiva v miestach lokalizácie parazita počas určitého obdobia na základe jeho fyzikálno-chemických vlastností spolu s farmakokinetickými parametrami anthelmintík. V rámci podpory terapie sa podávajú nakazeným zvieratám aj kombinácie liečiv z rôznych chemických skupín a bioaktívnych fytochemikálii, ktoré podporujú ich anthelmintickú aktivitu alebo zlepšujú stav výživy a imunitnú odpoveď hostiteľov proti infekcii [17].

## 2.2.1. Anthelmintika

Anthelmintika predstavujú široké spektrum liečiv proti infekciám vyvolaných helmintami. Môžeme ich rozdeliť do skupín na základe podobnej chemickej štruktúry a mechanizmu účinku. Jednotlivé skupiny anthelmintík používané na liečbu gastrointestinálnych nematod ako je *H. contortus* sú uvedené v Tabuľke 2. [18, 19].

**Tabuľka 2.:** Najvýznamnejšie skupiny anthelmintík používaných na liečbu GI nematod u prežúvavcov.

Skupina anthelmintík	Vybraný zástupcovia	Chemická štruktúra	Mechanizmus účinku
Benzimidazoly	<b>Albendazol</b> Tiabendazol Fenbendazol Oxibendazol Mebendazol		inhibícia polymerizácie mikrotubulov
Makrocyclické laktony	<b>Ivermektin</b> Abamektin Moxidektin		účinnok na glutamát riadené chloridové kanály
Imidazothiazoly	<b>Levamisol</b>		agonista nikotinového acetylcholinového receptora
Tetrahydropyrimidiny	<b>Morantel</b> Pyrantel		agonista nikotinového acetylcholinového receptora
Aminoacetonitrilové deriváty	<b>Monepantel</b>		agonista nikotinového acetylcholinového receptora

Salicylanilid	<b>Closantel</b>		inhibícia energetického metabolizmu (oxidatívnej fosforylácie)
Spiroindoly	<b>Derquantel</b>		antagonista nikotinového acetylcholinového receptora

Prvé moderné širokospektrálne anthelmintikum, tiabendazol, bolo uvoľnené na komerčné použitie na začiatku 60-tych rokov 20.storočia a ukázalo sa vysoko účinné proti širokému spektru parazitov prežúvavcov vrátane nematod, niektorých trematod a cestod [20]. Od vtedy sa do klinickej praxe dostal rad ďalších zástupcov a aj v súčasnosti sú jednou skupinou z najčastejšie využívaných anthelmintík. Inhibíciou polymerizácie tubulínu, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v mnohých bunčných procesoch (napr. mitóza, motilita, transport), benzimidazoly spôsobujú usmrtenie parazita, pričom vykazujú selektívnu toxicitu vytvorenú silnejšou ireverzibilnou väzbou na tubulín parazita ako hostiteľa [18, 21].

Medzi staršie anthelmintika, vytvorené po benzimidazoloch, patria imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny. Prvým členom bol tetramizol, aminothiazolový derivát vo forme racemickej zmesi [22]. Následnou analýzou sa odhalil L-izomer ako anthelminticky účinnejší a v súčasnosti sa vyrába pod označením levamisol. Levamisol, zároveň s tetrahydropyrimidiny, funguje ako agonista nikotínových neuromuskulárnych spojení u parazitov. Najskôr otvorením a potom blokovaním kationových kanálov sprostredkovaných acetylcholinovým receptorom vedie k spastickej paralýze parazita a jeho vypudeniu z hostiteľa prostredníctvom peristaltiky čriev. Pri vysokých koncentráciách, levamisol môže pôsobiť aj ako nikotínový agonista u cicavcov [19, 21, 23].

Makrocyclické latkony (ML) zahrňujú avermektíny (ivermektin a doramektin) a novšie pripravené milbemyciny (moxidektín). Skupina ML bola vyvinutá koncom 70-tych rokov 20.storočia z fermentačného produktu aktinomycety rodu *Streptomyces spp.* Vyznačujú sa spektrom účinku od endoparazitárnych ochorení (nematóz) po ektoparazitárne (infekcie článkonožcov). Ich mechanizmus účinku je založený na narušení funkcie nervových a svalových buniek zosilneným otvorením glutamátových chloridových kanálov, po ktorom nasleduje hyperpolarizácia bunkovej membrány a svalová paralýza, najmä hltanu parazita [18, 24].

Najnovším významným anthelmintikom vyvinutým v roku 2008 pôvodne proti ovčím nematodam bol monepantel. Pôsobí ako pozitívny alosterický modulátor acetylcholinového receptora špecifického pre nematody a to vedie k ich svalovej paralýze. Účinkuje proti dospelým a nezrelým L4 larválnym štádiám všetkých hlavných GI nematod. Vďaka selektívnemu účinku na parazita nepredstavuje výraznejšie bezpečnostné riziko pre hospodárke zvieratá [25, 26].

Kombinovanie dvoch alebo viac anthelmintík s prekrývajúcim sa spektrom účinku by mohlo viesť k zníženiu toxicity liečiv a zvýšeniu efektívnosti terapie. Dostupné sú rôzne kombinácie benzimidazolov, derqvantel s abamektinom alebo monepantel s abamektinom a ďalšie [17, 27].

### 2.2.2. Ďalšie možnosti terapie a prevencie

Anthelmintika poskytujú kontrolu rozvoja infekcie, ktorá ale častokrát nie je dlhodobou udržateľná a plne účinná. Preto sa stále hľadajú alternatívne stratégie na posilnenie terapie a prevencie. Vo všeobecnosti majú nechemické prístupy výrazne menší okamžitý účinok na populáciu nematod a nie sú určené ako náhrada liečiv, ale môžu znížiť ich frekvenciu a množstvo podávania.

- Šľachtenie dobytká = výber jedincov na základe zvýšenej odolnosti voči GI parazitom sledovaním závažnosti príznakov infekcie po vystavení infekčnými štádiami nematod [28].
- Pastviny = rozdelením pastvín na menšie plochy sa dobytok na niekoľko dní až týždňov sústreďuje na menšej ploche pastvín a potom presunie na inú časť s cieľom minimalizovať príjem infekčných lariev nematod a zabrániť nadmernej kontaminácii pastvín [29].

- Výživa = prežúvavce si vyvinuli do určitej miery obranyschopnosť (fyzické bariéry, imunologické mechanizmy, fyziologické odpovede), ktorú je potrebné podporiť príjmom živín (suplementácia proteínmi, minerálnymi a stopovými prvkami) z vonkajšieho prostredia. Tieto živiny zlepšujú reakcie hostiteľa a jeho reguláciu poškodenia spojeného s prítomným parazitom (udržanie homeostázy a produkcie). Ako doplnok stravy môžu slúžiť aj rastlinné extrakty obsahujúce sekundárne metabolity s anthelmintickým účinkom, napr. kondenzované taníny [30].
- Nematofagne huby = *Duddingtonia flagrans* je huba schopná tvoriť chlamydospory, ktoré môžu byť pridané do krmiva a prechádzať gastrointestinálnym traktom, následne klíčiť a rásť vo výkaloch, kde zachytávajú a eliminujú larvy nematod [31].
- Vakcíny = v priebehu niekoľko desaťročí sa uskutočnilo množstvo testov pri hľadaní účinnej vakcíny proti *H. contortus* a bez ohľadu na použitie viacerých prístupov na testovanie mnohých antigénov sa nedokázalo, že by niektorá z nich úplne eliminovala alebo zastavila prenos parazita. Od vakcíny sa vyžaduje, aby minimalizovala produkciu dospelých červov ako aj redukovala množstvo infekčných lariiev alebo usmrtila etablovaných červov. Vývoj vakcín komplikuje genetická diverzita v populácii parazita vrátane rôzneho antigénneho profilu v priebehu vývojových štádií [32].

Medzi niektoré vyvíjané a testované vakcíny patria:

- glykoproteínové komplexy = získané z čreva *H. contortus* H-gal-GP a H11 obsiahnuté v komerčne dostupnej vakcíne Barbevax, ktorá vyžaduje pravidelné podávanie počas celého obdobia ohrozenia parazitmi, pretože nedochádza k prirodzenému posilneniu imunitnej odpovede hostiteľa [33].
- DNA vakcíny = dodanie geneticky upravenej DNA špecifického antigénu tak, aby imunitné bunky mohli byť priamo vystavené vytvorenému antigénu, výsledkom čoho vzniká široké spektrum imunitných reakcií, napr. vakcinácia s DNA antigénom H11 a interleukinom IL-2 [34].
- Exkrečné/sekrečné proteínové vakcíny (HcESP) = skupina antigénov ES získaných z *H. contortus* schopná vyvolať u hostiteľa imunitnú odpoveď [35].
- Zmes rekombinantných proteínov = s cieľom zjednodušiť komplexnosť a prípravu antigénnych vakcín sú potenciálne imunomodulačné proteíny pripravené expresným bunecným systémom [36].



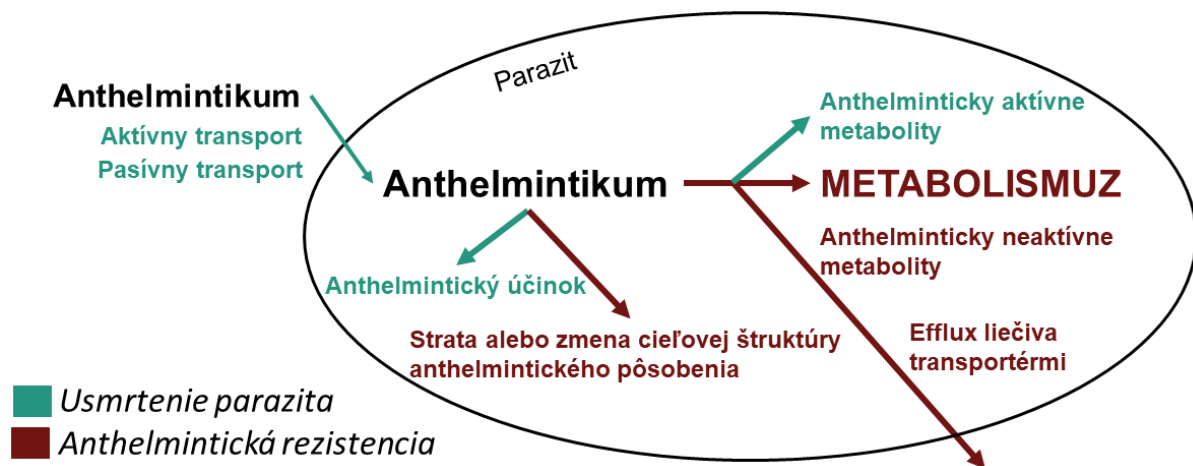
## 2.3. Anthelmintická rezistencia

Antihelmintickú rezistenciu možno definovať ako významný nárast v populácii jednotlivých nematod schopných tolerovať dávky liečiva, ktoré sa ukázali ako smrteľné pre väčšinu jedincov rovnakého druhu. *H. contortus* je jedným z najrozsiahlých študovaných nematodou s ohľadom na rezistenciu, pretože preukázal schopnosť vyvinúť určitú odolnosť voči všetkým používaným triedam liečiv v priebehu niekoľko rokov od ich zavedenia [37]. Rezistencia na anthelmintika u tohto druhu bola prvýkrát popísaná v roku 1957, kedy bol *H. contortus* dlhodobo vystavený liečivu fenotiazinu [38]. Faktory, ktoré zásadne ovplyvňujú vznik rezistencie súvisia s druhom parazita, hostiteľa alebo celkovým riadením kontroly liečby a prevencie na farme [39, 40]:

- Genetická diverzita a fyziológia parazita = niektoré parazity majú biologické vlastnosti, ktoré uprednostňujú rýchlejšiu tvorbu alel rezistencie, ako sú priamy a krátky životný cyklus bez medzihostiteľa, vysoká plodnosť a infekčnosť.
- Komplexná profylaktická liečba celého stáda = častá aplikácia rovnakej skupiny anthelmintík podporuje rozvoj rezistencie na danú skupinu liečiv.
- Terapeutická dávka anthelmintika = úspešná liečba vyžaduje podanie správneho liečiva v terapeutickú dávku viazanú na hmotnosť jedinca a ovplyvnenú farmakokinetikou liečiva, inak by dochádzalo k podávaniu subletálnych dávok, ktoré vytvárajú selekčný tlak na prežitie odolnejších parazitov a zvyšujú rýchlosť rozvoja rezistencie [17].

### 2.3.1. Mechanizmus

Na vzniku rezistencie sa podieľajú rôzne mechanizmy (Obrázok 4.). Jedným z nich sú špecifické mechanizmy v spojitosti s farmakodynamickými vlastnosťami liečiva prejavujúce sa zmenou cieľovej molekulárnej štruktúry spôsobenej najčastejšie mutáciami DNA s následným zabránením naviazaniu liečiva a jeho účinku. Špecifické mechanizmy rezistencie proti rôznym triedam liečiv, ktoré najzásadnejšie ovplyvňujú účinok liečiva, sa vo všeobecnosti líšia a preto si konkrétna trieda môže zachovať aktivitu proti červom odolným voči inej triede liečiv (Tabuľka 3) [37]. V prípade benzimidazolových anthelmintík sa v rezistentných červoch vyskytujú mutácie SNP (single nucleotide polymorphisms) v troch kodónoch (167, 198, a 200)  $\beta$ -tubulínu, ktoré následne zmenia priestorovú štruktúru vzniknutého proteínu  $\beta$ -tubulínu [41]. Avšak, nie všetky nematody rezistentné na benzimidazoly vykazujú tieto polymorfizmy a podporujú tým zapojenie ďalších mechanizmov rezistencie [42].



**Obrázok 4.:** Schematické znázornenie rôznych faktorov a mechanizmov, ktoré by mohli ovplyvniť pôsobenie anthelmintika a viesť buď k usmrteniu parazita alebo k rezistencii (upravené z [37]).

Farmakokineticky nešpecificky sprostredkované mechanizmy zahrňujú zmeny hladiny enzýmov zapojených do metabolizmu alebo transportu liečiva a následne tak modulujú koncentráciu liečiva, ktoré dosiahne cieľové miesto na receptore. Mechanizmy zmeny koncentrácie účinného liečiva sa niekedy označujú ako nešpecifické, pretože môžu ovplyvniť liečivá z rôznych tried chemických látok a spôsobov účinku [37, 43].

Na druhej strane, komplexnosť problému anthelmintickej rezistencie podtrhuje fakt, že špecifické a nešpecifické mechanizmy môžu byť spoločným dôvodom vzniku rezistencie u určitého liečiva. Príkladom je rezistencia na levamisol, ktorá vzniká geneticky podmienenou zmenou štruktúry acetylcholinového receptora a zároveň v menšej miere so zvýšenou aktivitou transportu liečiva sprostredkovanú P-glykoproteínom [44]. Okrem toho, celosvetovo sa objavuje multirezistencia na viac tried anthelmintík súčasne v jednotlivých populáciách nematod, z dôvodu schopnosti tvorby genetických mutácií a kombinácie rôznych mechanizmov rezistencie [11, 45].

V súčasnej dobe sa v našom výskume používajú kmene (resp. varianty) *H. contortus* s rôznou úrovňou rezistencie. Kmeň citlivý na všetky anthelmintika ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) bol vyizolovaný v období pred nasadením väčšiny anthelmintík [46]. Vystavením tohto kmeňa selekčnému tlaku bezimidazolov vznikol rezistentný kmeň IRE (Inbred Resistance Edinburgh). Taktiež je používaný kmeň WR (White River), ktorý ma iný genetický podklad, pretože bol získaný z fariem v Juhoafrickej republiky a vykazuje multirezistenciu na benzimidazolové anthelmintika, ivermektin a closantel [47].

**Tabuľka 3.:** Vývoj a predpokladaný mechanizmus rezistencie na hlavné triedy anthelmintík používaných proti GI nematodam u prežúvavcov [37, 40, 48]

Vybrané skupiny anthelmintík	Uvedenie na trh	Detekcia rezistencie	Predpokladaný mechanizmus rezistencie
<i>Benzimidazoly</i> Tiabendazol Albendazol	1961 1972	1964 1983	- mutácia SNP v géne $\beta$ -tubulínu, <i>substitúcia fenylalanínu a tyrozínu</i> <i>F200Y, F167Y</i> <i>substitúcia alanínu a glutámovej kyseliny</i> <i>E198A</i>
<i>Makrocyclické laktóny</i> Ivermectin Abamectin	1981 1985	1988 2001	- nie je úplne vysvetlená – možná úloha glycinového zvyšku v glutamat-chloridovom kanály, - polymorfizmus a zvýšenie expresie génov P-glykoproteínu
<i>Imidazothiazol</i> Levamisol	1970	1981	- mutácia a zmeny expresie génov kódujúcich podjednotky nikotín acetylcholinového receptora vedúce k zmene citlivosti a štruktúry receptora <i>(Hco-unc-63a, Hco-unc-29.3, atď.)</i>
<i>Aminoacetonitrilové derivaty</i> Monepantel	2008	2013	- mutácia génov podjednotky nikotín acetylcholinového receptora <i>(Hco-des-2H, Hco-acr-23H, Hco-MPTL-1)</i>

### 2.3.2. Diagnostika rezistencie

Rastúci problém anthelmintickej rezistencie viedol k zvýšenej potrebe spoľahlivých a štandardizovaných metód detekcie populácie červov so zníženou citlivosťou na liečivá v rutínnej terénnej diagnostike. Medzi najčastejšie používané metódy patria:

- *in vivo* test = FECRT (faecal egg count reduction test) používaný ako štandardný test na stanovenie rezistencie po celé desaťročia. Je založený na porovnaní počtu vajícok parazitov vo výkaloch pred liečbou a v definovaných časoch po ošetrení. Následne sa v liečbe môže pokračovať, ak zníženie počtu vajícok je väčšie ako 95 %, pretože je liečba účinná [49].
- *in vitro* test = vplyv radu koncentrácií anthelmintika na určité štádium parazita alebo jeho vývin.
  - EHT (egg hatch test) = test liahnutia vajícok u ovocidných látok, (napríklad populácia parazita je rezistentná na tiabendazol, ak sa nevyvinie 50 % vajícok po ich vystavení koncentrácií liečiva  $>0,1 \mu\text{g/ml}$ )
  - LDT (larval development test) = stanovuje účinky liečiva na vývoj vajícok až po infekčné larválne štádium L3.
  - Larválny motilitný/migračný test = efekt liečiva sa stanovuje buď určením pohyblivých a nepohyblivých červov alebo sa pozoruje ich schopnosť migrovať cez mriežku.
- molekulárne testy = vzhľadom k tomu, že rezistencia má genetický základ, využitie molekulárnych technológií na identifikáciu rezistentných alel je najspoľahlivejšia metóda rozlíšenia jednotlivých citlivých a rezistentných populácii nematod. Avšak, špecifickosť reagensov používaných pre tieto účely spoločne s prístrojovými nákladmi obmedzujú ich použitie v rutínnej diagnostike [50].

### 2.3.3. Prevencia

Medzi preventívne opatrenia patria vhodná stratégia pastvy za účelom redukcie kontaminácie, podpora výživy zvierat, prísne karanténne opatrenia u nových prírastkoch, podávanie anthelmintika len v prípade potreby a monitorovanie účinnosti terapie na odhalenie prípadnej rezistencie s následnou zmenou stratégie ošetrovania. Každá z možností prevencie by mala byť využitá, aby sa minimalizovalo použitie anthelmintických liečiv a predišlo sa tak rozvoju rezistencie [51].

### 3. Biotransformácia anthelmintík

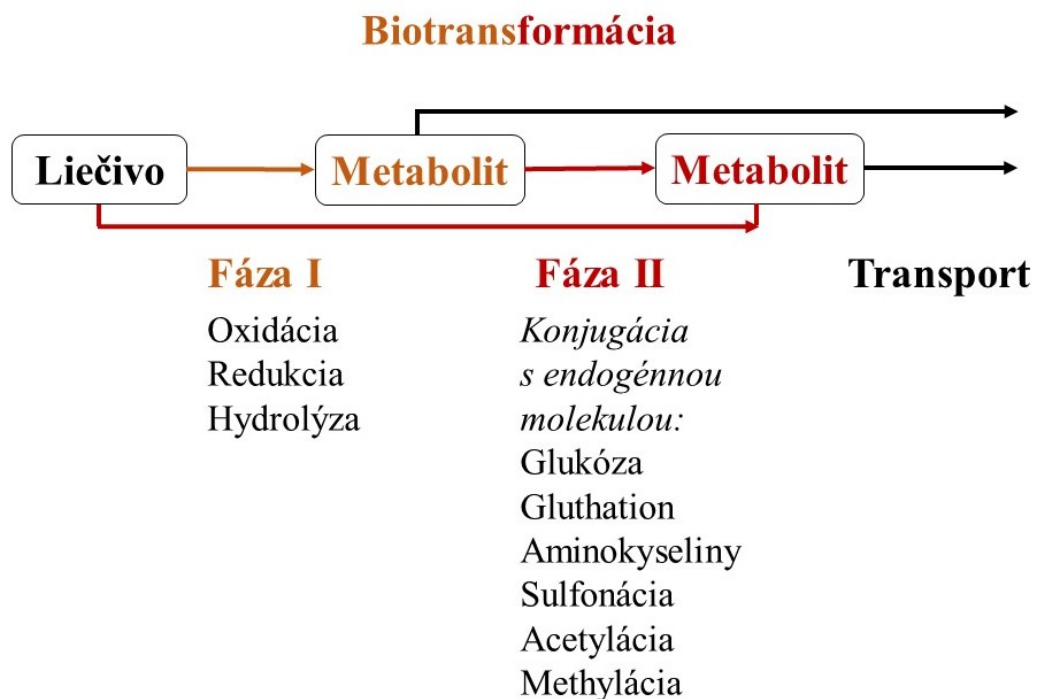
Parazity, rovnako ako ostatné organizmy sú vystavené cudzorodým látkam, xenobiotikam, ktoré neslúžia organizmu ani ako zdroj energie, ani na syntézu biomolekúl. Ako xenobiotika sú označovane napríklad sekundárne metabolity rastlín, potravinárske prísady, látky znečisťujúce prostredie a v neposlednom rade liečivá. V dôsledku toho, si organizmy vytvorili obranné mechanizmy voči prípadným toxickým účinkom xenobiotík. Detoxikačné procesy sú založené na obmedzení vstupu do ďalších orgánov alebo tkanív a eliminácií xenobiotík, ktorá často závisí od ich premeny na polárne látky a následne na ich transporte z organizmu. V rámci chemickej modifikácie xenobiotika, biotransformačné enzýmy katalyzujú reakcie vedúce k vzniku produktov, označovaných metabolity. Metabolity si môžu zachovať biologické účinky vrátane toxicity, ale vo väčšine prípadov dochádza k ich zmene, redukcii alebo strate. Následne sú metabolity ľahšie vylučované z organizmu pomocou transportérov [52, 53].

Biotransformačné enzýmy a transportéry môžu do určitej miery chrániť parazity pred toxickými účinkami liečiv. Časté podávanie farmakologicky aktívnych látok zvyšuje aktivitu enzýmov u hostiteľa a dochádza k zníženiu plazmatických hladín liečiva. Dôsledkom je zlyhanie terapie, pretože sa zvyšuje šanca parazitov na prežitie po aplikácii liečiv. Napríklad, kontakt parazitov s nízkymi dávkami liečiva albendazolu spôsobil indukciu génovej expície enzýmov a zvýšenie ich aktivity u parazita, čo viedlo k zvýšenej metabolizácii liečiva [54, 55].

Aktivita enzýmu závisí na rýchlosti jeho syntézy a degradácie, reakčných podmienkach, prítomnosti a koncentrácii substrátu, kofaktorov, modulátorov (tj. inhibítorov a aktivátorov). Pokým k zníženiu ich aktivity vedie prítomnosť inhibítora, ktorý sa často viaže na enzým, tak k zvýšeniu aktivity enzýmov účinkom induktora väčšinou dochádza zvýšením syntézy mRNA s následnou tvorbou špecifického enzýmu. Nukleárne hormonálne receptory (NHR) zohrávajú ústrednú úlohu pri regulácii reakcie na xenobiotikum a pôsobia na transkripčné faktory, ktoré ovplyvňujú expresiu génov [56, 57]. Napríklad, NHR-8 sa podieľa na metabolizme xenobiotík v nematode *C. elegans* a bol identifikovaný ako regulátor tolerancie voči ivermektínu (IVM). Mutanty *C. elegans* bez funkčného alebo s utlmeným receptorom podrobené testom vývoja lariev a elektrofaryngeogramovým meraním vykazovali precitlivosť na IVM a taktiež boli zistené znížené hladiny transkriptov niekoľkých génov biotransformačných enzýmov a transportérov. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj u *H. contortus* utlmením NHR-8 pomocou RNA interferencie [58].

Liečivo podlieha biotransformácii na základe jeho fyzikálno-chemických vlastností v rámci jednej alebo viacerých fáz (Obrázok 5.). V 1. fáze biotransformácie dochádza k vneseniu alebo odkrytiu funkčnej skupiny, pokým v 2. fáze je metabolit konjugovaný s endogénnou molekulou a výsledný produkt je vylúčený z organizmu. Transport liečiva a jeho metabolitov je niekedy označovaný ako 3. fáza, ktorú zaisťujú napríklad ABC transportéry [59].

ABC transportéry, ako je P-glykoprotein (P-gp) predstavujú rodinu membránových proteínov, ktorých hlavná funkcia je ATP-depentný transport cez bunkové membrány množstva zlúčenín vrátane širokého spektra liečiv. Podľa všetkého prispievajú aj k rezistencii makrocyclických latkonov ako je IVM. Vystavením *H. contortus* dochádzalo nielen k zvýšeniu expresie P-gp génov, ale bolo detekované prehĺbenie účinku IVM v prípade utlmenia génov P-gp zodpovedných za IVM transport v *C. elegans* [60-62]. Navyše, zvýšený efekt IVM na *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Cooperia spp.* bol pozorovaný pri kombinácii IVM s P-gp substrátom loperamidom [63, 64] Na druhej strane, v prípade benzimidazolového anthelmintika flubendazol zapojenie P-gp do transportu nebolo zistené ani v citlivom ani v rezistentnom kmeni *H. contortus* [65].



**Obrázok 5.:** Jednotlivé fázy biotransformácie liečiv.

### 3.1.1. Fáza I.

Reakcie 1. fázy biotransformácie zahrňujú hydrolýzu, redukciu a oxidáciu xenobiotík, ktoré odhaľujú alebo zavádzajú funkčnú skupinu (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH alebo -COOH) a zvyčajne vedú len k malému zvýšeniu hydrofilnosti xenobiotík. Tieto funkčné skupiny sú následne často miestami priebehu 2. fázy biotransformácie [52].

Oxidačné reakcie uskutočňuje hlavne nadrodina enzýmov cytochrom P450 (CYP). Avšak na tvorbe oxidačných metabolitov sa podieľajú aj flavín-monooxygenasy (FMO), alkohol- a aldehyd-dehydrogenasy, monoaminoxigenasy a ďalšie antioxidantné enzýmy. Veľké množstvo týchto enzýmov bolo nájdených v genómoch rôznych druhov helmintov [53, 54], pričom ich expresia je ovplyvnená vývojovým štádiom helminta [66] a môže byť indukovaná prítomnosťou anthelmintík [61].

Benzimidazoly podliehajú dvojstupňovej S-oxidácii, počas ktorej tvoria sufoxidy a sulfony. V porovnaní s pôvodným liečivom ako je napríklad albendazol, sulfoxidy majú nižšiu anthelmintickú aktivitu, pričom sulfony úplne strácajú účinnosť. Tato biotransformácia je pozorovaná nielen u prežúvavcov [67], ale aj u parazitických nematod *H. contortus* [68] a u voľne žijúcej nematody *C. elegans* [69]. Dokonca bola zistená zvýšená produkcia metabolitov albendazolu [68] a fenbendazolu [70] u rezistentných kmeňov nematod. Okrem benzimidazolov, *H. contortus* metabolizuje monepatel, kedy je monepatel-sulfoxid formovaný len u multirezistentného kmeňa [71].

Metabolizmus anthelmintík je pozorovaný aj u iných kmeňoch helmintov. Trematoda *F. hepatica* vlastní menšie množstvo CYP génov ako nematoda *H. contortus* [72], avšak tiež u nej prebieha oxidácia triklabendazolu vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch [73]. Navyše, metabolické inhibítory znižujú úroveň biotransformácie anthelmintík a zlepšujú ich aktivitu, ako ukazujú inkubácie benzimidazolu triklabendazolu s methimazolom [74], piperonyl butoxidom [75], ketoconazolom [76]. Podobný efekt inhibítora CYP piperonyl butoxid na vývoj gastrointestinálnych nematod *Cooperia oncophora* a *Ostertagia ostertagi* bol sledovaný v kombinácii s tiabedazolom alebo ivermektínom, kedy došlo k prehĺbeniu účinku anthelmintík. Avšak, tento efekt mohol byť podporený aj inhibičným účinkom piperonyl butoxidu na esterasy [77].

Hoci je oxidácia považovaná za majoritnú reakciu 1. fázy biotransformácie, hydrolýza esterov a amidov v xenobiotikách je tiež pomerne bežná u helmintov. Okrem toho, aldo-ketoreduktasy a dehydrogenasy/redukasy s krátkym alebo stredne dlhým reťazcom katalyzujú redukciu xenobiotík. Ich deaktivujúci účinok zabraňuje toxickému pôsobeniu aldehydov a

ketónov a zároveň napomáha k mareniu účinku niektorých anthelmintík [54]. Konkrétne u *H. contortus* bola skúmaná redukcia flubendazolu [78] a u *F. hepatica* zase redukcia triklabendazolu [79] v spojitosti s anthelmintickou rezistenciou.

### 3.1.2. Fáza II.

V 2. fáze biotransformácie môžu xenobiotika alebo metabolity 1. fázy podstúpiť konjugačné reakcie s endogénnymi látkami. Pre priebeh reakcie je nutné dodanie energie, preto sa endogenná zlúčenina pred konjugáciou aktivuje makroergným faktorom. Enzýmy tejto fázy majú významnú úlohu pri biotransformácii xenobiotík na ľahšie vylúčiteľne formy ako aj pri metabolickej inaktivácii farmakologicky aktívnych látok. Patria sem prevažne transferasy: UDP-glykosyltransferasa, sulfotransferasa, N-acetyltransferasa, glutathion-S-transferasa a rôzne methyltransferasy [80].

Konjugačné reakcie sú v porovnaní s 1. fázou biotransformácie študované u helmintov menej, aj keď v genóme rôznych helmintov boli transferasy identifikované [53, 54]. Glutathion-S-transferasa (GST) je preto ďalším enzýmom zapojeným do rezistencie metabolizmu anthelmintík. Jej aktivity sú väčšie v triklabendazole rezistentných kmeňoch *F. hepatica* [81]. Avšak, len málo informácií je o vzťahu medzi aktivitou a liekovou rezistenciou u nematod. Na druhej strane, upregulácia GST viedla k zvýšenej odolnosti voči vysychaniu lariev *H. contortus*, ako aj oxidačnému stresu u *C. elegans*. Taktiež zastáva úlohu v imunitných reakciách medzi hostiteľom a helmintom, čo sa využíva pri tvorbe vakcín [53].

Pre 2. fázou biotransformácie liečiv u helmintov ma význam aj konjugácia s glykosidmi. *H. contortus* takto metabolizuje anthelmintika albendazol, flubendazol na N- a O-glykosidy vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch [54, 68], pričom rovnaké metabolity boli pozorované aj u *C. elegans* [69]. Produkcia glykosidových metabolitov benzimidazolov v *C. elegans* bola taktiež znížená v prítomnosti inhibítora chryzínu. Navyše, ako krok k identifikácii enzýmov potenciálne zodpovedných za biotransformáciu benzimidazolov bola charakterizovaná transkripčná odpoveď UGT génov na prítomnosť liečiva, čo poukázalo na indukciu niektorých z nich [82].

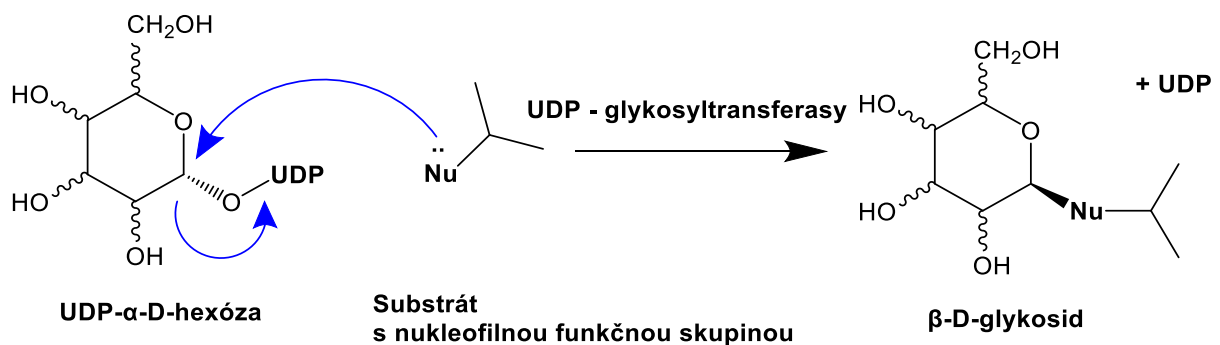


### 3.2. UDP-glykosyltransferasy (UGT)

Glykosyltransferasy (GT) katalyzujú prenos monosacharidových jednotiek zo zvyčajne nukleotidom aktivovaného donoru na špecifické akceptorové molekuly, ako sú lipidy, sacharidy, proteíny, čo vedie k vytvoreniu glykosidickej väzby. Tieto transferasy zodpovedajú za väčšinu reakcií prenosu glykosylu, kedy je rozsah akceptorov veľmi rôznorodý, ale donory sú obmedzené na monosacharidy, prevažne hexózy, spojené s nukleosidmonofosfatovou alebo nukleosiddifosfatovou odstupujúcou skupinou, ako je uridíndifosfat (UDP), guanosindifosfat (GDP) a cytidinmonofosfat (CMP). Z nich UDP-glykosyltransferasy (UGT) predstavujú viac ako 60% všetkých charakterizovaných glykosyltransferas [83].

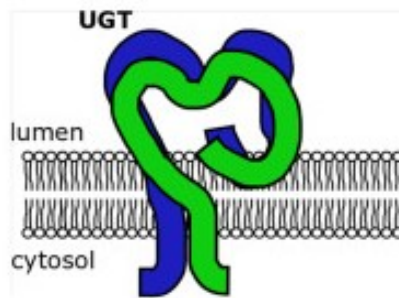
Na základe analýzy aminokyselínových sekvencií a identifikovaných 3D štruktúr rozdeľujeme glykosyltransferasy do dvoch základných priestorových štruktúr, GT-A a GT-B. GT-A enzýmy pozostávajú z dvoch samostatných, ale úzko spojených  $\beta/\alpha/\beta$  domén a pre svoju katalytickú funkciu potrebujú dvojmocné kovové ióny. Väčšina prokaryotických glykosyltransferas patrí do tejto skupiny. Na rozdiel od GT-A, enzýmy GT-B majú konzervatívnejšiu štruktúru obsahujúcu dve samostatné Rossman-like  $\beta/\alpha/\beta$  domény so spojovacou oblasťou, ktorá funguje ako katalytické miesto a nie sú závislé na prítomnosti kovových iónov, i keď môžu stimulovať aktivitu týchto enzýmov [84, 85].

Podľa prítomnosti zmeny konfigurácie na anomernom uhlíku v molekule hexózy počas reakcie môžeme GT klasifikovať ako inverzné (inverting) alebo retenčné (retaining). Hoci tieto katalytické mechanizmy reakcie sú možné, viac študovaný a charakterizovaný je inverzný mechanizmus, pri ktorom dochádza k prenosu hexózy z kosubstrátu UDP- $\alpha$ -D-hexózy na nukleofilnú skupinu, ako sú napr. hydroxylové, amino alebo karboxylové funkčné skupiny, lipofilnej molekuly substrátu za vzniku  $\beta$ -D-glykosidu, konjugátu aglykonu substrátu s hexózou (Obrázok 6.) [86].



**Obrázok 6.:** UDP-glykosyltransferasy katalyzujú prenos hexózy z UDP-aktivovanej hexózy na nukleofilnú skupinu lipofilnej molekuly substrátu za vzniku  $\beta$ -D-glykosidu.

UDP-glykosyltransferasy sú približne 530 aminokyselín dlhé proteíny, ktoré majú signálnu sekvenciu (20 aminokyselín) na N-konci smerujúcu proteín do endoplazmatického retikula (ER). Po integrácii do membrány je signálna sekvencia odštiepená a tieto enzýmy podliehajú aj ďalším posttranskripčným modifikáciám [87]. Variabilná časť N-konce enzýmu sa viaže na aglykon substrátu, a tak určuje substrátovú špecifitu. Na druhej strane, konzervatívny C-koniec obsahuje okrem oblasti viažucej kosubstrát s hexózou, aj sekvenciu 44 aminokyselín, ktorá je zdieľaná naprieč rôznymi organizmami. Na samom C-konci proteínu je potom transmembránový helix s hydrofóbnou oblasťou slúžiacou ako kotva proteínu v ER a krátkym cytoplazmatickým segmentom [88]. Pokým stavovce a bezstavovce zvyčajne obsahujú transmembranovú doménu, bakteriálne a rastlinné UGT sú prítomné v cytosole [89]. Komplikovanosť štruktúry a fungovania UGT podtrhuje schopnosť UGT vytvárať oligomery [90]. Taktiež interakcia UGT s ďalšími proteínmi, ako je napríklad cytochrom P450, môže mať výrazný vplyv na aktivitu UGT [91].



**Obrázok 7.:** Model topológie enzýmu UGT v endoplazmatickom retikulu ER vrátane naznačenia potenciálu dimerizácie proteínu [87].

Enzýmy UGT možno klasifikovať do rodín na základe sekvencnej podobnosti. Pokým rodiny UGT vykazujú ~ 45% alebo väčšiu identitu aminokyselínovej sekvencie, podrodiny UGT aspoň ~ 60%. Pre alelické varianty rovnakého génu možno nájsť takmer 100% zhodu sekvencie. Percentuálne hraničné hodnoty identity sa považujú za usmernenia, pričom dodržiavanie týchto limitov má tendenciu sa časom meniť v snahe zoskupiť podobné rodiny a podrodiny, pretože počet dostupných sekvencií rastie. Zostavovaniu jednoznačných názvov génov UGT sa venuje UGT Nomenclature Committee ([UGT Committee Home \(wsu.edu\)](http://www.wsu.edu/UGT)).



**Obrázok 8.:** Nomenklatúrny systém nadrodiny UGT [92].

UGT enzýmy sú zodpovedné za metabolizmus množstva chemikálií v prostredí vrátane liečiv a toxínov, ako aj endogénnych signálnych molekúl, vďaka čomu udržuju zdravé fungovanie tkanív. U cicavcov boli identifikované 4 rodiny: UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. Konkrétne u ľudí bolo v rámci týchto rodín nájdených 22 UGT. Členovia UGT1 a UGT2 primárne používajú kyselinu UDP-glukuronovú v glykosidačných reakciách. Na rozdiel od toho, členovia UGT3 využívajú UDP-glukózu, UDP-xylózu, UDP-N-acetylglukosamin a UGT8 výlučne UDP-galaktózu. Enzýmy z rodiny UGT3 a UGT8 môžu konjugovať hlavne endogénne substráty. Avšak, UGT1A1 je najznámejšia pre svoju úlohu pri eliminácii primárneho endogénneho substrátu bilirubínu. Mutácie vedúce k nefunkčnosti tohto enzýmu spôsobujú hyperbilirubinému, klasifikovanú ako Criglerov-Najjarov alebo Gilbertov syndróm, pričom ťažká forma môže viesť až k smrti. Na druhej strane, schopnosť UGT konjugovať karcinogény ako aj endogénne molekuly podporujúce rakovinu, ako sú steroidné hormóny, by mohli ovplyvniť riziko vzniku alebo progresiu rakoviny [93, 94]. Pokým väčšina UDP-glykosyltransferas stavovcov spolieha na prítomnosť kyseliny UDP-glukuronovej v reakcii, u bezstavovcov sú využívané prevažne iné UDP-aktivované hexózy, ako je UDP-glukóza [89]. V porovnaní s cicavcami sú konkrétne funkcie jednotlivých UGT u bezstavovcov menej charakterizované, aj vďaka tomu, že rodiny UGT sú v týchto organizmoch rozsiahlejšie a hrajú úlohu v rôznych fyziologických procesoch [95].

Zapojenie UGT do biotransformácie xenobiotík umožňuje rýchlejšiu a účinnejšiu elimináciu xenobiotík z organizmu, čím poskytujú ochranu organizmu pred ich dlhodobejším pôsobením. Preto sú UGT študované i z hľadiska ich možného zapojenia do vzniku rezistencie na liečiva či iné xenobiotika.

V súčasnosti sa rozširuje rezistencia hmyzu na insekticídy, pričom výskum týchto organizmov je podporený jednoduchosťou uskutočnenia experimentov súvisiacich s UGT. Na úrovni génu je výskum prevažne postavený na prvotnom vytipovaní konkrétnych UGT hrajúcich úlohu v mechanizme rezistencie stanovením konštitutívnej expície génov v citlivom a rezistentnom kmeni a následným sledovaním zmien v úrovni transkripície UGT génov po vystavení liečivám. Mnohé výsledky ukázali indukovanosť UGT vystavením hmyzu insekticídom. Napríklad, chlorantraniliprol indukoval expíciu UGT2B1, čo viedlo k zníženiu úmrtnosti *Plutella xylostella* [96]. Ďalšie insekticídy, cypermetrín, phoxim a chlorfenapyr, zase indukovali expíciu štyroch UGT v parazitických osách *Meteorus pulchricornis* [97]. Jedným z následných testov pomáhajúcim pri overení funkcie vybraných UGT v metabolizme liečiv je utlmenie génov prejavujúcou sa úplnou inhibíciou syntézy danej UGT a zvyčajne vedie

k zvýšenej úmrtnosti rezistentných kmeňov po podaní liečiv s rôznymi chemickými štruktúrami. Najčastejšie je tato metóda uskutočnená u hmyzu a testovaná s rôznymi insekticídmi, napr. tiametoxamom v *Aphis gossypii* [98], imidaclopridom v *Leptinotarsa decemlineata* [99] a chlorantraniliprolom v *Plutella xylostella* [96]. Na proteínovej úrovni, prostredníctvom stanovenia motility alebo životnosti testovaných organizmov vystavených nielen liečivám, ale aj špecifickým inhibítorm UGT súčasne, môže byť potvrdené spojenie aktivity rodiny UGT s účinnosťou liečby. Inhibítory UGT 5-nitrouracil (NU), 4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidin (DNP) a sulfínpyrazon (SP) sa často používajú. U hmyzu *Aphis gossypii* SP a 5-NU významne zvýšili toxicitu tiametoxanu v rezistentnom kmeni [98] a v prípade *Diaphora citri* zvýšili toxicitu chlorantraniliprolu [96]. Navyše, meranie *in vitro* UGT aktivity môže byť uskutočnené rekombinantne pripravenými UGT. Zapojenie UGT201D3 do liekovej rezistencie v *Tetranychus cinnabarinus* bolo takto potvrdené detekovaním metabolitov abamektinu produkovaných rekombinantne pripravenou UGT201D3 v *E.coli* [100].

Na rozdiel od hmyzu je výskum významu UGT v liekovej rezistencie v ďalších bezstavovcoch, ako sú nematody orientovaný na metabolické štúdie. Stanovením metabolických dráh anthelmintík boli zistené glykosidové metabolity vo zvýšenej miere v rezistentných kmeňoch [68, 71]. Inkubácie *C. elegans* s anthelmintikami albendazol, mebendazol, tiabendazol a oxfenbendazol ďalej ukázali zvýšenú expresiu niekoľkých UGT, pričom niektoré z nich sú zdieľané s *H.contortus*. Tieto výsledky poukazujú na podobnú biotransformačnú odpoveď týchto nematod [82]. Okrem toho, genetická manipulácia s *ugt-22* spojenou s transkripčným faktorom SKN-1 v *C. elegans* odhalila jej zapojenie do účinnosti anhelmintika albendazol [101]. Taktiež, utlmenie expresie génu *Bm-UGT* viedlo k zníženiu motility a metabolizmu nematody *Brugia malayi*. Pokles motility červov *Brugia malayi* bol dosiahnutý aj kombináciou inhibítora sulfínpyrazonu a albendazolu, čo potvrdzuje predĺžený účinok anthelmintika [102]. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj u lariev *H. contortus* pri kombinácii UGT inhibítorm a liečiva naftalofos [103].

Glykosidácia je jeden z mechanizmov prispievajúcich k rozvoju rezistencie a zmeny exprese UGT spolu s detekovaním metabolizmov liečiv v rôznych rezistentných kmeňov organizmov vo zvýšenej miere to potvrdzujú. Ďalší výskum UGT pravdepodobne vrhne nové svetlo na mechanizmy liekovej rezistencie, čím posunie pokrok smerom k účinnej liečbe helmitóz.

## 4. Ciele práce

Hlavným cieľom tejto práce bolo rozšíriť poznatky k problematike rozvoja rezistencie v parazitickej nematode *H. contortus* so zameraním na charakterizáciu rodiny enzýmov UDP-glykosyltransferas (UGT) a ich úlohy v biotransformácii benzimidazolových anthelmintík.

Dielčie ciele práce:

- ❖ Štúdium biotransformácie vybraných benzimidazolových anthelmintík s orientáciou na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu metabolitov anthelmintík v citlivých a rezistentných kmeňoch s ohľadom na možné pohlavné rozdiely dospelých červov.
- ❖ Charakterizácia rodiny UGT v dospelých *H. contortus* spolu s porovnaním konštitutívnej génovej expresie v kmeňoch s rôznou úrovňou anthelmintickej rezistencie.
- ❖ Zhodnotenie zmien v konštitutívnej expresii UGT génov a biotransformácie ABZ oxidáciou a glykosidáciou v juvenilných štádiách citlivého a rezistentného kmeňa *H. contortus*.
- ❖ Zhodnotenie vplyvu reziduálneho ABZ v pastve na úroveň expresie UGT génov a jeho možný dopad na produkciu metabolitov ABZ v dospelých červoch.
- ❖ Zhodnotenie vplyvu cielenej indukcie a inhibície UGT na expresiu génov a biotransformáciu ABZ v dospelých červoch.

## 5. Výsledky a diskusia

### 5.1. Metabolizmus vybraných benzimidazolov v dospelých červoch *H. contortus*

I. RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., SEČKAŘOVÁ, A., DIMUNOVÁ, D., NGUYEN, L. T., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 50- 58. IF<sub>2018</sub> = 2,951

Znalosť metabolických dráh anthelmintík je dôležitá pre pochopenie účinnosti terapie a posúdenie rizika vývoja liekovej rezistencie nematod. Hoci predošlé štúdie potvrdili, že dospelé červy *H. contortus* boli schopne metabolizovať ABZ a FLU, bola táto štúdia zameraná na pohlavné rozdiely červov v metabolizme benzimidazolov ABZ, FLU a ricobendazolu (RCB alebo albendazol-sulfoxid ABZSO, aktívny metabolit ABZ) za použitia citlivejších analytických nástrojov UHPLC/MS/MS. Okrem porovnania produkcie metabolitov v samiciach a samcoch, boli sledované aj rozdiely medzi citlivým kmeňom ISE a rezistentným kmeňom IRE za účelom odhalenia úlohy metabolizmu v anthelmintickej rezistencii.

V rámci analýzy metabolizmu FLU, bolo identifikovaných 12 rôznych metabolitov, z toho 6 novo charakterizovaných. Hlavným metabolitom 1. fázy biotransformácie bol metabolit s redukovanou karbonylovou skupinou, pričom boli pozorované aj hydroxylácia a karbamátová hydrolýza FLU. Čo sa týka 2. fázy biotransformácie, kedy prebiehala N- a O-glykosidácia, metylácia a O-acetylácia, bol najvýznamnejším metabolitom O-glykosid redukovaného FLU. Napriek tomu, že redukovaná molekula FLU poskytuje len jednu O-pozíciu na naviazanie hexózy, boli popísané 3 konjugáty s možnou rozdielnou priestorovou orientáciou glykosidu.

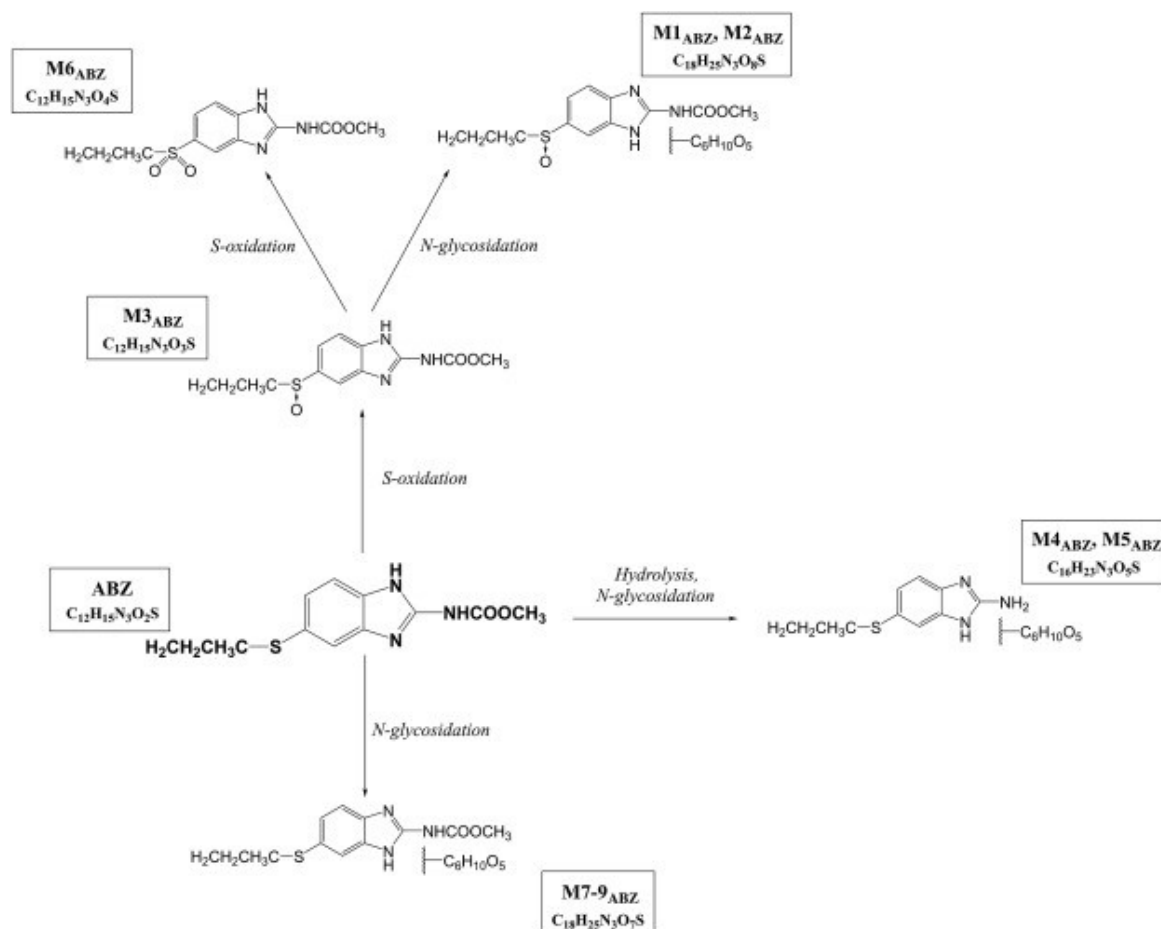
Biotransformácia ABZ viedla k tvorbe 9 metabolitov, z nich 4 neboli dovtedy identifikované. Na rozdiel od FLU, ABZ podlieha oxidácii na sulfoxid a následne na sulfón (Obrázok 9.). Okrem toho, ABZ prechádza aj hydrolýzou karbamátovej skupiny. Pokiaľ ide o 2. fázu biotransformácie, opäť je hlavnou reakciou glykosidácia za vzniku troch N-glykosidov, dva N-glykosidy oxidovaného ABZ a dva hydrolyzovaného ABZ. Rovnako ako pri FLU, ani tu nie je isté, že hexóza viažuca sa na ABZ je glukóza alebo iná hexóza.

Posledným analyzovaným liečivom bol RCB (ABZSO), ktorý sa môže redukciou premieňať späť na ABZ. Zároveň bolo identifikovaných ešte 5 metabolitov. *H. contortus* bol

schopný metabolizovať RCB prostredníctvom druhej S-oxidácie, N-glykosidácie a vytvárať konjugáty RCB a ABZ.

Množstvo metabolitov bolo normalizované na miligram celkového proteínu, aby sa vylúčili veľkostné rozdiely u oboch pohlaví. Výsledky ukázali pohlavné rozdiely v metabolizme všetkých testovaných anthelmintík. Dokonca tri metabolity (dva N-glykosidy FLU a jeden N-glykosid ABZ) boli detekované len u samíc. Väčšie množstvo metabolitov sa zistilo v samiciach ako v samcoch až na jeden ABZ-metabolit. Tieto zistenia ukazujú, že existujú významne pohlavné rozdiely v metabolizme liečiv v *H. contortus*.

Porovnanie metabolických dráh ABZ, RCB (ABZSO) a FLU medzi kmeňom ISE a IRE overilo, že dospelé červy rezistentného kmeňa IRE mali väčšiu schopnosť deaktivovať anthelmintika ako citlivého kmeňa ISE a navyše niektoré metabolity boli identifikované výlučne v kmeni IRE. Najzásadnejšie rozdiely boli pozorované medzi samicami oboch kmeňov. Okrem toho, percentuálny podiel nezmetabolizovaného liečiva FLU a ABZ bol signifikantne nižší v samiciach IRE ako ISE kmeňa. Tieto zistenia naznačujú, že zvýšená deaktivácia benzimidazolov prostredníctvom glykosidácie u rezistentného kmeňa, by mohla byť jedným z mechanizmov rezistencie anthelmintík v nematodach.



**Obrázok 9.:** Navrhovaná metabolická dráha ABZ v *H. contortus*

## 5.2. Rodina UDP-glykosyltransferas v *H. contortus*

**II.** MATOUŠKOVÁ, P., LECOVÁ, L., LAING, R., **DIMUNOVÁ, D.**, VOGEL, H., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., NGUYEN, L. T., KELLEROVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 420- 429. IF<sub>2018</sub> = 2,951

Detoxikácia benzimidazolových anthelmintík u *H. contortus* bola pozorovaná prostredníctvom glykosidácie. Tieto reakcie sú katalyzované UDP-glykosyltransferasami. Pretože UGT u tohto organizmu neboli dovtedy charakterizované, bola táto štúdia navrhnutá s cieľom preskúmať rodinu týchto enzýmov. Identifikácia génov kódujúcich UGT spolu s porovnaním konštitutívnej génovej expzie v kmeňoch s rôznou úrovňou rezistencie (od citliveného kmeňa ISE a rezistentného na benzimidazoly IRE, po kmeň odolný na viaceré liečiva WR) umožňuje zistiť potenciálny význam špecifických UGT v glykosidácii anthelmintík, ktorá prispieva k zvýšenému vylúčeniu liečiva z parazita a k možnému rozvoju rezistencie.

Analýza genómu rozdeleného do 6 chromozómov odhalila prítomnosť 32 génov UGT. Na základe aminokyselinových sekvencií boli rozdelené do 15 rodín, pričom nadrodina UGT obsahuje charakteristickú sekvenciu 44 aminokyselín zodpovedných za väzbu UDP jednotky donorového cukru. Okrem toho, boli u väčšiny sekvencií UGT identifikované signálne peptidy a transmembranové helixy, ktorými sa enzýmy viažu na endoplazmatické retikulum. Avšak, niektoré UGT gény neobsahovali tieto úseky a preto nie je u nich jasné, či sa jedná o pseudogeny a či majú enzýmovú aktivitu. Na druhej strane, všetkých 32 sekvencií obsahuje aminokyseliny dôležité pre ich katalytickú aktivitu.

Fylogenetické porovnanie UGT medzi *H. contortus* a *C. elegans* odhalilo, že homológy 4 jednočlenných UGT v *C. elegans* sú prítomné v *H. contortus* ako jedna kopia génu (UGT10B1, 22A2, 26A2, 27B1). *C. elegans* genóm kóduje 60 UGT rozdelených do 17 rodín, pričom na rozdiel od *H. contortus*, majú rozsiahle rodiny UGT14, UGT15, UGT18. Niektoré rodiny (UGT365, UGT366, UGT368) sú zase rozšírené len u *H. contortus*. Sekvenčná podobnosť takýchto rodín a usporiadanie génu na chromozómoch v skupinách svedčí o ich vzniku násobnými duplikáciami génov.

Kvantifikácia konštitutívnej expzie 32 UGT mRNA u dospelých červov *H. contortus* ukázala významné rozdiely medzi samicami a samcami. Šesť génov malo medzi pohlaviami



výrazne odlišnú expresiu, štyri gény mali vyššiu hladinu transkriptu samcov (UGT22A2, 24C1, 368B1 a 373A1) a dve u samíc (UGT366D1, 369A1). Najviac exprimovaná bola UGT369A1 a UGT366D1 u samíc a UGT22A2 u samcov. Analýza možných rozdielov v konštitatívnej expresii UGT medzi kmeňmi ukázala výrazne vyššie hladiny transkriptov UGT371A1 u oboch rezistentných kmeňov u samcov. Avšak, najvýznamnejšie zvýšenie úrovne transkripcie bolo detekované u génu UGT368B2, keďže sa prejavilo u oboch pohlaví IRE a WR kmeňa. Indukcia UGT génov v rezistentných kmeňoch môže mať nejednoznačný pôvod, ale podporuje predpoklad zapojenia týchto UGT do biotransformácie benzimidazolových anthelmintík.

### 5.3. UDP-glykosyltransferasy a metabolizmus albendazolu v juvenilných štádiách

#### *H. contortus*

**III. KELLEROVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., DIMUNOVÁ, D., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., ŠTĚRBOVÁ, K., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P. (2020) UDP-glycosyltransferases and albendazole metabolism in the juvenile stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology*. 11: 594116. IF<sub>2020</sub> = 4,566**

Rodina UGT v *H. contortus* vrátane stanovenia konštitatívnej expresie ich génov bola charakterizovaná v dospelých červoch. Naproti tomu, voľne žijúce juvenilné štádia sa taktiež môžu dostať do kontaktu s mnohými xenobiotikami vrátane anthelmintík a to prevažne v subletálnych koncentráciách, čo môže mať za následok rozvoj rezistencie. Preto je účelom tejto štúdie určiť konštitatívnu expresiu UGT génov a ich indukovateľnosť nízkou koncentráciou ABZ a ABZSO vo vajíčkach a larválnych štádiách L1, L3. V juvenilných štádiách bol taktiež testovaný aj metabolizmus ABZ v subletálnych dávkach so zameraním na kvantifikáciu ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> metabolitov v ISE a IRE kmeňoch.

V troch testovaných štádiách *H. contortus* boli UGT rôzne exprimované. Rozdiely v expresii génov UGT medzi štádiami podporujú predpokladané rôzne úlohy jednotlivých UGT v konkrétnej životnej etape *H. contortus*.

Navyše, každý stanovený gén UGT v dvoch rezistentných kmeňoch bol porovnaný s citlivým kmeňom ISE. Najväčšie zvýšenie v úrovni transkripcie boli pozorované u UGT10B1, UGT24D1 a UGT368B1 v kmeni IRE. Len UGT365B3 mal vyššiu expresiu vo vajíčkach oboch rezistentných kmeňov. V L1 boli zvýšené 4 UGT zo všetkých testovaných v jednom z rezistentných kmeňov a UGT368A2 vykazovalo vyššiu úroveň transkripcie v L3 rezistentnom kmeni WR. Na základe domnienky, že rozdiel expresii UGT v rezistentných kmeňoch je zapríčinený ich zapojením do metabolizmu anthelmintík a ich možnou indukciou týmito liečivami, boli juvenilné štádia vystavené nízkej dávke ABZ a ABZSO po dobu 4 hodín. Avšak, za túto dobu nedošlo k žiadnej indukcii testovaných UGT génov.

Metabolity ABZ sledované v juvenilných štádiách sa väčšinou tvorili prostredníctvom S-oxidácie. ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> sa viac formoval vo vajíčkach a L1, pričom výrazne nižšie množstva boli detekované v mediach. Rozdiely v metabolizme ABZ medzi kmeňmi ISE a IRE boli výraznejšie vo vajíčkach a L3 vo vyšších koncentráciách ABZ, ktoré u IRE kmeňa formovali, ale aj vylučovali ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> metabolity do média efektívnejšie.

V rámci glykosidácie, niekoľko ABZ-glykosidov a ABZSO-glykosidov bolo vytvorených v týchto štádiách. Taktiež, v L1 štádiu IRE kmeňa boli glykosidy formované vo väčšom množstve v porovnaní s ISE kmeňom. Zaujímavé je, že len vajíčka IRE kmeňa boli schopné vytvoriť ABZ-acetylglykosid. Navyše, porovnanie počtu metabolitov v larválnych štádiách ukazuje väčšiu rozmanitosť v IRE kmeni. Výsledky naznačujú podobne ako u dospelých červov, že rozdiely v rozsahu glykosidácie v biotransformácii ABZ súvisia s anthelmintickou rezistenciou.

#### 5.4. Vplyv environmentálnej cirkulácie anhelmintika albendazolu na *H. contortus*

**IV. DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., AMBROŽ, M., VOKŘÁL, I., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. (2022)** Environmental circulation of the anthelmintic drug albendazole affects expression and activity of resistance-related genes in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Science of the Total Environment*. 822: 153527. IF<sub>2022</sub> = 7,842

Anthelmintika a ich metabolity sa do prostredia dostávajú exkrementami zvierat uvoľnených na pastvinách. Následná environmentálna cirkulácia anthelmintík môže mať rôzne dôsledky, vrátane vystavenia nematod anthelmintikom a ich metabolitom. V predchádzajúcich experimentoch bolo zistené, že vplyvom anthelmintík došlo k zvýšeniu expresie a aktivity biotransformačných enzýmov cytochrom P450 (CYP), UDP-glykosyltransferasy (UGT) a P-glykoproteíny (P-gp) v rôznych štádiách *H. contortus*. Avšak tieto experimenty boli uskutočnené *ex vivo* v laboratórnych podmienkach [55, 61]. Vzhľadom k tomu, bola táto štúdia navrhnutá tak, aby sledovala cirkulácie ABZ v životnom prostredí v reálnych podmienkach farmy a ich vplyv na *H. contortus in vivo*. Pastva hnojená trusom s ABZ a bez ABZ bola použitá na kŕmenie jahniat v určitých časových intervaloch pred a po infikovaní s *H. contortus*. Rozsah infekcie, expresia génov CYP, UGT, P-gp, ako aj schopnosť biotransformovať ABZ v dospelých červoch sa analyzovala s cieľom posúdiť vplyv cirkulácie ABZ na schopnosť červov chrániť sa pred účinkom anthelmintík.

Expresia jednotlivých isoforiem nadrodin CYP, UGT a P-gp bola stanovovaná a porovnaná medzi skupinami dospelých jedincov získaných z kontrolných oviec a oviec kŕmených pastvou s obsahom ABZ-metabolitov v rôznom časovom rozpätí (dve ABZ-skupiny). V prípade CYP sa zvýšenie úrovne transkripcie týkalo len *cyp-6*, *cyp-7* a *cyp-8* v niektorých vzorkách samíc a samcov v dvoch ovplyvnených skupinách podaním ABZ ovciam a zároveň bol detekovaný pokles expresie u *cyp-2* v jednej z týchto ovplyvnených skupín. U samíc a samcov z oboch ABZ skupín bola expresia UGT365B1 a UGT368B2 zvýšená v porovnaní s kontrolami. Niektoré ďalšie UGT boli rôzne indukované v jednotlivých ABZ-skupinách a pohlaviach červov. Avšak, P-gp gény nevykazovali žiadne rozdiely medzi dospelými červami kontrolných a ABZ-skupín. Indukovateľnosť určitých CYP a UGT prostredníctvom ABZ môže zdôrazňovať ich význam v metabolizme ABZ.

*H. contortus* získaný z oviec kontrolných a ABZ-skupín bol *ex vivo* inkubovaný s ABZ a ABZSO počas 24 hodín, aby bolo možné stanoviť ich metabolity. Dospelé červy z ABZ kŕmených ovci boli schopné oxidovať a glykosidovať ABZ a aj ABZSO účinnejšie ako červy

z kontrolných ovci. Aj keď rozdiely boli významné, neboli veľké a je preto potreba brať do úvahy, že kontakt s ABZ a jeho metabolitmi v pastve bol len na obmedzený čas, zatiaľ čo pasúce sa zvieratá sa môžu opakovanne živiť rastlinami s ABZ metabolitmi po dlhú dobu. V tomto prípade je potom očakávaná výraznejšia zmena v organizme červa a tak môžu získať lepšiu schopnosť deaktivovať ABZ a postupne sa stať menej citlivé na toto anthelmintikum.

## 5.5. Úloha UDP-glykosyltransferas v xenobiotickej rezistencii

**V. DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., PODLIPNÁ, R., BOUŠOVÁ, I., SKÁLOVÁ, L.** (2022) The role of UDP-glycosyltransferases in xenobiotic-resistance. Odoslané k recenzii do časopisu Drug Metabolism Review.

UDP-glykosyltransferasy (UGT) chránia organizmy pred potenciálne škodlivými xenobiotikami. Preto zvýšená expresia a/alebo aktivita UGT zlepšuje ochranu organizmu a môže prispieť k vývoji jedincov, ktorí sa stanú odolnejšími voči účinkom určitých xenobiotík. Zatiaľ, čo funkcia UGT pri rezistencii ľudských rakovinových buniek na chemoterapiu je v súčasnosti dobre známa, iné organizmy a iné xenobiotika priťahujú oveľa menej pozornosti. Tento prehľad bol navrhnutý, aby prezentoval komplexne doterajšie informácie o úlohe UGT pri rezistencii na xenobiotika nielen u ľudí, ale aj u ďalších organizmov. Mnohé štúdie jasne ukazujú podiel UGT na rezistencii nematod na anthelmintika, hmyzu na insekticídy, burín na herbicídy, ako aj ľudí na rôzne liečivá. Napriek tomu, že je príspevok UGT k rezistencii voči xenobiotikam zrejмый, mnohé informácie stále chýbajú, napríklad pokiaľ ide o mechanizmus regulácie UGT, určite si zaslúžia ďalšie skúmanie.

## 5.6. Indukcia a inhibícia UDP-glykosyltransferasy v metabolizme albendazolu v *H. contortus*

**VI. DIMUNOVÁ, D., NAVRÁTILOVÁ, M., KELLEROVÁ, P., AMBROŽ, M., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P. (2022)** The induction and inhibition of UDP-glycosyltransferases in *Haemonchus contortus* and its role in the metabolism of albendazole. Odoslané k recenzii do časopisu International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance.

Glykosidácia anthelmintík slúži ako ochranný mechanizmus *H. contortus* pred toxickým účinkom týchto liečiv. S cieľom prehliť poznatky o funkčnosti UDP-glykosyltransferas (UGT) zabezpečujúcich tieto reakcie je táto štúdia zameraná na indukciu a inhibíciu expresie a aktivity UGT v metabolizme ABZ. Z tohto dôvodu bol indukčný efekt fenobarbitalu (PHB), ako aj ABZ a ABZSO stanovovaný v expresii UGT a v biotransformácii ABZ v dospelých červoch *ex vivo*. Zároveň bol testovaný účinok troch potenciálnych inhibítorov UGT: 5-nitrouracil (5-NU), 4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidin (DNP) a sulfínpyrazon (SP) na glykosidáciu ABZ, ktoré by mohli znížiť anthelmintickú biotransformáciu a zlepšiť účinnosť liečby.

Hladiny expresie UGT génov boli detekované po vystavení dospelých červov po dobu 4 a 12 hodín štandardnej dávke ABZ a ABZSO použitej na analýzu metabolizmu. Avšak, len málo UGT bolo upregulovaných po 4 hodinovej inkubácii, pričom navýšenie expresie niektorých UGT po 12 hodinách bolo pozorované najmä u samcov. Aj keď sa efekt anthelmintík výrazne neprejavil na úrovni transkripcie génu, v biotransformácii ABZ boli kvantifikované vyššie množstvá metabolitov po pred-inkubácii s nízkymi dávkami ABZ a ABZSO. Taktiež, len niekoľko UGT génov bolo exprimovaných po vystavení červov PHB. Napríklad, PHB zvyšuje UGT365A1 u samíc, UGT367A1 po 4 hodinách a UGT366D1 po 12 hodinách u oboch pohlaví. Na druhej strane, indukcie týchto UGT sprostredkovaných PHB nevedli k zvýšenej tvorbe ABZ-glykosidov.

Na preukázanie zapojenia UGT do formovania ABZ konjugátov s glukózou v *H. contortus* sa na testovanie účinkov troch inhibítorov (SP, 5-NU, DNP) použili subcelulárne frakcie dospelého červa. Výsledky ukazujú, že SP je najúčinnější inhibítor v porovnaní s ostatnými.

Inhibičný potenciál SP na tvorbu ABZ-glykosidov bol tiež testovaný *ex vivo* v červoch. Pokles tvorby všetkých analyzovaných glykosidov bol pozorovaný v homogenátoch červov ako aj v mediach oboch pohlaví, čo dokazuje, že SP je silným inhibítorom UGT v *H. contortus*.

## 6. Záver

Štúdium UDP-glykosyltransferas, ktorému sme sa venovali v našich experimentoch, rozšírilo doterajšie znalosti o ich funkcii v biotransformácii anthelmintík s ohľadom na kmeň, štádium a pohlavie *H. contortus*. Okrem toho, predošlý kontakt *H. contortus* s liečivom ovplyvnil UGT na úrovni expresie génu a enzýmovej aktivity sledovanej v rámci formácie metabolitov anthelmintík.

- ❖ Kvalitatívna a kvantitatívna identifikácia metabolitov troch benzimidazolových anthelmintík ABZ, RCB (ABZSO) a FLU odhalila rozdiely v ich biotransformácii medzi pohlaviami dospelých červov, citlivých a rezistentných kmeňov. Vo väčšine prípadov, samice prejavili rozsiahlejšiu schopnosť metabolizovať anthelmintika. A zároveň jedinci kmeňa IRE tvorili viac metabolitov všetkých liečiv ako predstavitelia kmeňa ISE. Niektoré metabolity sa dokonca našli len u červov kmeňa IRE. Tieto zistenia naznačujú, že zvýšená intenzita metabolizmu by mohla byť súčasťou rezistencie na bezimidazole anthelmintika v *H. contortus*.
- ❖ Štúdium genómu *H. contortus* odhalilo 32 génov UGT rozdelených do 15 rodín. Okrem hodnotenia podobnosti týchto sekvencií génov s UGT zo *C. elegans*, porovnanie konštitatívnej expresie UGT ukázalo ich rozdiely medzi ISE a rezistentnými kmeňmi IRE, WR, v ktorých bola významne exprimovaná UGT368B2. Gény UGT so zvýšenou úrovňou transkripce v IRE a WR môžu prispievať k liekovej rezistencii.
- ❖ Stanovením génovej expresie UGT v juvenilných štádiách *H. contortus* sa zistili ich značné rozdiely, čo naznačuje rozličnú úlohu jednotlivých UGT v priebehu životného cyklu červa. Schopnosť týchto štádií rezistentných kmeňov vo vyššej miere oxidovať a glykosidovať anthelmintikum ABZ, podobne ako u dospelých červov, podporuje prepojenie metabolizmu a anthelmintickej rezistencie v *H. contortus*.
- ❖ Vystavenie *H. contortus* reziduálnym koncentráciám anthelmintika ABZ v pastve nakazených oviec malo za následok zvýšenie úrovne transkripce niektorých CYP a UGT génov s následným miernym zvýšením biotransformácie ABZ. Tieto výsledky nasvedčujú tomu, že cirkulácia ABZ v prostredí napomáha k zlepšovaniu dispozícií *H. contortus* deaktivovať dané anthelmintikum.



- ❖ Cílená indukcia UGT dospelých červov ABZ *ex vivo* sa výrazne neprejavila na úrovni génu, avšak bola pozorovaná zvýšená produkcia metabolitov ABZ, pričom indukcia látkou PHB, ktorá nemá anthelmintický účinok, neovplyvnila metabolizmus ABZ. S cieľom prehliť efekt ABZ na dospelé červy boli testované inhibítory aktivity UGT enzýmov. Výsledky odhalili SP ako potenciálny inhibítor ABZ glykosidácie. Tieto informácie by mohli byť využité pri zostavovaní kombináčnej terapie alebo v ďalšom výskume.

## 7. Podiel autorky na publikáciách zahrnutých v dizertačnej práci

- I. RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., SEČKAŘOVÁ, A., **DIMUNOVÁ, D.**, NGUYEN, L. T., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 50- 58. IF<sub>2018</sub> = 2,951
  - Izolácia a triedenie dospelých červov, expozícia anthelmintikom
  - Príprava a izolácia metabolitov z homogenátov červov a médií
  
- II. MATOUŠKOVÁ, P., LECOVÁ, L., LAING, R., **DIMUNOVÁ, D.**, VOGEL, H., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., NGUYEN, L. T., KELLEROVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 420- 429. IF<sub>2018</sub> = 2,951
  - Izolácia a triedenie dospelých červov rôznych kmeňov *H.contortus*
  - Izolácia RNA a kvantitatívne PCR stanovenie UGT isoforiem
  
- III. KELLEROVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., **DIMUNOVÁ, D.**, RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., ŠTĚRBOVÁ, K., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P. (2020) UDP-glycosyltransferases and albendazole metabolism in the juvenile stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology*. 11: 594116. IF<sub>2020</sub> = 4,566
  - Príprava juvenilných štádií a ich expozícia albendazolu (ABZ)

**IV. DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., AMBROŽ, M., VOKŘÁL, I., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. (2022)** Environmental circulation of the anthelmintic drug albendazole affects expression and activity of resistance-related genes in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Science of the Total Environment*. 822: 153527. IF<sub>2022</sub> = 7,842

- Příprava poľa, hnojenie trusom ovčí ošetrených ABZ a kontrolným trusom, zber rastlinného materiálu pre kŕmenie ovčí
- Izolácia a triedenie dospelých *H. contortus in vivo* ovplyvnených ABZ a kontrol
- Izolácia RNA a kvantitatívne stanovenie UGT v dospelých červoch izolovaných z *in vivo* ovplyvnených ABZ
- Vytvorenie draftu publikácie

**V. DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., PODLIPNÁ, R., BOUŠOVÁ, I., SKÁLOVÁ, L. (2022)** The role of UDP-glycosyltransferases in xenobiotic-resistance. Odoslané k recenzii do časopisu *Drug Metabolism Review*.

- Spracovanie podkladov pre prípravu publikácie
- Podiel na spisovaní publikácie

**VI. DIMUNOVÁ, D., NAVRÁTILOVÁ, M., KELLEROVÁ, P., AMBROŽ, M., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P. (2022)** The induction and inhibition of UDP-glycosyltransferases in *Haemonchus contortus* and its role in the metabolism of albendazole. Odoslané k recenzii do časopisu *International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance*.

- Kompletné vykonanie experimentov so subcelulárnými frakciami
- Inkubácia nematod s testovaným liečivom a ďalšími látkami
- Extrakcie a príprava vzoriek na UHPLC/MS
- Podiel na analýze dát
- Spracovanie publikácie

## 8. Zoznam skratiek

5-NU	5-nitrouracil
ABZ	albendazol
ABZSO	albendazol-sulfoxid
ABZSO <sub>2</sub>	albendazol-sulfon
CYP	cytochrom P450
DNP	4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidin
ER	endoplazmatické retikulum
FLU	flubendazol
GI	gastrointestinálny
GT	glykosyltransferasy
HCl	kyselina chlorovodíková
Hco	<i>Haemonchus contortus</i>
ISE	Inbred Susceptible Edinburgh, citlivý kmeň <i>H.contortus</i>
IRE	Inbred Resitance Edinburgh, rezistentný kmeň <i>H.contortus</i>
IVM	ivermektin
PCR	polymerasová reťazová reakcia
P-gp	p-glykoproteín
PHB	fenobarbital
RCB	rikobendazol
SNP	single nucleotide polymorphism
SP	sulfinpyrazon
UDP	uridíndifosfat
UGT	UDP-glykosyltransferasy
WR	White River, multirezistentný kmeň <i>H.contortus</i>

## 9. Zoznam použitej literatúry

1. Chintoan-Uta, C., et al., *Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms*. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2014. **281**(1780): p. 20132985.
2. Walker, J.G. and E.R. Morgan, *Generalists at the interface: Nematode transmission between wild and domestic ungulates*. Int J Parasitol Parasites Wildl, 2014. **3**(3): p. 242-50.
3. Morgan, E.R., et al., *Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions*. Agriculture-Basel, 2013. **3**(3): p. 484-502.
4. Roeber, F., A.R. Jex, and R.B. Gasser, *Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective*. Parasites & Vectors, 2013. **6**: p. 153.
5. Volf, P. and P. Horák, *Paraziti a jejich biologie*. Vyd. 1. 2007, Praha: Triton.
6. Charlier, J., et al., *Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants*. Trends Parasitol, 2014. **30**(7): p. 361-7.
7. Besier, R.B., et al., *The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of Haemonchus contortus Infection in Small Ruminants*. Haemonchus Contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends, 2016. **93**: p. 95-143.
8. Crilly, J.P. and et al., *Haemonchosis: dealing with the increasing threat of the barber's pole worm*. Livestock, 2020. **25**(5).
9. Salle, G., et al., *The global diversity of Haemonchus contortus is shaped by human intervention and climate*. Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 4811.
10. Angulo-Cubillan, F.J., et al., *Haemonchus contortus - Sheep relationship: A review*. Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias, 2007. **17**(6): p. 577-587.
11. Arsenopoulos, K.V., et al., *Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats*. Animals, 2021. **11**(2).
12. van Wyk, J.A. and G.F. Bath, *The FAMACHA((c)) system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment*. Veterinary Research, 2002. **33**(5): p. 509-529.
13. Zarlenga, D.S., E.P. Hoberg, and W. Tuo, *The Identification of Haemonchus Species and Diagnosis of Haemonchosis*. Haemonchus Contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends, 2016. **93**: p. 145-180.

14. Reslova, N., et al., *The identification and semi-quantitative assessment of gastrointestinal nematodes in faecal samples using multiplex real-time PCR assays*. Parasites & Vectors, 2021. **14**(1): p. 391.
15. Melville, L., et al., *Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Haemonchus contortus eggs in ovine faecal samples*. Veterinary Parasitology, 2014. **206**(3-4): p. 308-312.
16. Elmahalawy, S.T., et al., *Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep*. Veterinary Parasitology, 2018. **261**: p. 1-8.
17. Lanusse, C., et al., *Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants*. Trends in Parasitology, 2018. **34**(8): p. 664-682.
18. Besier, R.B., et al., *Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants*. Haemonchus Contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends, 2016. **93**: p. 181-238.
19. McKellar, Q.A. and F. Jackson, *Veterinary anthelmintics: old and new*. Trends in Parasitology, 2004. **20**(10): p. 456-461.
20. Brown, H.D., et al., *Antiparasitic Drugs .4. 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, a New Anthelmintic*. Journal of the American Chemical Society, 1961. **83**(7): p. 1764-&.
21. Kohler, P., *The biochemical basis of anthelmintic action and resistance*. International Journal for Parasitology, 2001. **31**(4): p. 336-345.
22. Thienpon.D, et al., *Tetramisole (R 8299) a New Potent Broad Spectrum Anthelmintic*. Nature, 1966. **209**(5028): p. 1024-&.
23. Rayes, D., et al., *Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(35): p. 36372-36381.
24. Laing, R., V. Gillan, and E. Devaney, *Ivermectin - Old Drug, New Tricks?* Trends in Parasitology, 2017. **33**(6): p. 463-472.
25. Epe, C. and R. Kaminsky, *New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine*. Trends in Parasitology, 2013. **29**(3): p. 129-134.
26. Kaminsky, R., et al., *Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate*. Parasitology Research, 2008. **103**(4): p. 931-939.

27. Little, P.R., et al., *Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains*. *Veterinary Parasitology*, 2011. **181**(2-4): p. 180-193.
28. Aguerre, S., et al., *Resistance to gastrointestinal nematodes in dairy sheep: Genetic variability and relevance of artificial infection of nucleus rams to select for resistant ewes on farms*. *Veterinary Parasitology*, 2018. **256**: p. 16-23.
29. Ruiz-Huidobro, C., et al., *Cell grazing and Haemonchus contortus control in sheep: lessons from a two-year study in temperate Western Europe*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 12699.
30. Hoste, H., et al., *Interactions Between Nutrition and Infections With Haemonchus contortus and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants*. *Haemonchus Contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends*, 2016. **93**: p. 239-351.
31. Healey, K., et al., *Field evaluation of Duddingtonia flagrans IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep*. *Veterinary Parasitology*, 2018. **253**: p. 48-54.
32. Ehsan, M., et al., *Advances in the Development of Anti-Haemonchus contortus Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives*. *Vaccines*, 2020. **8**(3).
33. Kebeta, M.M., et al., *Evaluation of Barbervax (R) vaccination for lambing Merino ewes*. *Veterinary Parasitology*, 2020. **283**: p. 109187.
34. Zhao, G.W., et al., *Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against Haemonchus contortus infection*. *Veterinary Journal*, 2012. **191**(1): p. 94-100.
35. Yatsuda, A.P., et al., *Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite Haemonchus contortus reveals extensive sequence variation and differential immune recognition*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(19): p. 16941-16951.
36. Nisbet, A.J., et al., *The rational simplification of a recombinant cocktail vaccine to control the parasitic nematode Teladorsagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology*, 2019. **49**(3-4): p. 257-265.
37. Kotze, A.C. and R.K. Prichard, *Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus: History, Mechanisms and Diagnosis*. *Haemonchus Contortus and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends*, 2016. **93**: p. 397-428.
38. Drudge, J.H., S.E. Leland, and Z.N. Wyant, *Strain Variation in the Response of Sheep Nematodes to the Action of Phenothiazine .2. Studies on Pure Infections of*

- Haemonchus-Contortus*. American Journal of Veterinary Research, 1957. **18**(67): p. 317-325.
39. Velde, F.V., J. Charlier, and E. Claerebout, *Farmer Behavior and Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock-Uptake of Sustainable Control Approaches*. Frontiers in Veterinary Science, 2018. **5**.
  40. De Graef, J., E. Claerebout, and P. Geldhof, *Anthelmintic resistance of gastrointestinal cattle nematodes*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2013. **82**(3): p. 113-123.
  41. Kotze, A.C., et al., *Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of Haemonchus contortus*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2012. **2**: p. 92-7.
  42. Yilmaz, E., et al., *Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of Haemonchus contortus isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2017. **7**(3): p. 362-369.
  43. James, C.E., A.L. Hudson, and M.W. Davey, *Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?* Trends Parasitol, 2009. **25**(7): p. 328-35.
  44. Sarai, R.S., et al., *Drug-efflux and target-site gene expression patterns in Haemonchus contortus larvae able to survive increasing concentrations of levamisole in vitro*. International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance, 2014. **4**(2): p. 77-84.
  45. Kaplan, R.M., *Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report*. Trends in Parasitology, 2004. **20**(10): p. 477-481.
  46. Roos, M.H., et al., *Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode Haemonchus contortus*. Int J Parasitol, 2004. **34**(1): p. 109-15.
  47. van Wyk, J.A. and F.S. Malan, *Resistance of field strains of Haemonchus contortus to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa*. Vet Rec, 1988. **123**(9): p. 226-8.
  48. Gilleard, J.S., et al., *A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions*. International Journal for Parasitology, 2021. **51**(13-14): p. 1133-1151.
  49. Coles, G.C., et al., *The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Veterinary Parasitology, 2006. **136**(3-4): p. 167-185.
  50. Roeber, F., A.R. Jex, and R.B. Gasser, *Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants*. Biotechnology Advances, 2013. **31**(8): p. 1135-1152.



51. Taylor, M.A., *SCOPS and COWS-'Worming it out of UK farmers'*. Veterinary Parasitology, 2012. **186**(1-2): p. 65-69.
52. Parkinson, A., et al., *Biotransformation of Xenobiotics*. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 2001: p. 133 - 224.
53. Matoušková, P., et al., *The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths*. Trends Parasitol, 2016. **32**(6): p. 481-491.
54. Cvilink, V., J. Lamka, and L. Skálová, *Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths*. Drug Metab Rev, 2009. **41**(1): p. 8-26.
55. Kellerová, P., et al., *Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in Haemonchus contortus adults*. Vet Res, 2020. **51**(1): p. 94.
56. Choe, K.P., C.K. Leung, and M.M. Miyamoto, *Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator, SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance*. Drug Metab Rev, 2012. **44**(3): p. 209-23.
57. Jones, L.M., A.J. Flemming, and P.E. Urwin, *NHR-176 regulates cyp-35d1 to control hydroxylation-dependent metabolism of thiabendazole in Caenorhabditis elegans*. Biochem J, 2015. **466**(1): p. 37-44.
58. Ménez, C., et al., *The transcription factor NHR-8: A new target to increase ivermectin efficacy in nematodes*. PLoS Pathog, 2019. **15**(2): p. e1007598.
59. Skálová, L. and et al., *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Vyd. 2. 2017, Praha: Karolinum.
60. Ardelli, B.F., *Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes*. Parasitol Int, 2013. **62**(6): p. 639-46.
61. Kellerová, P., et al., *Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in Haemonchus contortus female and male adults*. Vet Parasitol, 2019. **273**: p. 24-31.
62. Lespine, A., et al., *P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2012. **2**: p. 58-75.
63. Lifschitz, A., et al., *Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep*. Vet Parasitol, 2010. **172**(3-4): p. 291-8.
64. Lifschitz, A., et al., *Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin*. Exp Parasitol, 2010. **125**(2): p. 172-8.

65. Bártíková, H., et al., *Import and efflux of flubendazole in Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics*. Vet Parasitol, 2012. **187**(3-4): p. 473-9.
66. Laing, R., et al., *The cytochrome P450 family in the parasitic nematode Haemonchus contortus*. Int J Parasitol, 2015. **45**(4): p. 243-51.
67. Virkel, G., et al., *Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(5): p. 536-44.
68. Vokřál, I., et al., *Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics*. Vet Parasitol, 2013. **196**(3-4): p. 373-81.
69. Laing, S.T., et al., *Characterization of the xenobiotic response of Caenorhabditis elegans to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites*. Biochem J, 2010. **432**(3): p. 505-14.
70. Munguía, B., et al., *Development of novel valerolactam-benzimidazole hybrids anthelmintic derivatives: Diffusion and biotransformation studies in helminth parasites*. Exp Parasitol, 2015. **153**: p. 75-80.
71. Stuchlíková, L., et al., *Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (Haemonchus contortus)*. Drug Test Anal, 2014. **6**(10): p. 1055-62.
72. Cwiklinski, K., et al., *The Fasciola hepatica genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution*. Genome Biol, 2015. **16**(1): p. 71.
73. Brennan, G.P., et al., *Understanding triclabendazole resistance*. Exp Mol Pathol, 2007. **82**(2): p. 104-9.
74. Devine, C., et al., *Effect of the metabolic inhibitor, methimazole on the drug susceptibility of a triclabendazole-resistant isolate of Fasciola hepatica*. Parasitology, 2009. **136**(2): p. 183-92.
75. Devine, C., et al., *Piperonyl butoxide enhances triclabendazole action against triclabendazole-resistant Fasciola hepatica*. Parasitology, 2011. **138**(2): p. 224-36.
76. Devine, C., et al., *Potentiation of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of Fasciola hepatica following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole*. Vet Parasitol, 2012. **184**(1): p. 37-47.
77. AlGusbi, S., et al., *Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes*. Int J Parasitol, 2014. **44**(9): p. 647-58.

78. Vokřál, I., et al., *The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics*. Parasitology, 2012. **139**(10): p. 1309-16.
79. Scarcella, S., et al., *Increase of glutathione S-transferase, carboxyl esterase and carbonyl reductase in Fasciola hepatica recovered from triclabendazole treated sheep*. Mol Biochem Parasitol, 2013. **191**(2): p. 63-5.
80. Jancova, P., P. Anzenbacher, and E. Anzenbacherova, *Phase II drug metabolizing enzymes*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2010. **154**(2): p. 103-16.
81. Fernández, V., et al., *Differential Activities of Glutathione S-Transferase Isoenzymes in Strains of Fasciola Hepatica Susceptible and Resistant to Triclabendazole*. American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2014. **9**: p. 177-181.
82. Stasiuk, S.J., et al., *Similarities and differences in the biotransformation and transcriptomic responses of Caenorhabditis elegans and Haemonchus contortus to five different benzimidazole drugs*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2019. **11**: p. 13-29.
83. Malik, V. and G.W. Black, *Structural, functional, and mutagenesis studies of UDP-glycosyltransferases*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2012. **87**: p. 87-115.
84. Hu, Y. and S. Walker, *Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases*. Chem Biol, 2002. **9**(12): p. 1287-96.
85. Lairson, L.L., et al., *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 521-55.
86. Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, and E. Boeggeman, *Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(1): p. 53-62.
87. Hu, D.G., et al., *The UGTome: The expanding diversity of UDP glycosyltransferases and its impact on small molecule metabolism*. Pharmacol Ther, 2019. **204**: p. 107414.
88. Meech, R. and P.I. Mackenzie, *Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(12): p. 907-15.
89. Bock, K.W., *The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution*. Biochem Pharmacol, 2016. **99**: p. 11-7.
90. Finel, M. and M. Kurkela, *The UDP-glucuronosyltransferases as oligomeric enzymes*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(1): p. 70-6.
91. Fujiwara, R., T. Yokoi, and M. Nakajima, *Structure and Protein-Protein Interactions of Human UDP-Glucuronosyltransferases*. Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 388.

92. Ross, J., et al., *Higher plant glycosyltransferases*. *Genome Biol*, 2001. **2**(2): p. Reviews3004.
93. Meech, R., et al., *The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily*. *Pharmacol Ther*, 2012. **134**(2): p. 200-18.
94. Meech, R., et al., *The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1153-1222.
95. Ahn, S.J., H. Vogel, and D.G. Heckel, *Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012. **42**(2): p. 133-47.
96. Li, X., et al., *Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.)*. *Pest Manag Sci*, 2017. **73**(7): p. 1402-1409.
97. Yan, M.W., et al., *UDP-glycosyltransferases contribute to the tolerance of parasitoid wasps towards insecticides*. *Pestic Biochem Physiol*, 2021. **179**: p. 104967.
98. Pan, Y., et al., *Thiamethoxam Resistance in *Aphis gossypii* Glover Relies on Multiple UDP-Glucuronosyltransferases*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 322.
99. Kaplanoglu, E., et al., *Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata**. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 1762.
100. Wang, M.Y., et al., *Functional analysis of UGT201D3 associated with abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)*. *Insect Sci*, 2020. **27**(2): p. 276-291.
101. Fontaine, P. and K. Choe, *The transcription factor SKN-1 and detoxification gene ugt-22 alter albendazole efficacy in *Caenorhabditis elegans**. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2018. **8**(2): p. 312-319.
102. Flynn, A.F., et al., *Intestinal UDP-glucuronosyltransferase as a potential target for the treatment and prevention of lymphatic filariasis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019. **13**(9): p. e0007687.
103. Kotze, A.C., A.P. Ruffell, and A.B. Ingham, *Phenobarbital induction and chemical synergism demonstrate the role of UDP-glucuronosyltransferases in detoxification of naphthalophos by *Haemonchus contortus* larvae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(12): p. 7475-83.

## 10. Prílohy

### 10.1. Publikácie vzťahujúce sa k téme práce

- I. RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., SEČKAŘOVÁ, A., **DIMUNOVÁ, D.**, NGUYEN, L. T., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 50- 58. IF<sub>2018</sub> = 2,951
- II. MATOUŠKOVÁ, P., LECOVÁ, L., LAING, R., **DIMUNOVÁ, D.**, VOGEL, H., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., NGUYEN, L. T., KELLEROVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SZOTÁKOVÁ, B., VÁRADY, M., SKÁLOVÁ, L. (2018) UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8: 420- 429. IF<sub>2018</sub> = 2,951
- III. KELLEROVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., **DIMUNOVÁ, D.**, RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., ŠTĚRBOVÁ, K., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P. (2020) UDP-glycosyltransferases and albendazole metabolism in the juvenile stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology*. 11: 594116. IF<sub>2020</sub> = 4,566
- IV. **DIMUNOVÁ, D.**, MATOUŠKOVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. T., AMBROŽ, M., VOKŘÁL, I., SZOTÁKOVÁ, B., SKÁLOVÁ, L. (2022) Environmental circulation of the anthelmintic drug albendazole affects expression and activity of resistance-related genes in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Science of the Total Environment*. 822: 153527. IF<sub>2022</sub> = 7,842
- V. **DIMUNOVÁ, D.**, MATOUŠKOVÁ, P., PODLIPNÁ, R., BOUŠOVÁ, I., SKÁLOVÁ, L. (2022) The role of UDP-glycosyltransferases in xenobiotic-resistance. Odoslané k recenzii do časopisu *Drug Metabolism Review*.

- VI. **DIMUNOVÁ, D., NAVRÁTILOVÁ, M., KELLEROVÁ, P., AMBROŽ, M., SKÁLOVÁ, L., MATOUŠKOVÁ, P.** (2022) The induction and inhibition of UDP-glycosyltransferases in *Haemonchus contortus* and its role in the metabolism of albendazole. Odoslané k recenzii do časopisu International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance.

## 10.2. Zoznam publikácii nevzťahujúcich sa k téme práce

- **ŠPIČÁKOVÁ, A., SZOTÁKOVÁ, B., DIMUNOVÁ, D., MYSLIVEČKOVÁ, Z., KUBÍČEK, V., AMBROŽ, M., LNĚNIČKOVÁ, K., KRASULOVÁ, K., ANZENBACHER, P., SKÁLOVÁ, L.** (2017) Nerolidol and farnesol inhibit some cytochrome P450 activities but did not affect other xenobiotic-metabolizing enzymes in rat and human hepatic subcellular fractions. *Molecules*. 22: 509. IF<sub>2017</sub> = 3,098

### 10.3. Zoznam prezentácií na vedeckých konferenciách

- *Dimunová, D., Stuchlíková, L., Navrátilová, H., Matoušková, P.,* The role of the UDP-glycosyltransferases in the metabolism of anthelmintics in *Haemonchus contortus*. poster, 24<sup>th</sup> *Helminthological days* 7.5 – 11.5.2018 Vysočina, Česká republika
- *Dimunová, D., Stuchlíková, L., Matoušková, P.,* The role of the UDP-glycosyltransferases in the metabolism of anthelmintics in *Haemonchus contortus*. oral presentation, 9. *Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK* 23.1 – 24.1.2019 Hradec Králové, Česká republika
- *Dimunová, D., Stuchlíková, L., Matoušková, P.,* The role of the UDP-glycosyltransferases and the metabolism of anthelmintics, oral presentation, 10. *Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK* 22.1 – 23.1.2019 Hradec Králové, Česká republika
- *Dimunová, D., Stuchlíková, L., Matoušková, P.,* The role of the UDP-glycosyltransferases in the metabolism of anthelmintics in *Haemonchus contortus*. poster, *Anthelmintics IV: From discovery to resistance* 3.2. – 7.2.2019, Santa Monica, California, USA
- *Dimunová, D., Matoušková, P.,* The silencing of selected UDP-glycosyltransferase genes by RNAi in *Haemonchus contortus*. oral presentation, 11. *Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK* 27.1 – 28.1.2019 Hradec Králové, Česká republika
- *Dimunová, D., Navrátilová, M., Matoušková, P.,* The role of the UDP-glycosyltransferases in the metabolism of anthelmintics in *Haemonchus contortus*. oral presentation, 26<sup>th</sup> *Helminthological days* 7.5 – 11.5.2021 Deštné v Orlických horách, Česká republika
- *Dimunová, D., Navrátilová, M., Matoušková, P.,* UDP-glycosyltransferases in the metabolism of anthelmintics in *Haemonchus contortus*. 12. *Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK* 1.2 – 2.2.2022 Hradec Králové, Česká republika

