

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**ZMĚNY V METABOLISMU FLUBENDAZOLU
BĚHEM ŽIVOTNÍHO CYKLU HLÍSTICE**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Martina Navrátilová

Hradec Králové 2023

Bc. Martina Salvová

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

V Hradci Králové 08.05.2023

.....

Bc. Martina Salvová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat paní prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za její čas, trpělivost, milý a motivující přístup, a především za její odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce. Velké poděkování patří také Mgr. Martině Navrátilové za nespočet konzultací a za pomoc při práci v laboratoři a následném zpracování této diplomové práce. Mé poděkování patří rovněž celému kolektivu Katedry biochemických věd za jejich ochotu a vytvoření velmi příjemného a přátelského prostředí.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Martina Salvová

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

Název diplomové práce: **Změny v metabolismu flubendazolu během životního cyklu hlístice**

Hlístice vlasovka slezová je infekčním patogenem způsobujícím gastrointestinální haemonchózu přežvýkavců. Svůj životní cyklus má rozdělen do stádia vajíček, larev (fáze L1, L2 a L3) a dospělého jedince. Haemonchóza je časté a velmi rozšířené onemocnění hospodářských zvířat, které celosvětově působí značné ekonomické ztráty.

Jelikož je léčba haemonchózy převážně založená na farmakoterapii pomocí anthelmintik, narůstající léková rezistence vlasovky slezové vůči těmto léčivům představuje velký problém. Proto je v popředí vědeckého zájmu studium mechanismů vývoje lékové rezistence u tohoto parazita. Jedním z mechanismů rezistence může být i zvýšená schopnost deaktivace anthelmintika. V případě benzimidazolového anthelmintika flubendazolu dochází k deaktivaci redukcí karbonylové skupiny pomocí enzymů aldo-ketoreduktáz a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem. Redukcí vzniká metabolit flubendazolu se sníženým anthelmintickým účinkem a hlístice se tak chrání před účinkem anthelmintika.

Cílem této diplomové práce bylo sledování redukce flubendazolu u vajíček, larev L1 a dospělých jedinců vlasovky slezové kmene ISE (citlivého vůči anthelmintikům) a kmene IRE (rezistentního vůči benzimidazolovým anthelmintikům). Při přípravě vzorku před analýzou byla použita metoda extrakce na pevnou fázi. Redukovaný flubendazol se stanovoval pomocí HPLC analýzy s hmotnostní detekcí.

Pochopení schopností vývojových stádií deaktivovat flubendazol může dále pomáhat v boji proti anthelmintické rezistenci.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Martina Salvová

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

Title of diploma thesis: **The changes in flubendazole metabolism during life cycle of nematode**

The nematode barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) is an infectious pathogen that causes gastrointestinal haemonchosis in ruminants. Its life cycle consists of egg, larval (L1, L2 and L3) and adult stages. Haemonchosis is a common and widespread disease of farm animals, which causes significant global economic losses.

Whereas the treatment of haemonchosis is mainly based on pharmacotherapy using anthelmintics, the increasing drug resistance of barber's pole worm to these drugs is a big problem. Hence, the study of the mechanisms of the development of drug resistance in this parasite is in the foreground of scientific interest. One of the mechanisms of resistance may be an increased ability to deactivate the anthelmintics. In the case of the benzimidazole anthelmintic flubendazole, deactivation is based on a reduction of the carbonyl group by the enzymes aldo-ketoreductases and short-chain dehydrogenases/reductases. The metabolite with decreased anthelmintic efficacy is produced by the reduction of flubendazole, and in this way, nematodes protect themselves against the toxic effect of anthelmintic.

The aim of this study was to monitor the reduction of flubendazole in eggs, L1 larvae and adults of barber's pole worm of strain ISE (susceptible to anthelmintics) and strain IRE (resistant to benzimidazole anthelmintics). A solid phase extraction method was used for sample preparation before the analysis. Reduced flubendazole was quantified by HPLC analysis with mass spectrometric detection.

Understanding the abilities of development stages to inactivate flubendazole may help in the fight against anthelmintic resistance.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1 <i>Haemonchus contortus</i>	10
3.1.1 Vývojový cyklus.....	10
3.1.2 Haemonchóza.....	13
3.1.3 Terapie a prevence haemonchózy.....	14
3.1.4 Léková rezistence u <i>Haemonchus contortus</i>	17
3.2 Benzimidazolová anthelmintika	18
3.2.1 Flubendazol.....	20
3.3 Biotransformace xenobiotik.....	21
3.3.1 Redukce aldehydů a ketonů	22
3.3.2 Metabolismus xenobiotik u helmintů	25
3.3.3 Redukce FLU u <i>Haemonchus contortus</i>	27
3.4 Extrakce SPE	28
3.4.1 Moderní trendy extrakce na pevnou fázi	29
3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s hmotnostní detekcí	31
3.5.1 Hmotnostní spektrometr	32
4. Experimentální část.....	35
4.1 Přístroje a pomůcky, chemikálie, biologický materiál	35
4.1.1 Přístroje a pomůcky	35
4.1.2 Chemikálie.....	36
4.1.3 Biologický materiál.....	36
4.2 Metodika práce	37
4.2.1 Příprava roztoků.....	37

4.2.2 Zisk biologického materiálu	38
4.2.3 Inkubace <i>H. contortus</i> s FLU.....	39
4.2.4 Homogenizace	39
4.2.5 SPE.....	40
4.2.6 Rozpuštění vzorků	41
4.2.7 HPLC analýza s hmotnostní detekcí.....	41
4.2.8 BCA stanovení bílkoviny.....	43
5. Výsledky	44
5.1 BCA stanovení bílkoviny.....	44
5.1.1 Kalibrační přímka	44
5.1.2 BCA stanovení bílkoviny u vývojových stádií <i>H. contortus</i>	46
5.2 Stanovení redukce FLU u <i>H. contortus</i>	48
5.2.1 Stanovení FLU-R ve vajíčkách, larvách a dospělých	48
5.2.2 Porovnání množství FLU-R v hlísticích kmene ISE a IRE	51
5.2.3 Stanovení FLU-R v médiích	52
5.2.4 Porovnání množství FLU-R v médiích od hlístic kmene ISE a IRE	55
6. Diskuse.....	56
7. Závěr	59
8. Seznam zkratk	60
9. Použitá literatura	62

1. Úvod

Hlístice *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová) je helmint parazitující v gastrointestinálním traktu malých přežvýkavců. Způsobuje onemocnění zvané haemonchóza a napadená zvířata trpí anémií a celkovým nepospíváním. V mnoha případech dochází až ke smrti přežvýkavců. Haemonchóza je velmi častá a rozšířená nemoc, která způsobuje značné ekonomické ztráty. Její léčba je založena na podávání anthelmintik. Jednou ze skupin anthelmintik jsou benzimidazoly, do kterých patří také flubendazol (FLU).

V současné době bohužel dochází k narůstající rezistenci vlasovky slezové k benzimidazolovým anthelmintikům, což představuje velký problém v terapii. Jedním z možných mechanismů rezistence vlasovky slezové je zvýšení deaktivace anthelmintik jejich biotransformací. V případě FLU je hlístice schopna redukovat toto léčivo pomocí enzymů aldo-ketoreduktáz (AKR) a dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) na méně účinný metabolit, a tím se chránit před anthelmintickým účinkem.

V experimentální části této práce byly vzorky vajíček, larev L1 a dospělých jedinců vlasovky slezové inkubovány s FLU. Následně probíhala homogenizace a extrakce na pevnou fázi (SPE). Vzorky byly poté analyzovány pomocí HPLC-MS/MS a bylo zjištěno množství redukováného flubendazolu (FLU-R) a parentního léčiva FLU. Výsledky byly vyjádřeny jako poměr FLU-R ku FLU a byly vztaženy na 1 mg proteinu.

2. Cíl práce

Záměrem této diplomové práce bylo studovat redukci anthelmintika FLU u jednotlivých vývojových stádií hlístice *Haemonchus contortus* kmene citlivého na anthelmintika (ISE) a kmene rezistentního na benzimidazolová anthelmintika (IRE).

Dílčími cíli bylo:

- Získat vajíčka, L1 larvy a dospělce *H. contortus* kmene ISE a IRE.
- Inkubovat vajíčka, L1 larvy a dospělce se třemi různými koncentracemi FLU.
- Stanovit množství FLU a FLU-R ve vzorcích pomocí HPLC-MS/MS.
- Porovnat schopnost jednotlivých vývojových stádií redukovat FLU.
- Porovnat schopnost kmene ISE a IRE redukovat FLU.

3. Teoretická část

3.1 *Haemonchus contortus*

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), patří mezi nejvýznamnější parazity gastrointestinálního traktu hospodářských zvířat, zejména ovcí a koz. Jedná se o helminta ze třídy hlístic (*Nematoda*), kmene oblovců (*Nemathelminthes*). Druhým kmenem helmintů jsou ploštěnci (*Plathelminthes*), mezi které patří motolice a tasemnice (Čermáková *et al.*, 2009).

Vlasovka slezová je červ vláskovitého tvaru. Samci jsou morfologicky menší než samičky, dosahují cca 2 cm, samičky 3 cm. V hlavové části mají obě pohlaví kyjovitý zub, prostřednictvím kterého narušují cévy svého hostitele. Samci mají v ocasové části těla vyvinutu kopulační bursu obsahující spikuly. Samičky mají vulvu překrytou chlopní, do které při kopulaci samci zasunují své spikuly (Jurášek a Dubinský, 1993).

3.1.1 Vývojový cyklus

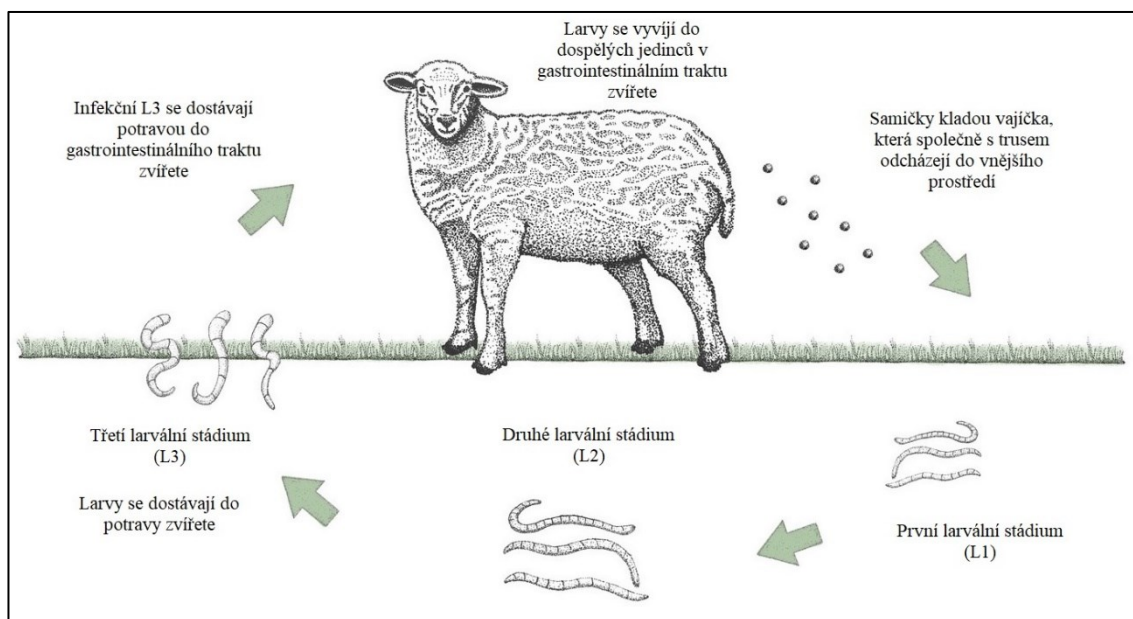
Vývojový cyklus vlasovky slezové je přímý, bez mezihostitele a lze jej rozdělit na dvě fáze: infekční uvnitř hostitele a volně žijící mimo hostitele. Dospělí jedinci přežívají ve čtvrtém žaludku trávícího ústrojí přežvýkavců, v tzv. abomasu (slezu). Zde dochází ke kopulaci mezi samičkami a samečky. Samička denně vyprodukuje 5 000-10 000 vajíček, které se trusem hostitele dostávají do okolního prostředí.

Z vajíček se do 42 hodin ve vnějším prostředí vyvinou larvy vývojového stádia L1. Poté dochází ke svléknutí kutikuly a vznikají tak larvy L2. Larvy L1 i L2 jsou nepatogenní a živí se bakteriemi vnějšího prostředí. Velký vliv na vývoj těchto volně žijících larev mají podmínky okolního prostředí.

Larvy L2 vytvářejí dále novou vrstvu kutikuly, přitom tu původní si nadále nechávají. Původní vrstva slouží jako ochrana proti mrazu. Vznikají tak larvy L3, které jsou již infekční. Hostitel pozře L3 s rostlinnou potravou a larvy L3 se dostávají do gastrointestinálního traktu, kde opět dozrávají v dospělce a množí se. Cyklus (obr. 1) se dále opakuje (Jurášek a Dubinský, 1993).

Jak již bylo řečeno, podmínky okolního prostředí mají významný vliv na vývoj vlasovky slezové. Volně žijící stádia jsou ovlivňována měnícími se fyzikálně-chemickými podmínkami a důležitou roli hraje teplota, vlhkost, parciální tlak kyslíku i oxidu uhličitého a hodnota pH (Köhler, 2006). Vlhkost musí být dostatečná (80-100 %), ideální teplota okolního prostředí je v rozmezí 18-26 °C, výskyt vlasovek je tedy nejhojnější v tropickém a subtropickém podnebném pásu. V mírném pásu zaznamenáváme období přerušného vývoje vlasovky slezové díky nižším teplotám (Emery, *et al.*, 2016).

Dospělci žijící v trávicím traktu hostitele mají dostatečný přísun živin, avšak přítomnost kyslíku je zde velmi omezená, nastávají až anoxické podmínky. Naopak koncentrace oxidu uhličitého je v trávicím traktu vysoká a vysoce ovlivňuje metabolické dráhy a líhnutí larev (Köhler, 2006). *Haemonchus contortus* je také velice odolný vůči změnám pH, jelikož v přední části trávicího traktu převládá zásaditější pH (až 9), v abomasu je naopak pH kyselé v rozmezí 1-6 (Harder, 2016).



Obrázek 1: Schéma vývojového cyklu vlasovky slezové
(převzato z: <https://www.farmhealthfirst.com/disease-solution/gastrointestinal-worms-in-sheep>)

Měnící se podmínky vnějšího prostředí vyžadují adaptaci organismu, ke které dochází díky změnám v energetickém metabolismu. Mezi vajíčky, larválními stádii L1-L3 a dospělci se vyskytují významné změny v genové transkripci pro různé enzymy (Laing, *et al.*, 2013).

Vajíčka vlasovky slezové nepřijímají žádnou potravu z vnějšího prostředí, jejich zdroj energie je tedy pouze endogenní, vzniklý z předchozích stádií parazitárního vývoje. U vajíček dochází ke zvýšení transkripce genů spojených s apoptózou, replikací DNA a celkově s tělesnou morfogenezí a vývojem (Laing *et al.*, 2013).

Při vývoji vajíček do larválního stádia L1 lze pozorovat celkové zvýšení transkripce genů pro morfogenezi. Přechod L1 k L3 je charakteristický sníženou transkripcí genů pro celkový energetický metabolismus sacharidů i lipidů. Dochází ale také ke zvýšení transkripce pro určité geny, a to geny spojené s transportem kyslíku, vazbou hemu a vznikem kobalaminu. Kobalamin se dále ukládá a je využíván L3 pro rychlejší vývoj do dospělého jedince. Je také zvýšena aktivita cytochromu P450 (CYP), což je vysvětlováno zvýšenou potřebou larev detoxikovat xenobiotika (Laing *et al.*, 2013). Obecně lze říci, že larvy využívají aerobního metabolismu a jsou schopny degradovat sacharidy prostřednictvím citrátového cyklu (Harder, 2016).

Přechod larev do stádia dospělé je doprovázen změnami, charakteristickými pro dané pohlaví. U samic dochází ke zvýšení transkripce genů spojených s embryogenezí, vznikem oocytů a vajíček. Naopak u samců dochází ke snížení transkripce genů spojených s morfogenezí těla. Samečci jsou tak menšího vzrůstu než samičky a celkově jsou méně metabolicky aktivní. Dochází u nich však ke zvýšené transkripci genů pro proteiny spermií. U obou pohlaví představuje střevo hlavní orgán trávení a detoxikace, proto zde dochází ke zvýšení transkripce genů kódujících detoxikační proteiny, genů spojených s transportem kationtů i aniontů a také aktivitou (Laing *et al.*, 2013; Harder, 2016).

Jako většina parazitů také dospělci vlasovky slezové jsou závislé na svém hostiteli (Köhler, 2006). Hlavním zdrojem energie představují sacharidy z krve hostitele, které podléhají anaerobní glykolýze (Harder, 2016). Ovšem v případě nedostatku živin z hostitele, dokážou dospělci degradovat glykogen a získat tak zdroj energie.

Energie získaná anaerobním metabolismem sacharidů u dospělců je využívána zejména na produkci vajíček samičkami a také na regulaci nervosvalového systému obou pohlaví (Köhler, 2006). Principem dobře fungujícího nervosvalového systému je přenos neurotransmiterů z presynaptických vezikul na postsynaptické receptory (Dalliere *et al.*, 2015). Klíčovou roli v transportu presynaptických vezikul hrají mikrotubuly, α -tubulin a β -tubulin. Právě β -tubulin byl zaznamenán jako hlavní cíl pro benzimidazolová anthelmintika (Harder, 2002). Dalším cílem anthelmintik představuje také vápníkem aktivovaný draslíkový kanál, který se podílí na inhibici přenosu nervosvalového signálu (Dalliere *et al.*, 2015).

3.1.2 Haemonchóza

Haemonchóza je onemocnění způsobené vlasovkou slezovou, která je považována za jednoho z nejvíce patogenních parazitů malých přežvýkavců (Harder 2016). Vzhledem k tomu, že je *H. contortus* hematofág, hlavním příznakem haemonchózy je anémie hostitele, která je patrná po 10-12 dnech od infekce (Dargie, Allonby, 1975). Haemonchóza představuje častou příčinu úmrtí zejména mladých jehňat, jelikož ta ještě nemají natolik vyvinutou imunitu vůči helmintům (Besier *et al.*, 2016). Dalším příznakem tohoto onemocnění je hypoproteinémie a s ní související edém. Výkaly hostitele jsou typicky pevné, mohou být tmavé kvůli meléně, ale nedochází k průjmu. Ten může být přítomen sekundárně při výskytu dalšího onemocnění způsobené jinými hlísticemi (Eysker, Ogunsusi, 1980). Typické pro toto onemocnění je také bledost dásní a spojivek, úbytek váhy, snížení produkce vlny a mléka ovcí a také celkové neprospívání, což vede k ekonomickým ztrátám (Crilly *et al.*, 2020).

Závažnost onemocnění silně závisí na počtu dospělých jedinců *H. contortus* v těle hostitele (Le Jambre, 1995). Byl také prokázán velký vliv potravy, kdy došlo k velkému rozdílu odolnosti zvířete vůči *H. contortus*. Byla pozorována dvě stáda ovcí, jedno stádo dostávalo stravu velmi chudou na bílkoviny, a naopak druhému stádu byly podávány doplňky stravy. U stáda s nekvalitní potravou docházelo k velmi rychlejší progresi haemonchózy (Nnadi *et al.*, 2009).

Onemocnění můžeme dle Dargieho a Allonbyho (1975) rozdělit na tři stádia: hyperakutní, akutní a chronické. Hyperakutní forma je relativně vzácná bez patrných předchozích příznaků, které by upozornili chovatele. Je také často doprovázena

hemoragickou gastritidou. Akutní formu můžeme dále rozlišit na tři stádia progresu anémie. Nejdříve dochází k počáteční ztrátě krve. Poté díky kompenzační erytropoéze nastává relativní zotavení hostitele ovšem pouze do doby vyčerpání zásobního železa. Po vyčerpání zásob nastává finální fáze konečné anémie. Chronická forma haemonchózy je charakteristická menší, ale přetrvávající infekcí. Projeví se zejména při oslabení imunitního systému hostitele, či také při špatné nutrici. Chronická forma je typická zejména pro mírný podnebný pás kvůli chladnější teplotě okolního prostředí (Besier *et al.*, 2016; Dargie a Allonby, 1975).

3.1.3 Terapie a prevence haemonchózy

Infekce způsobené parazitickými hlísticemi představují celosvětový problém a jejich komplexní terapie je založena na kombinaci anthelmintik s nefarmakologickými postupy. Mezi tyto postupy patří například řízení a kontrola kontaminace pastvin, čímž dochází k zabránění pozření larev hostitelem (Besier *et al.*, 2016) a dostatečná, kvalitní výživa, protože zvíře s lepší tělesnou kondicí prokazuje vyšší odolnost vůči nákaze *H. contortus* (Macarthur, 2013). Další možností podpory léčby je využití rostlinných přípravků, které mají anthelmintické účinky. Mezi takové rostliny patří např. pelyněk (Irum *et al.*, 2015). Taniny, což jsou sekundární metabolity rostlin čeledi růžovitých, bobovitých, bukovitých a dalších, prokázaly také anthelmintické účinky (Williams *et al.*, 2014).

Dalším nástrojem v boji proti haemonchóze je vakcinace. V současné době se podařilo identifikovat různé antigeny *H. contortus*, které se zdají být vhodné pro vývoj účinné vakcíny. Existuje komerčně dostupná vakcína Barbervax®, licencovaná v Austrálii pro použití na ovcích, která obsahuje dva skryté antigeny H11 a komplex H-gal-GP. Tato vakcína má velmi dobrou účinnost, její výroba je však náročná a je potřeba opakovaných dávek, proto se začala pozornost věnovat spíše rekombinantním vakcínám. Mezi výhody těchto vakcín je jejich stabilita v širokém rozsahu teplot a levnější výroba. Ovšem společně s nižšími náklady se také ukázala jejich nižší účinnost. Nejnovější nástroj slibné vakcinace představují DNA vakcíny, které jsou schopny vyvolat širší rozsah imunitních reakcí (Adduci *et al.*, 2022).

Nicméně dosud nejčastější způsob terapie haemonchózy představuje podávání anthelmintik. Anthelmintika jsou léčiva působící proti parazitickým červům. Jedná

se převážně o léčiva syntetického, či biosyntetického původu. Podle působení je lze rozdělit na antinematoda (léčiva proti hlísticím), anticestoda (proti tasemnicím) a antitreematoda (proti motolicím). Některá anthelmintika však mohou účinkovat současně proti více třídám červů (Dobšíková *et al.*, 2012). U anthelmintik je velmi důležité dodržovat dávkovací schéma, jelikož při poddávkování nemusí mít anthelmintik slibovanou terapeutickou účinnost a také může vést k rozvoji rezistence. Naopak předávkování často vede k toxicitě léčiv (Vercruyse a Claerebout, 2014). Existuje několik skupin anthelmintik s odlišným mechanismem účinku, v následujícím textu jsou popsány pouze vybrané skupiny těchto léčiv. Nejznámější skupina anthelmintik, benzimidazoly, je popsána samostatně v kapitole 3.2.

Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Tyto dvě skupiny anthelmintik sdílí stejný mechanismus účinku. Jedná se o agonisty nikotinu a působí proti acetylcholinovým receptorům. Imidazothiazoly mají cholinomimetickou aktivitu, dochází tak k trvalým svalovým kontrakcím, po kterých následuje depolarizace membrány a paralýza červa. Mezi nejrozšířenější zástupce imidazothiazolů patří levamisol. Jedná se o širokospektrální anthelmintikum, které zůstává obecně účinné proti *H. contortus* v oblastech s menším výskytem infekce. V endemických oblastech narůstá rezistence, která se zdá být spojená se ztrátou cholinergních receptorů (Playford *et al.*, 2014). Mezi zástupce tetrahydropyrimidinů patří pyrantel a morantel. Tato léčiva se používají u malých přežvýkavců proti dospělčům i larvám gastrointestinálních hlístic. Jejich nevýhodou je nestálost suspenze na světle, musí se tedy uchovávat ve tmě. Dále by se neměla používat na oslabená zvířata, jelikož mohou prokazovat nežádoucí a toxické účinky (Vercruyse a Claerebout, 2014).

Organofosfáty

Tato skupina anthelmintik inhibuje acetylcholinesterázu, což má za následek inhibici cholinergního přenosu a následuje paralýza helminta (Vercruyse a Claerebout, 2014). Svým účinkem jsou potenciálně toxické nejen pro helminty ale také pro hostitele. Proto je velmi důležité dodržet dávkování. Organofosfáty nejsou používány univerzálně, jedná se o úzce-spektrální anthelmintika, která se používají při výskytu rezistence na jiné skupiny anthelmintik. *H. contortus* je poměrně dobře citlivý vůči této skupině. Avšak u ostatních hlístic, zejména larválních stádií, je citlivost o dost nižší (Besier *et al.*, 2016).

Makrocyclické laktony

Cílovým místem působení makrocyclických laktonů jsou glutamátové receptory chloridových kanálů v nervových buňkách červů. Dochází k otevření těchto kanálů, přílivu chloridových iontů a následně vzniká paralýza zejména hltanu, ale i dalších svalů v těle parazita. Kvůli paralýze hltanu není červ schopen dále přijímat potravu, a tak vyhladoví a zemře. Pravděpodobně z důvodu absence glutamátového receptoru na chloridovém kanálu u tasemnic a motolic, nejsou makrocyclické laktony účinné vůči této skupině parazitů. Mezi makrocyclické laktony řadíme avermektiny a milbemyliny. Jedná se o produkty bakterií rodu *Streptomyces*. Nejznámějším a nejvíce používaným zástupcem avermektinů je ivermektin. Obecně lze říci, že makrocyclické laktony mají vysokou účinnost vůči hlísticím (Vercruyse a Claerebout, 2014). V endemických oblastech je ovšem rezistence *H. contortus* na ivermektin poměrně rozšířená a zvyšuje se také rezistence vůči moxidektinu, což je komerčně dostupný milbemylin (Kaplan a Vidyashankar, 2012; Prichard *et al.*, 2012).

Amino-acetonitrilové deriváty

V této skupině je pouze jeden komerčně dostupný zástupce, a to monepantel. Působí na acetylcholinové receptory, podobně jako imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny, a způsobují tak paralýzu parazita. Jedná se o syntetické sloučeniny s vysokou aktivitou vůči hlísticím (Vercruyse a Claerebout, 2014). Ovšem i u této skupiny byl hlášen vznik rezistence vlasovky slezové (Van den Brom *et al.*, 2015).

Salicylanilidy a substituované fenoly

Mechanismus účinku těchto anthelmintik je založen na inhibici energetického metabolismu. Působí jako protonové translokátory, způsobují únik vodíkových iontů přes vnitřní mitochondriální membránu, a tím dochází k přerušení oxidativní fosforylace. Mezi zástupce této skupiny patří klosantel a disofenol (Vercruyse a Claerebout, 2014). Salicylanilidy a substituované fenoly jsou široce používány v léčbě haemonchózy. Jedná se o citlivá léčiva vůči *H. contortus*, avšak opět jejich nadužívání vedlo v endemických oblastech ke vzniku snížené účinnosti a postupné rezistence (Playford *et al.*, 2014).

Spiroindoly

Derquantel, zástupce spiroindolů, působí jako antagonist a nikotin-acetylcholinových receptorů a dochází tak k ochablé paralýze parazita. Používá se pouze v kombinaci s abamektinem, což je zástupce avermektinů z makrocyclických laktonů. Tato kombinace anthelmintik ukázala vysokou účinnost vůči *H. contortus*, zejména proti dospělým jedincům (Little *et al.*, 2011; Vercruyse a Claerebout, 2014).

3.1.4 Léková rezistence u *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus je geneticky velmi heterogenní hlístice, čehož bylo využito při vytvoření kmene rezistentního a citlivého na benzimidazolová anthelmintika. Pomocí tzv. inbreedingu byl vytvořen citlivý kmen ISE („*Inbred Susceptible Edinburgh*“) a rezistentní kmen IRE („*Inbred Resistant Edinburgh*“). Studium těchto kmenů spočívá v analýze polymorfismu restrikčních fragmentů, variability mikrosatelitů a polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů. Díky objasnění principů heterogenity ISE a IRE kmenů, můžeme lépe pochopit mechanismy rezistence *H. contortus* (Roos *et al.*, 2003).

Mechanismy lékové rezistence lze rozdělit na farmakodynamické a farmakokinetické. Mezi farmakodynamické mechanismy patří snížení počtu či změna struktury cílových molekul, na která léčiva působí. V případě rezistence na benzimidazolová anthelmintika byly prokázány jednonukleotidové polymorfismy β -tubulinu a dochází tak ke změně jeho struktury. Benzimidazolová anthelmintika pak nejsou schopna se na β -tubulin navázat (Chaudhry *et al.*, 2015).

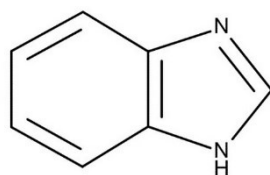
Farmakokinetické mechanismy lékové rezistence obecně zahrnují zrychlený eflux léčiva z buňky. Influx i eflux FLU u dospělců *H. contortus* je zprostředkováván pasivní difúzí díky velké lipofilitě molekuly FLU. Aktivní vyplavování FLU z těla dospělých jedinců *H. contortus* nebylo prokázáno, a tak se pravděpodobně nejedná o mechanismus lékové rezistence této hlístice (Bártíková *et al.*, 2011).

Dalším farmakokinetickým mechanismem lékové rezistence je inaktivace léčiva pomocí zvýšené exprese enzymů metabolizujících xenobiotika, jako například enzymu reduktáza (Stuchlíková *et al.*, 2018). Studie porovnávající redukci FLU u ISE a IRE kmenů dospělců *H. contortus* prokázala zvýšenou aktivitu reduktázy u IRE kmene

(Vokřál *et al.*, 2012). Tento výsledek dokazuje detoxikační a ochrannou aktivitu reduktázy před účinkem benzimidazolových anthelmintik.

3.2 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazoly jsou početnou chemickou skupinou anthelmintik, která se využívají k léčbě infekcí způsobené hlísticemi a motolicemi. Jedná se o heterocyklické aromatické sloučeniny se společným chemickým základem složeného z benzenového a imidazolového jádra (obr. 2). Sumární vzorec benzimidazolu je $C_7H_6N_2$.



Obrázek 2: Strukturální vzorec benzimidazolu
(převzato z: https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Benzimidazole,MDA_CHEM-821956)

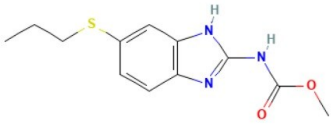
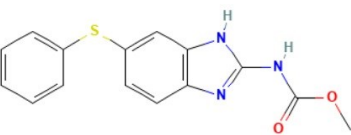
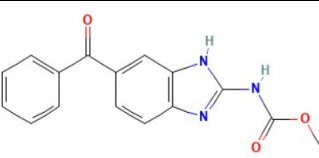
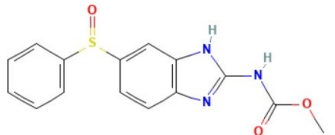
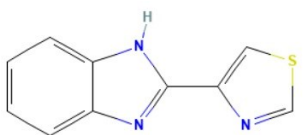
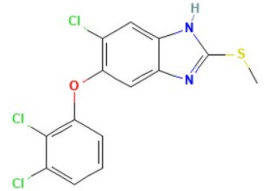
Mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik je inhibice polymerace mikrotubul. Benzimidazoly se naváží na mikrotubulovou podjednotku β -tubulin. Ztrátou mikrotubul dojde k narušení buněčné homeostázy, inhibici energetického metabolismu a následnému usmrcení parazita. Mezi další mechanismy účinku benzimidazolů patří inhibice enzymu fumarátreduktázy, snížený transport glukózy a také rozpojení oxidativní fosforylace (Furtado, 2016).

Klíčovým faktorem účinnosti benzimidazolů je délka expozice parazita vůči těmto léčivům. Z tohoto důvodu byly experimentálně a následně i komerčně vyvinuty léčiva s postupným uvolňováním (McKellar a Jackson, 2004). Přestože jsou benzimidazoly široce používanou skupinou anthelmintik, ne vždy je dosaženo očekávaného terapeutického efektu, zejména kvůli změně farmakokinetiky léčiv.

Farmakokinetika benzimidazolů se liší mezi druhy zvířat, dalšími faktory jsou pohlaví, stáří, přidružené nemoci a fyziologický stav hostitele, užívané léky a potrava. To vše má vliv na farmakokinetiku benzimidazolů a následnou variabilitu v terapeutickém efektu. Největší vliv ve farmakokinetickém procesu těchto léčiv se zdají mít fáze absorpce a metabolismu (Křížová-Forstová *et al.*, 2010).

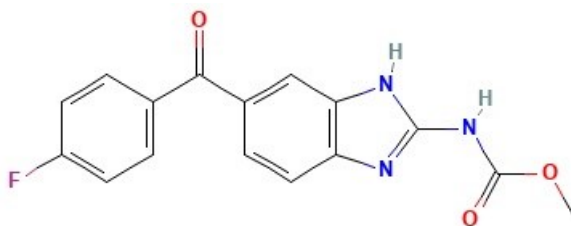
Již na počátku 60. let 20. století bylo uvedeno na trh první léčivo z této skupiny, thiabendazol. Od konce 70. let se začala široce používat další léčiva ze třídy benzimidazolů (McKellar a Jackson, 2004). V následující tabulce 1 jsou uvedeny nejpoužívanější benzimidazolová anthelmintika.

Tabulka 1: Zástupci benzimidazolových anthelmintik
(zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Benzimidazolové anthelmintikum	Chemický název	Strukturní vzorec	Molekulová hmotnost (g/mol)
Albendazol	methyl N-(6-propylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)karbamát		265,33
Fenbendazol	methyl N-(6-fenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)karbamát		299,30
Mebendazol	methyl N-(6-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)karbamát		295,29
Oxfendazol	methyl N-[6-(benzensulfinylyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát		315,30
Thiabendazol	4-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-thiazole		201,25
Triklabendazol	6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylsulfanyl-1H-benzimidazol		359,70

3.2.1 Flubendazol

FLU je krystalická látka s chemickým názvem methyl-N-[6-(4-fluorobenzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát. Svou strukturou je řazen do třídy benzimidazolových anthelmintik. Je strukturně velmi podobný staršímu anthelmintiku mebendazolu, na benzenovém kruhu má však v poloze para navázán fluor. Jeho sumární vzorec je $C_{16}H_{12}FN_3O_3$. Molekulová hmotnost FLU činí 313,28 g/mol (*National Center for Biotechnology Information*, 2023). Strukturní vzorec FLU je znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3: Struktura FLU
(převzato z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/35802>)

FLU je dobře rozpustný v dimethylsulfoxidu (DMSO), čehož bylo využito v experimentální části této práce. Naopak je špatně rozpustný ve vodě, což také ovlivňuje jeho lékovou formu a biologickou dostupnost. Za účelem zvýšení rozpustnosti FLU ve vodě mohou být použity různé chemické látky jako tenzidy či cyklodextriny (Jiaojiao *et al.*, 2019).

Jako širokospektrální benzimidazolové anthelmintikum má FLU celosvětové užití. Jeho mechanismus účinku je stejný jako pro celou skupinu benzimidazolových anthelmintik a spočívá v navázání na tubulin, a tím narušení struktury a funkce mikrotubulů.

Mimo anthelmintické účinky se v posledních letech zkoumala také slibná protinádorová aktivita FLU. Ukázalo se, že toto léčivo hrálo roli u různých typů rakoviny, např. melanomu, rakoviny prsu, prostaty a plic. Úplný protinádorový mechanismus FLU nebyl stále pochopen a v současné době probíhá mnoho vědeckých výzkumů na toto téma (Chen C. *et al.*, 2022).

3.3 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou látky, které organismus přijímá ze svého okolí a nemůže je využít jako zdroj energie nebo prekurzorů pro výstavbu svých makromolekul. Po příjmu xenobiotik do organismu nastává jejich metabolismus. Metabolismus xenobiotik zahrnuje jejich biotransformaci (tj. přeměnu struktury) a jejich transport. Xenobiotika mají často škodlivý účinek a organismus se pomocí metabolismu snaží těchto látek zbavit. Mezi taková xenobiotika patří například polutanty životního prostředí, barviva, aditiva, toxiny a pesticidy. Xenobiotika mohou být ale také látky prospěšné jako například léčiva nebo zdraví prospěšné sekundární metabolity rostlin. Existují tzv. pro-léčiva, která jsou v neaktivní formě a až díky biotransformaci dochází k jejich aktivaci. Výsledkem biotransformace, tedy kromě detoxikace organismu a aktivace pro-léčiv, může být také děj škodlivý, a to přeměna léčiva na látky více toxické. U takových léčiv je vždy nutné zvážit, zda terapeutický efekt přesahuje ten toxický (Skálová *et al.*, 2017).

Na metabolismu xenobiotik se podílejí tzv. biotransformační enzymy a přenašeče xenobiotik. Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika za účelem snížení aktivity, omezení distribuce a zrychlení eliminace. Dochází ke snížení lipofility parentní látky a vzniká tak hydrofilnější metabolit, který je snáze eliminován z organismu (Skálová *et al.*, 2017).

Biotransformace xenobiotik probíhá ve dvou krocích. První fáze, nazývaná konverze, zahrnuje zejména oxidaci, redukci, hydrolýzu, hydrataci a izomeraci. Obecně dochází k odkrytí či vnesení funkčních skupin do molekuly xenobiotika. Ve druhé fázi, tzv. konjugaci, dochází k reakci metabolitu s endogenní sloučeninou, která obsahuje ionizovatelné skupiny a je navázána na makroergní kofaktor. Mezi konjugační reakce druhé fáze patří glukuronidace, sulfonace, metylace, acetylace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami. Jedná se o endergonické reakce, do kterých se musí dodat energie. Biotransformační cesty látek mohou být velmi složité a z jedné parentní látky může vznikat několik dalších metabolitů (Skálová *et al.*, 2017).

3.3.1 Redukce aldehydů a ketonů

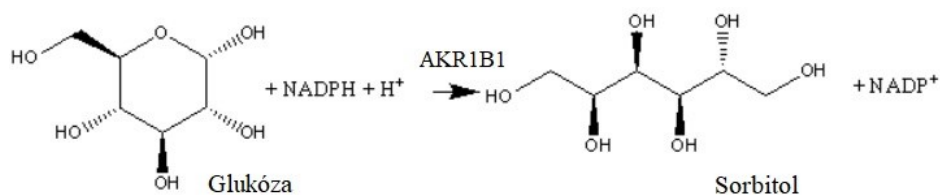
Redukce patří mezi reakce první fáze biotransformace léčiv. V molekule xenobiotika dochází k adici dvou atomů vodíku nebo k odštěpení jednoho atomu kyslíku. K redukci dochází například na karbonylové skupině, jak je tomu u FLU. Výsledný alkohol se snadněji konjuguje a eliminuje. Redukci karbonylových skupin zprostředkovávají enzymy redukující karbonyl, které můžeme rozdělit do tří nadrodin – AKR, SDR a dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem (Skálová *et al.*, 2017).

AKR

Jedná se o cytosolové enzymy většiny živých organismů. Jsou závislé na NADPH a ve většině případů katalyzují redukci aldehydů za vzniku primárního alkoholu a také redukci ketonů za vzniku sekundárního alkoholu. Nomenklatura těchto enzymů se skládá ze zkratky AKR, dále následuje číslice, představující rodinu, písmeno, které reprezentuje podrodinu a poslední číslice vypovídající o unikátní proteinové sekvenci (Skálová *et al.*, 2017). Tyto enzymy se nejčastěji vyskytují jako monomery o molekulové hmotnosti 34-37 kDa. Ve válcovité struktuře AKR enzymů se střídají α -helixy a β -řetězce. Na zadní straně válce se vyskytují tři velké smyčky, které pomáhají definovat substrátovou specifitu pomocí navázání různých aminokyselin do vazebné kapsy (Penning, 2021). AKR jsou obecně málo selektivní a reagují jak s látkami endogenními, tak i xenobiotiky (Skálová *et al.*, 2017).

V současné době bylo identifikováno více než 190 enzymů nadrodiny AKR, které lze roztrždit do 18 rodin (Yu *et al.*, 2020). U mnoha lidských AKR byla prokázána nadměrná exprese v souvislosti s výskytem různých typů rakoviny a mohly by tak být brány jako nádorové biomarkery. Zvýšená tvorba AKR při oxidačním a elektrofilním strese přispívá k rezistenci vůči protinádorovým chemoterapeutikům a antihormonálním terapiím. Příkladem jsou enzymy AKR1A1 a AKR1B1, které se ve vyšší míře vyskytovaly u pacientů nereagujících na léčbu s rakovinou pankreatu (Penning, 2021). Lidské AKR mají také spojitost s mnoha dalšími patologickými stavy, např. s diabetickými komplikacemi, deficitem žlučových kyselin, poruchami signalizace kyseliny retinové a mnoha dalšími (Penning, 2015). AKR1B1 redukuje glukózu

na sorbitol (obr. 4) a hraje tak roli při hyperglykemickém poškození tkání u diabetu (Skálová *et al.*, 2017).

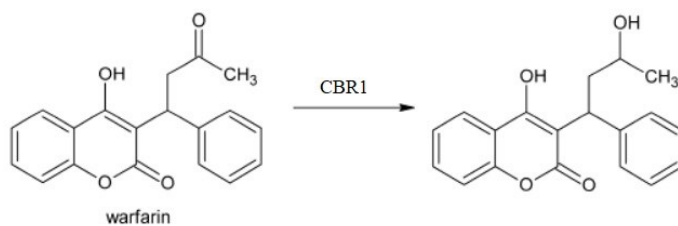


Obrázek 4: Redukce glukózy na sorbitol pomocí AKR1B1
(převzato z: <https://www.sas.upenn.edu/~patann/AldehydeReductase.htm>)

SDR

Nadrodina SDR je nejpočetnější skupinou enzymů, do které se řadí přes 160 000 proteinů (Gräff *et al.*, 2019). Bylo charakterizováno 200 rodin SDR enzymů, z toho 48 rodin obsahuje lidské SDR (Gabrielli *et al.*, 2022). Tyto enzymy se vyskytují ve všech organismech. Jedná se o strukturně variabilní NADPH-dependentní proteiny, jejichž společným znakem v terciární struktuře je typické vazebné místo pro NADPH a charakteristická struktura Rosmannova záhybu, ve kterém se vyskytuje stejná katalytická tetráda Asn-Ser-Tyr-Lys, zprostředkovávající katalýzu různých substrátů (Kavanagh *et al.*, 2008). Celkově se mezi sebou však ve své primární struktuře SDR enzymy liší a jejich heterogenita stoupá směrem k jejich C-koncům. Zde se nacházejí aminokyseliny zodpovědné za vazebné místo substrátu, které určují substrátovou selektivitu enzymu (Gabrielli *et al.*, 2022).

SDR katalyzují mimo jiné i redukční reakce a do této nadrodiny patří i několik izoform karbonylreduktáz (CBR; Hoffman a Maser, 2008). Enzymy SDR hrají významnou roli v metabolismu xenobiotik, avšak mnohé mají důležitou fyziologickou funkci (Malátková *et al.*, 2010). V poslední době byl prokázán vliv CBR 1 na regulaci glukokortikoidů v tukové tkáni myši a ovlivnění glukózové tolerance (Bell *et al.*, 2021). V lidském organismu hraje CBR 1 významnou roli při metabolismu mnoha léčiv, např. warfarinu (obr. 5). Vyskytuje se zejména v játrech a CNS, což poukazuje na její ochrannou aktivitu vůči toxickým xenobiotikům (Skálová *et al.*, 2017).



Obrázek 5: Redukce warfarinu pomocí CBR1
(převzato z: Skálová *et al.*, 2017)

Dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem

Tato nadrodina je složena z více než 1000 strukturně variabilních enzymů zařazených do osmi rodin. Patří zde tři rodiny alkoholdehydrogenáz, následují rodiny mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce, acyl-CoA-reduktáz, leukotrien-B4-dehydrogenáz, polyoldehydrogenáz a chinonreduktáz (Skálová *et al.*, 2017).

Do rodiny chinonreduktáz byl zařazen na základě analýzy aminokyselinové sekvence také enzym Ymr152wp, ačkoliv u něj nebyla zaznamenána žádná chinonreduktázová aktivita. Jedná se o enzym kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a katalyzuje redukci aldehydů za přítomnosti kofaktoru NADPH. Aldehydy mohou představovat v *Saccharomyces cerevisiae* jedny z hlavních inhibitorů buněčného růstu a fermentace. Pomocí aldehydreduktáz je schopna kvasinka detoxikovat aldehydy na méně toxické či netoxické alkoholy. Ymr152wp se tedy zdá mít v *Saccharomyces cerevisiae* ochrannou funkci (Ouyang *et al.*, 2020).

Mezi dehydrogenázy se středně dlouhým řetězcem patří také enzym acyl-CoA-dehydrogenáza. Tento enzym se účastní β -oxidace mastných kyselin a hraje významnou roli v období hladovění. Deficit acyl-CoA dehydrogenázy je jednou z nejčastějších poruch β -oxidace mastných kyselin. Jedná se o vrozené onemocnění vzniklé mutací v genu ACADM (Ibrahim a Temtem, 2022).

3.3.2 Metabolismus xenobiotik u helmintů

Metabolismus xenobiotik helmintů je různorodý a výrazně se liší od savčího metabolismu. Rozdíly se vyskytují také mezi druhy helmintů, a dokonce byly prokázány rozdíly i mezi jednotlivými izoláty. Obecně lze říci, že helminti produkují méně metabolitů než savci, některé metabolity jsou však specifické pouze pro helminty (Matoušková *et al.*, 2016).

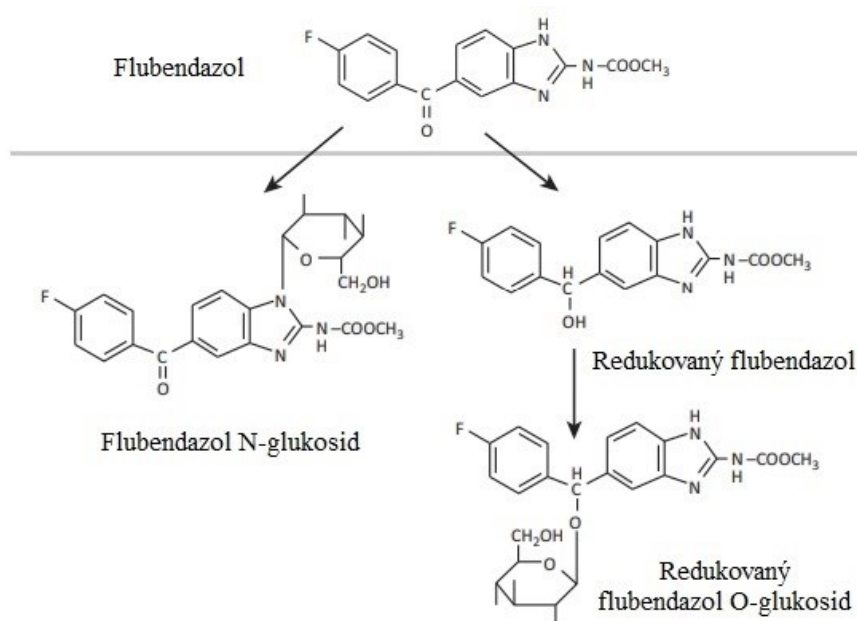
V první fázi biotransformace xenobiotik hrají důležitou roli CYP450. U helmintů nebyly tyto enzymy zpočátku detekovány, nyní je však potvrzen jejich výskyt i význam v biotransformaci xenobiotik u helmintů. Jedná se o enzymy zejména s monooxygenační aktivitou. Monooxygenace zahrnuje reakce hydroxylace, dealkylace, dekarboxylace a také izomerace. CYP má však také schopnost působit jako reduktáza či peroxidáza. U motolic, tasemnic, ploštěnců a krevniček byl popsán pouze jeden gen pro tento enzym (Tsai *et al.*, 2013; Pakharukova *et al.*, 2012). Oproti tomu *H. contortus* a jiné hlístice obsahují více genů a jsou schopny tyto enzymy exprimovat v různých vývojových stádiích. Zejména CYP34 a CYP35 může hrát významnou roli v metabolismu xenobiotik a lékové rezistenci hlístic (Laing *et al.*, 2015).

Dalším typem reakcí první fáze biotransformace je redukce. Redukční reakce jsou obecně méně časté než oxidační, ovšem v případě mnoha xenobiotik představují hlavní metabolickou dráhu (Matoušková *et al.*, 2016). Zvýšená aktivita reduktáz byla pozorována zejména u motolic (Scarcella *et al.*, 2013), poté také u dvou druhů tasemnic (Prchal *et al.*, 2015; Bártíková *et al.*, 2012). Jelikož tato práce je zaměřená na studium redukce FLU u *H. contortus* je tato problematika samostatně popsána v kapitole 3.3.3.

Ve druhé fázi biotransformace xenobiotik hrají důležitou roli enzymy transferázy. Glutathion-S-transferázy (GST) zejména spojují xenobiotikum, či metabolit vzniklý v první fázi, s endogenním glutathionem. Byly však popsány také jiné funkce GST (Oakley, 2011). U helmintů se GST účastní detoxikace lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin, které vznikají při oxidačním stresu. GST by mohly být schopny katalyzovat konjugaci glutathionu s anthelmintiky, avšak žádné takové konjugáty nebyly u helmintů doposud identifikovány. Proto se GST u helmintů bere spíše jako protein vázající léčivo než enzym metabolizující xenobiotika (Matoušková *et al.*,

2016). Přímá účast GST na rezistenci vůči léčivům dosud nebyla prokázána. U *H. contortus* byla zaznamenána vyšší exprese GST u larev s vyšší odolností proti vysychání (Yang et al., 2015). GST helmintů jsou také považovány za zajímavý cíl pro vakcinaci (Azeez et al., 2012).

Dalšími důležitými transferázami u helmintů jsou UDP-glykosyltransferázy (UGT). Jedná se o enzymy katalyzující připojení glykosylu na lipofilní metabolit, tím dochází ke zvýšení hydrofility a usnadnění efluxu. Zdrojem glykosylové skupiny mohou být např. kyselina UDP-glukuronová či UDP-glukóza, jedná se pak o reakce glukuronidace a glukosidace (Matoušková et al., 2016). U obratlovců je glukosidace neobvyklou metabolickou dráhou, ovšem u helmintů se jedná o významnou cestu. U *H. contortus* byla glukosidace popsána jako deaktiváční cesta pro benzimidazolová anthelmintika (Vokřál et al., 2012). *H. contortus* je schopen glukosidovat FLU přímo nebo dochází k jeho redukci a následné glukosidaci (obr. 6). Patrně se tedy jedná také o způsob helmintů, jak odolávat účinku anthelmintik. Také u UGT existuje výrazná mezidruhová variabilita. Například u *H. contortus* bylo identifikováno 34 genů pro UGT (Laing et al., 2013), ale u tasemnic žádné geny UGT nalezeny nebyly (Tsai et al., 2013).



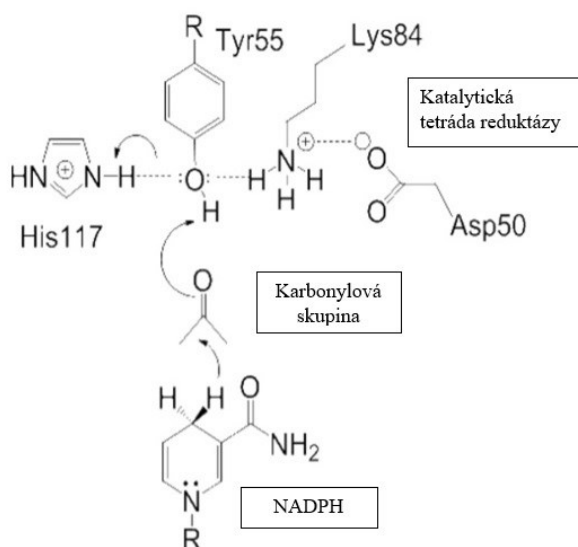
Obrázek 6: Schéma biotransformace FLU ve vlasovce slezové (převzato z: Stuchlíková et al., 2018)

3.3.3 Redukce FLU u *Haemonchus contortus*

V genomech helmintů je přítomen vysoký počet genů AKR a SDR, které by mohly katalyzovat redukci karbonylové skupiny xenobiotik (Barrett 2009). *H. contortus* má ve svém genomu 70 genů SDR a 24 genů AKR (Laing *et al.*, 2016). K redukci karbonylové skupiny dochází nejen u FLU, ale také u anthelmintika mebendazolu.

Při studiu metabolismu FLU u dospělců *H. contortus* byl stanoven pouze jeden hlavní metabolit první fáze biotransformace, a to FLU-R. (Cvilink *et al.*, 2007). Mechanismus redukce karbonylové skupiny je znázorněn na obrázku 7. Další biotransformační produkty, konjugáty FLU a FLU-R s glukózou, představují metabolity druhé fáze biotransformace (Vokřál *et al.*, 2012).

Redukce FLU u *H. contortus* je stereospecifická. Z 90 % dochází při redukci ke vzniku levotočivého enantiomeru FLU-R, ve zbylých 10 % vzniká pravotočivý enantiomer. Podmínkou redukce FLU je přítomnost NADPH, jelikož AKR i SDR jsou NADPH-dependentní reductázy. Podle stanovených kinetických parametrů lze říci, že redukce FLU neprobíhá příliš rychle, ovšem afinita reductáz v *H. contortus* k FLU je poměrně vysoká (Cvilink *et al.*, 2007). Ve studii porovnávající samičky a samce *H. contortus* bylo stanoveno vyšší množství redukovaného FLU u samic, čímž byla dokázána jejich vyšší metabolická aktivita (Stuchlíková *et al.*, 2018).

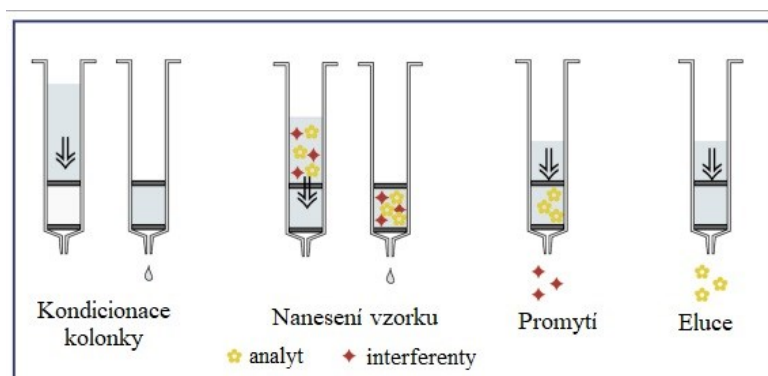


Obrázek 7: Mechanismus redukce karbonylové skupiny (převzato z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25304492/>)

3.4 Extrakce SPE

Preanalytická fáze má významný vliv na výsledky celé analýzy vzorku. Do této fáze patří také úprava vzorku, která je nesmírně důležitá, jelikož biologický, ale také environmentální, materiál je tvořen komplexní matricí. Matrice představuje veškeré přítomné látky ve vzorku, které mohou komplikovat stanovení analyzované látky (Opekar *et al.*, 2002). Při úpravě vzorku dochází k odstranění těchto nežádoucích látek, které by mohly způsobovat interference, a tím dojde ke zvýšení selektivity metody a také k eliminaci rizika poškození analytického systému. Mezi metody úprav kapalných vzorků patří precipitace proteinů, extrakce z kapaliny do kapaliny (*liquid-liquid extraction*) a také extrakce na pevnou fázi (*solid-phase extraction*; SPE), která byla použita v této práci.

SPE je založena na interakci analytu se sorbentem v kolonce a jeho následné eluci. Nejdříve je nutné SPE kolonku aktivovat a solvatovat. K tomu dochází díky obalení suchých neaktivních částic sorbentu vrstvou organického rozpouštědla, např. acetonitrilu. Dochází k úpravě prostředí pro ideální zadržení analytu (Horák *et al.*, 2006). Tato úvodní fáze se nazývá kondicionace. Následuje fáze nanesení vzorku. Vzorek s analytem nesmí kolonkou procházet příliš rychle, aby mohlo dojít k zadržení analytu na kolonce. Poté následuje fáze promývání. V této fázi dochází k odstranění balastních látek matrice a nesmí dojít k vymytí analytu, používá se proto rozpouštědlo, ve kterém není daný analyt rozpustný. V poslední fázi, eluci, dochází k narušení interakce analytu se sorbentem díky rozpouštědlu s vysokou eluční silou (Sobotníková, 2004). Princip SPE je znázorněn na následujícím obrázku 8.



Obrázek 8: Obecný princip postupu SPE
(převzato z: https://www.mdpi.com/ijms/ijms-12-05908/article_deploy/html/images/ijms-12-05908f6-1024.png)

3.4.1 Moderní trendy extrakce na pevnou fázi

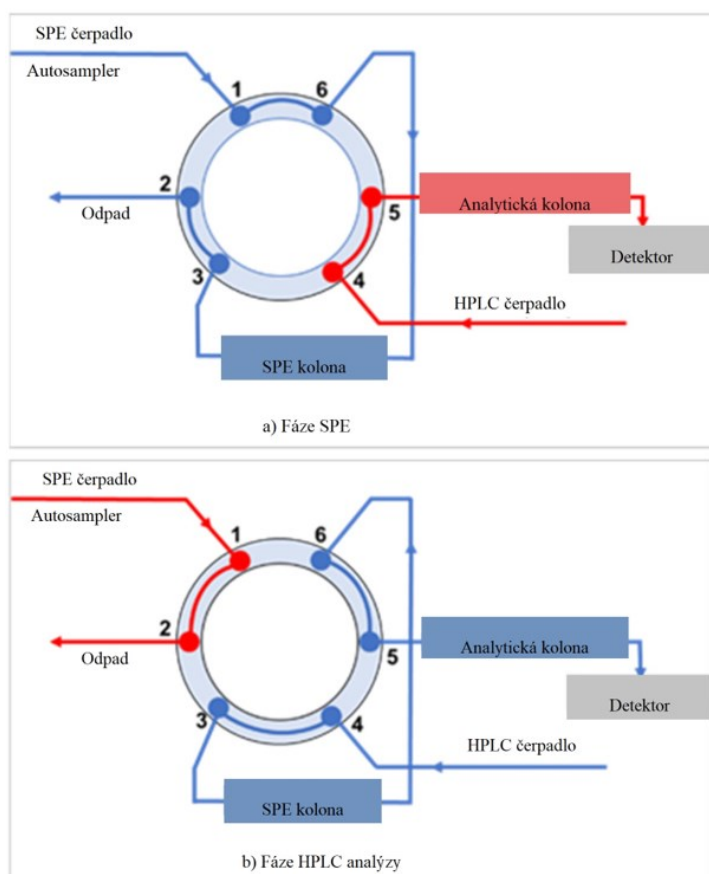
Snaha překonat problémy analýzy spojené zejména s úpravou vzorků, vede k zavedení nových moderních technik SPE. Mezi celkové nevýhody SPE patří časová náročnost a v mnohých případech také nedostačující citlivost. Moderní trendy směřují k zavedení rychlejších analýz, k ekologické šetrnosti a ke zvýšení citlivosti a účinnosti dané metody (Li *et al.*, 2021).

Prioritou vývoje ve farmaceutické bioanalýze pro zlepšení adsorpční schopnosti SPE metody jsou nové sorbenty. Mezi klasické a stále komerčně dostupné sorbenty patří modifikovaný silikagel, polymery a grafitický uhlík. Avšak vývojový trend moderních sorbentů představují novější materiály. Mezi ty řadíme například nanovlákná, která mají velký potenciál pro extrakční techniky, jelikož se vyznačují dobrou adsorpční schopností (Háková *et al.*, 2020). Nanovlákná byla také využita pro extrakci antihypertenzních léčiv ze vzorků plazmy a moči. Metoda vykazovala vyšší účinnost extrakce díky zajištění hydrofobních a vodíkových vazeb a také π - π interakcí s cílovými analyty. Byl stanoven nízký limit detekce, což poukazuje na vysokou citlivost metody (Amini *et al.*, 2020).

Miniaturizace a automatizace představují další směry moderní inovace SPE. Jednu z metod miniaturizované SPE představuje mikro-SPE ve špičkách pipet (π -SPE-PT). Jedná se o metodu, která byla zkoumána pro extrakci statinů z biologických materiálů (Vlčková *et al.*, 2017). V této studii se podařilo prokázat účinnost nově vyrobených špiček oproti komerčně dostupným špičkám, u kterých musela být provedena také protein precipitace, čímž byla prodloužena celková doba analýzy. Další modifikací mikro-SPE je provedení všech kroků pomocí odstředění v centrifuze. Tato metoda využívá rotační kolony a dochází ke snížení celkových objemů rozpouštědel i vzorku, a tím ke snížení celkových nákladů. Metoda byla využita například pro stanovení β -blokátorů z lidské plazmy (Mompó-Roselló *et al.*, 2020). Další modifikací mikroextrakce na pevné fázi (SPME) je extrakce analytu na vlákno, které je umístěno nad vzorek v tzv. „head-space“ provedení a po uplynutí předem definované doby se vlákno vytáhne pro termální desorpci. Tato metoda je typická ve spojení s plynovou chromatografií při analýze těkavých látek (Kučera, 2020). Zároveň se jedná o minimálně invazivní metodu, kterou je výhodné používat pro *in vivo* analýzu. Například Bojko *et al.* (2014) provedli extrakci biomarkerů, léčiv a jejich metabolitů v játrech a plicích pomocí mikrosondy během transplantace orgánů. Navržená SPME metoda nezpůsobila žádné

poškození orgánů a tkání. Jednou z dalších možností *in vivo* SPME je extrakce léčiv z rostlin a následné hodnocení toxikologických účinků léčiv na živé rostliny (Zhang *et al.*, 2019).

Automatizace SPE představuje výrazné šetření práce i času v analytickém procesu. To vede ke snížení možnosti zavedení chyb, jako například kontaminace či ztráty extraktu. Online-SPE ve spojení s kapalinovou chromatografií umožňuje přečištění vzorku, zakoncentrování a stanovení analytu v jednom přístroji během pár minut (Li *et al.*, 2021). Provedení online-SPE je však omezeno na přístrojové vybavení laboratoře. Systém online-SPE pracuje pomocí dvou čerpadel a přepínání vícecestného ventilu. Automatický dávkovač a čerpadlo pro SPE extrakci nadávkuje vzorek na SPE kolonku a dojde k promytí a odplavení balastních látek do odpadu (obr. 9a). Po přepnutí ventilu a zapnutí čerpadla pro HPLC analýzu dojde k eluci analytu z SPE kolonky na HPLC kolonku, na které dochází k separaci (obr. 9b). Poté následuje detekce analytu, například pomocí hmotnostní spektrometrie (Belay *et al.*, 2022). Automatizované metody, spojující extrakci, separaci a detekci, jsou v posledních letech velmi oblíbené, jelikož dochází ke zkrácení celkové doby analýzy a ke snížení manuální náročnosti, a díky tomu je možno zpracovat více vzorků (Li *et al.*, 2021).



Obrázek 9: online-SPE
(převzato z: Belay *et al.*, 2022)

3.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s hmotnostní detekcí

HPLC (*High-performance liquid chromatography*) představuje separační metodu založenou na rozdělení analytů mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. HPLC metoda patří k velmi často používaným metodám ve výzkumu i průmyslu (Nováková *et al.*, 2013). Slouží k separaci, identifikaci i kvantifikaci široké škály analytů, jako například i benzimidazolových anthelmintik (Chen L. *et al.*, 2021).

Podle typu stacionární a mobilní fáze rozlišujeme například chromatografii s normálními (NP-HPLC) či reverzními (RP-HPLC) fázemi. RP-HPLC pracuje s polární mobilní fází a nepolární stacionární fází. Jako nepolární stacionární fáze se často využívá modifikovaný silikagel. Jednou z možností modifikace silikagelu je navázání nepolárních uhlíkových řetězců C18 na silanolové skupiny. Tento typ sorbentu byl použit v experimentální části této práce. Jako mobilní fáze se často používá směs polárních rozpouštědel, nejčastěji vody a acetonitrilu (ACN) či methanolu (Dong, 2019).

Kapalinový chromatograf je složen ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovače mobilní fáze, směšovače, vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku, předkolony a analytické kolony, termostatu a detektoru (Karlíček, 2013). Mobilní fáze je díky odplyňovači zbavována bublinek vzduchu, které vyvolávají změny tlaku v celém systému a také zvyšují šum pozadí na chromatogramu. Směšovač slouží pro smíchání mobilní fáze podle předem nastaveného poměru a v průběhu analýzy dochází ke změnám složení gradientové eluce. Předkolona chrání analytickou kolonu před poškozením mechanickými nečistotami, je naplněna stejným sorbentem jako analytická kolona, může být mnohem kratší. Analytická kolona je nejčastěji vyrobena z nerezové oceli a je naplněna sorbentem stacionární fáze. Podle typu stacionární fáze dochází k selektivnímu zachycení látek a jejich následné separaci. Předkolona i analytická kolona je uložena v kolonovém prostoru. Ihned za analytickou kolonu je umístěn detektor. Mezi nepoužívanější typy detektorů patří spektrofotometrický, fluorescenční či hmotnostní analyzátor (Nováková *et al.*, 2013).

3.5.1 Hmotnostní spektrometr

Jedním z detektorů s nejvyšší citlivostí a specifitou je hmotnostní spektrometr. Tento typ detektoru poskytuje kromě údajů z chromatogramu také údaje o struktuře dané molekuly (Nováková *et al.*, 2013). Princip hmotnostní spektrometrie (MS) je založen na převedení neutrálních molekul na ionty v iontovém zdroji, rozřídění iontů dle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z) v hmotnostním analyzátoru a následná detekce těchto iontů (Murayama *et al.*, 2009).

Ionizační techniky lze rozdělit dle množství dodané energie na „tvrdé“ a „měkké“. Zástupcem tvrdých ionizačních technik je elektronová ionizace (EI), při které získává molekula velké množství energie a dochází k rozsáhlé fragmentaci. Mezi měkké ionizační techniky řadíme chemickou ionizaci (CI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), ionizaci desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI) a také ionizaci elektrosprejem (ESI), která byla použita v experimentální části této práce. Při použití měkké ionizační techniky vznikají mimo jiné protonované molekuly $[M+H]^+$ nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$ podle toho, zda je použit záznam kladných či záporných iontů. Ve spojení s HPLC se nejčastěji používají techniky APPI, APCI a ESI. Techniky EI a CI jsou ideální pro spojení s plynovou chromatografií, jelikož jejich podmínkou je těkavost analyzovaných látek (Nováková *et al.*, 2013; Matysová, 2020).

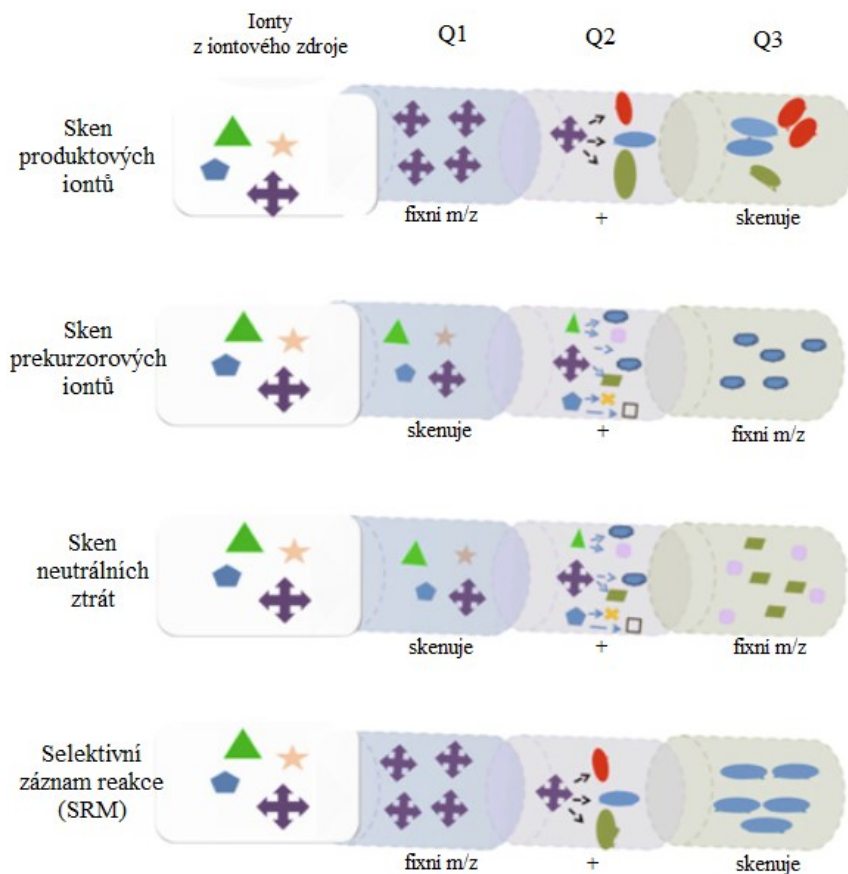
ESI je poměrně univerzální technikou, která dovoluje ionizaci od středně polárních až po velmi polární molekuly a také je vhodná pro ionizaci malých molekul, ale i velkých molekul a polymerů (Nováková *et al.*, 2013). Do mobilní fáze se při použití ESI ionizace přidávají těkavá aditiva, která podporují vznik iontů v závislosti na pH (Nováková, 2019). V experimentální části této práce byla do mobilní fáze přidána 0,1% kyselina mravenčí. Při ESI je kapilárou přiváděna mobilní fáze s analytem z HPLC přístroje do iontového zdroje. Zde se kapilára mění v kovovou, na kterou je vloženo napětí 2-5 kV. Na hrotu kovové kapiláry vznikají nabitě kapičky. Během krátké chvíle je díky sušicímu plynu (např. dusíku) odpařena mobilní fáze, což vede ke zvyšování hustoty povrchového náboje kapiček analytu až následně vzniká tzv. Coulombická exploze. Opakováním tohoto děje vznikají čím dál menší kapičky, až vzniknou ionty, které se uvolní do plynné fáze. Tato ionizace probíhá

za atmosférického tlaku a vzniklé ionty jsou dále vedeny do hmotnostního analyzátoru umístěném ve vakuu (Friedecký a Lemr, 2012).

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru m/z za vysokého vakua (Matysová, 2020). Kvalitu rozdělení iontů vyjadřuje rozlišovací schopnost analyzátoru. Jedná se o schopnost rozlišit dva signály iontů s blízkými m/z (Nováková, 2019). Mezi analyzátor s vysokou rozlišovací schopností řadíme elektrostatickou orbitální past (Orbitrap), iontovou cyklotronovou rezonanci (ICR) a analyzátor doby letu (TOF). Do analyzátorů s nižší rozlišovací schopností pak řadíme sférickou iontovou past (3D IT), lineární iontovou past (2D IT) a kvadrupólové analyzátor. V experimentální části této práce byl použit kvadrupólový analyzátor v tandemovém uspořádání, tzv. trojitý kvadrupól (QqQ) (Holčapek, 2020).

Kvadrupólové hmotnostní analyzátor jsou oblíbené zejména pro svou nízkou pořizovací cenu. Pracují na principu čtyř kovových tyčí, na kterých je měněno střídavé a stejnosměrné elektrické napětí. Střídání napětí způsobí oscilaci iontů a v daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu poměru m/z a tento iont projde dál kvadrupólem. Ostatní ionty nemají stabilní oscilace a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou napětí postupně projdou kvadrupólem na detektor všechny ionty se všemi hodnotami m/z . QqQ představuje tandemové uspořádání třech kvadrupólů za sebou. V prvním kvadrupólu Q1 jsou vybrány ionty, které dále putují do druhého kvadrupólu Q2, který slouží jako kolizní cela. Pomocí srážky s kolizním plynem, který předá molekule analytu energii, zde dochází k fragmentaci prekurzorových iontů. Vzniklé fragmenty (produktové ionty) jsou dále analyzovány ve třetím kvadrupólu Q3 (Friedecký a Lemr, 2012).

Rozlišujeme dva základní typy záznamů v hmotnostní spektrometrii. První typ záznamu je statický, tzv. SIM („*selected ion monitoring*“), u kterého dochází pouze k detekci iontu o jedné hodnotě m/z . Druhým typem je záznam skenovací (SCAN), který měří daný rozsah hodnot m/z . QqQ může pracovat ve čtyřech skenovacích režimech (obr. 10): sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sken neutrálních ztrát a selektivní záznam jedné (SRM) nebo více (MRM) reakcí.



Obrázek 10: Typy skenovacích MS záznamů
 (převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Scan-modes-of-tandem-mass-spectrometry-1-Product-ion-scan-select-Q1-precursor-ion-and_fig1_269768015)

Režim MRM („multiple reaction monitoring“) byl využit v experimentální části této práce. V prvním kvadrupólu dochází k výběru prekurzorového iontu, který je ve druhém kvadrupólu fragmentován. Nejintenzivnější a zároveň specifický produkt fragmentace je vybrán pomocí třetího kvadrupólu. Jedná se o velmi citlivý a současně selektivní režim, který se v praxi využívá zejména pro kvantifikaci analytu (Friedecký a Lemr, 2012).

4. Experimentální část

4.1 Přístroje a pomůcky, chemikálie, biologický materiál

4.1.1 Přístroje a pomůcky

Pomůcky

- Automatické pipety (Eppendorf)
- Stříkačkové filtry 4 mm, 0,22 µm (HPST)
- Homogenizační kuličky (Ginzel s.r.o.)
- Insety do vialek 0,2 ml (Agilent Technologies)
- Laboratorní nádobí (Simax)
- Mikrotitrační destička TPP® (Sigma-Aldrich)
- Plastové centrifugační zkumavky (Eppendorf)
- SPE kolonky (Strata X, Phenomenex)
- Vialky 2 ml a víčka (Agilent Technologies)
- Zorbax Bonus RP C18 kolona 2,1 mm x 150 mm; 1,8 µm (Agilent Technologies)

Přístroje

- Analytické váhy (Sartorius CP225D)
- Centrifuga (Eppendorf, Centrifuge 5415 D)
- Destičkový spektrofotometr Spark (Tecan)
- UHPLC-MS systém (Shimadzu, LC-MS 8030 Triple Quadrupole)
- Homogenizátor (MP Biomedicals, FastPrep®-24)
- Inkubátor D180-P (RWD Life Science)
- Magnetická míchačka (Heidolph, MR Hei-mix S)
- pH metr (EUTECH instruments, pH 700)
- Rolovací třepačka (DLAB, MX-T6-S)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek s.r.o.)
- Vakuová pumpa pro extrakci SPE (KNF LABOPORT)
- Vakuový koncentrátor (Concentrator 5301, Eppendorf)
- Vakuový Manifold pro SPE kolonky (Resprep®, Restek)

4.1.2 Chemikálie

- ACN ($\geq 99.9\%$, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS)
- Deuterovaný FLU (FLU-D3), analytický standard VETRANAL® (Sigma-Aldrich)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- FLU, analytický standard VETRANAL® (Sigma-Aldrich)
- FLU-R, analytický standard VETRANAL® (Sigma-Aldrich)
- Kultivační médium RPMI 1640 (Lonza)
- Kyselina mravenčí LC-MS LiChropur TM, 97,5 – 98,5 % (Sigma-Aldrich)
- Methanol (VWR Chemicals BDH®)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™)
- Sodno-fosfátový pufr ($c = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,4$)
- Ultračistá voda (ddH_2O ; připravena systémem Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA)

4.1.3 Biologický materiál

- dospělci *H. contortus* kmene IRE, ISE
- larvy L1 *H. contortus* kmene IRE, ISE
- vajíčka *H. contortus* kmene IRE, ISE

4.2 Metodika práce

4.2.1 Příprava roztoků

FLU-D3

Roztok FLU-D3, o koncentraci 1 mM, byl připraven rozpuštěním vypočtené navážky standardu FLU-D3 v 5 ml DMSO.

Výpočet navážky FLU-D3: $M_w = 316,3 \text{ g/mol}$

$$V = 5 \text{ ml}$$

$$c = 1 \text{ mM}$$

$$m = c \cdot V \cdot M$$

$$\underline{m} = 0,001582 \text{ g} = \underline{1,582 \text{ mg}}$$

Sodno-fosfátový pufr

Sodno-fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH 7,4 byl připraven pomocí dvou roztoků $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 0,1 M byl připraven v odměrné baňce rozpuštěním navážky 35,8 g v 1000 ml ddH₂O. Druhý roztok byl připraven rozpuštěním navážky 3,9 g v 250 ml ddH₂O. Obě složky se slévaly za stálého míchání na magnetické míchačce a za kontroly pH pomocí pH metru, dokud nebylo dosaženo požadované pH 7,4.

Roztok C pro BCA stanovení bílkoviny

Pracovní roztok C se připravil smícháním roztoku A (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , bicinchoninová kyselina v 0,1 M NaOH) s roztokem B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) v poměru 50:1.

10% roztok ACN

Pomocí odměrného válce byl naměřen objem 10 ml koncentrovaného ACN a následně zředěno do 100 ml ddH₂O.

Mobilní fáze

Pro HPLC-MS analýzu FLU byly použity dva roztoky mobilní fáze, které byly připraveny pomocí odměrné baňky o objemu 1 litr. Roztok mobilní fáze A byl složen z 999 ml ddH₂O a 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí. Druhý roztok mobilní fáze B obsahoval 999 ml ACN a 1 ml 0,1% kyseliny mravenčí.

4.2.2 Zisk biologického materiálu

Odčervené ovce byly experimentálně infikovány perorální suspenzí larev třetího vývojového stádia *H. contortus*. Byly použity kmeny ISE i IRE.

Ovce byly usmrceny po sedmi týdnech od podání suspenze larev a z jejich žaludku, pomocí agarové metody dle van Wyk (1980), byli získáni dospělci *H. contortus*. Dospělci byli dle morfologických znaků roztrženi na samce a samice.

Z trusu infikovaných ovcí byla izolována vajíčka *H. contortus*. Trus byl pomocí sít přefiltrován a zbaven tak největších nečistot. Dále byl použit Sheatherův cukerný roztok a byla provedena flotace. Získaný supernatant byl hodnocen mikroskopicky v 10 kapkách, poté byl počet vajíček přepočítán na celkový objem suspenze.

Larvy (L1) se vylíhly z vajíček. Na táč s kohoutkovou vodou o teplotě 10-15 °C bylo ponořeno síto o průměru ok 20 µm. Na síto byla rozprostřena izolovaná vajíčka, která se umístila do termostatu při 27 °C po dobu 24 hodin. Za tuto dobu se z vajíček vyvinuly larvy stádia L1, které migrovaly z vrstvy vody nad sítem do vody pod sítem. Voda s L1 byla přelita do odměrných nádob a larvy se nechaly sedimentovat po dobu 2-5 hodin. Sediment larev se přenesl do 50 ml zkumavky a pomocí mikroskopu byly larvy spočítány.

4.2.3 Inkubace *H. contortus* s FLU

Inkubace dospělců s FLU probíhala ve 24 jamkové mikrotitrační destičce TPP® (Sigma-Aldrich). Do každé jamky bylo napipetováno 2 ml živného média RPMI 1640 s 5 μ M FLU a vloženo 10 samic anebo 15 samců vlasovky slezové. Složení živného média bylo 0,8 % glukózy, 0,25 μ g/ml amfotericinu B, 10 U/ml penicilinu, 10 μ g/ml streptomycinu a 10 mM pufru HEPES. Takto připravené destičky byly vloženy do inkubátoru s 10 % CO₂ a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubace byli dospělci omyti fosfátovým pufrům a uloženi do plastových zkumavek. Rovněž bylo odebráno 1,5 ml živného média do plastových zkumavek. Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazničce při -20 °C. Obdobně byly připraveny také slepé vzorky obsahující kultivační médium s dospělci bez FLU.

Inkubace larev a vajíček s FLU probíhala ve 24 jamkové mikrotitrační destičce. Do jedné jamky bylo přidáno 1998 μ l suspenze vody s larvami (suspenze byla mikroskopicky hodnocena a upravena tak, aby v jedné jamce bylo přibližně 60 000 larev). Dále byly přidány 2 μ l zásobních roztoků FLU v DMSO o koncentracích 0,5 mM, 1mM a 5 mM. Výsledná koncentrace FLU v jamkách byla 0,5 μ M, nebo 1 μ M nebo 5 μ M. Připravené destičky se nechaly inkubovat 24 hodin při teplotě 27 °C. Po uplynutí doby inkubace byla voda odpipetována a larvy 3x promyty vodou. Opět bylo odebráno 1,5 ml vodní suspenze do plastových zkumavek. Obdobným způsobem probíhala inkubace vajíček s FLU a příprava slepých vzorků (biologický materiál bez FLU). Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazničce při -20 °C.

4.2.4 Homogenizace

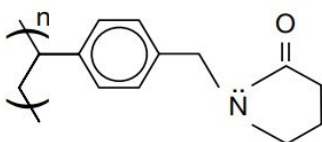
Pomocí procesu homogenizace dochází k rozbití struktury vajíček, larev a dospělců tak, aby vznikla homogenní směs. Ke každému vzorku bylo přidáno 1200 μ l sodno-fosfátového pufru a také 1 μ l FLU-D3 jako interní standard. Dále ke vzorkům byla přidána odměrka homogenizačních kuliček a vzorky byly homogenizovány v homogenizátoru celkem ve 3 cyklech (60 m/s).

Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány po dobu 5 min při 5000 x g. Ze supernatantu se odebralo 50 μ l alikvotu ke stanovení bílkoviny. Vzorky médií a slepé

vzorky nebyly homogenizovány, došlo pouze k jejich centrifugaci před samotnou SPE extrakcí.

4.2.5 SPE

Byla provedena extrakce FLU v reverzním módu. Jako polární eluční činidlo byl použit 100% ACN. K SPE byly použity Strata X kolonky (Phenomenex) s nepolárním polymerním sorbentem a funkční skupinou zobrazenou na obrázku 11. Tyto kolonky se vyznačují zejména svou univerzálností použití pro polární i nepolární analyty (Phenomenex, 2017).



Obrázek 11: Funkční skupina SPE kolonky Strata X
(převzato z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/13868f78-8e68-4e8f-8eb7-d36ec8787b93.pdf>)

Postup SPE byl následující. Nejdříve se ventily pro kolonky propláchly 1-2 ml methanolu. Na ventily se nasadila kolonka, kterou bylo potřeba aktivovat, a to pomocí 1 ml 100% ACN. Následně se kolonka promyla 1 ml ddH₂O, aby nedocházelo k vysrážení pufru ze vzorku. Na kolonku se následně nanoslo 900 µl homogenizovaného vzorku (vajíček, larev, či dospělců) společně se 2 ml ddH₂O. Při extrakci médií se nanášelo 1000 µl vzorku, 1 µl interního standardu FLU-D3 a také 2 ml ddH₂O. Nanášení vzorku a následná adsorpce analytu na kolonku probíhala bez použití vakua. Následovala fáze proplachu, a to 2 ml 10% ACN. Ventily se nechaly volně otevřené, bylo použito vakuum, aby došlo k odstranění většiny balastních látek. K následné eluci do skleněných vialek byl použit 1 ml 100% ACN. Vzorky byly dále odpařeny v koncentrátoru po dobu cca 5 hodin při 30 °C.

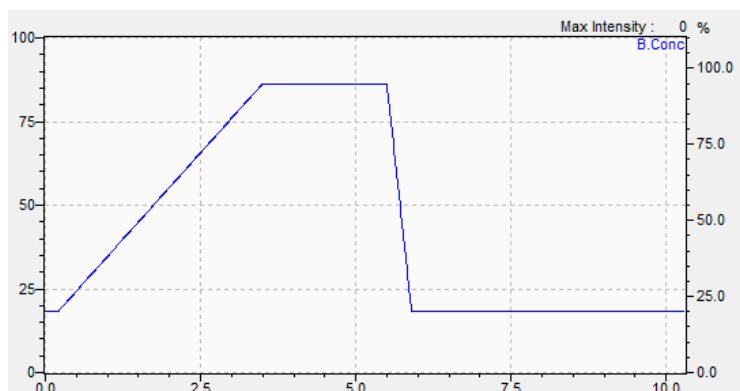
4.2.6 Rozpuštění vzorků

Odpařené vzorky byly rozpouštěny ve 30 μl 100% ACN, promíchány 5 minut na rolovací třepačce a poté dalších 5 min rozpouštěny v ultrazvukové lázni. Dále bylo ke vzorkům přidáno 70 μl ddH₂O a proces se zopakoval. Výsledný celkový objem 100 μl byl přefiltrován pomocí polytetrafluorethylenovém filtru, o průměru částic 0.22 μm , nasazeném na injekční stříkačku do skleněné vialky s insertem.

4.2.7 HPLC analýza s hmotnostní detekcí

Po filtraci následovala samotná analýza vzorků pomocí HPLC-MS. Měření probíhalo na chromatografu firmy Shimadzu, řady Nexera, který obsahuje binární pumpu, vakuový odplyňovač, automatický dávkovač temperovaný na 15 °C a kolonový prostor temperovaný na 40 °C. Jako stacionární fáze byla použita Zorbax Bonus RP C18 kolona, o rozměrech 2,1 mm x 150 mm a průměru částic 1,8 μm , vhodná pro separaci bazických analytů. Kolona obsahuje amidovou skupinu včleněnou do dlouhých alkylových řetězců, čímž dochází ke snížení interakcí mezi bazickými sloučeninami a silanovým nosičem, a tím je dosažen požadovaný tvar píku i bazických analytů. Injekční objem byl 1 μl .

Analýza probíhala v režimu lineární gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Mobilní fáze A byla složena z ddH₂O a 0,1% kyseliny mravenčí, mobilní fáze B z ACN a 0,1% kyseliny mravenčí. Průběh gradientové eluce (obr. 12) byl následující. Prvních 20 sekund bylo složení mobilní fáze nastaveno na 20 % mobilní fáze B. Následně se 3 minuty zvyšoval poměr mobilní fáze B a to na 95 %. Další dvě minuty bylo složení mobilní fáze konstantní. Poté došlo ke snížení poměru mobilní fáze B na 20 % a od 6 minut do konce analýzy bylo složení mobilní fáze konstantní. Celková doba analýzy jednoho vzorku trvala 10 minut.



Obrázek 12: Průběh gradientové eluce – poměr mobilní fáze B

Detekce probíhala pomocí hmotnostního spektrometru Shimadzu LCMS 8030. Byla využita ionizační technika ESI v pozitivním iontovém režimu. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 0,5 kV pro FLU-R a 1,5 kV pro FLU a FLU-D3. Teplota tepelného bloku dosahovala 400 °C. Jako sušící a nebulizační plyn byl použit dusík. Průtok sušícího plynu byl 12 l/min, průtok nebulizačního plynu 2,5 l/min. Jako hmotnostní analyzátor byl použit QqQ v režimu MRM. Kolizním plynem ve Q2 byl argon. Tabulka 2 udává molekulární vzorec, retenční čas, poměr m/z a vybrané produktové ionty analyzovaných sloučenin.

Tabulka 2: Molekulární vzorec, retenční čas, molekulová hmotnost a vybrané produktové ionty analyzovaných sloučenin

Sloučenina	Molekulární vzorec	t_R [min]	Prekurzorový iont $[M+H]^+$, m/z	Produktový iont $[M+H]^+$, m/z (kolizní energie)
FLU	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	3,82	314,10	281,80 (-22); 122,95 (-39); 94,95 (-50)
FLU-D3	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	3,82	317,10	281,90 (-24); 122,85 (-40); 94,95 (-53)
FLU-R	$C_{16}H_{14}FN_3O_3$	2,11	316,10	283,95 (-26); 97,00 (-46); 124,90 (-38)

4.2.8 BCA stanovení bílkoviny

Principem stanovení bílkovin je jejich reakce s Cu^{2+} ionty, kdy dochází v alkalickém prostředí k redukci těchto iontů na Cu^{1+} . Měďné ionty poté reagují s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku modrofialového komplexu. Koncentrace bílkovin ze vzorku je přímo úměrná absorbanci (A) a vypočítá se pomocí kalibrační přímky.

K sestavení kalibrační přímky byly připraveny roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o různé koncentraci (viz tabulky 3 a 4). První kalibrační roztok představuje slepý vzorek.

Tabulka 3: Kalibrační řada pro vajíčka a larvy

Kalibrační roztok	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	0,04% BSA [μl]	ddH ₂ O [μl]
1	0	0	100
2	40	10	90
3	80	20	80
4	120	30	70
5	160	40	60
6	240	60	40
7	320	80	20
8	400	100	0

Tabulka 4: Kalibrační řada pro dospělé

Kalibrační roztok	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	0,1% BSA [μl]	ddH ₂ O [μl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 μl každého kalibračního roztoku, který byl měřen v triplicátu. Vzorky dospělců byly ředěny 1:1 sodno-fosfátovým pufrem a následně bylo napipetováno také 10 μl vzorku do destičky. Vzorky vajíček a larev ředěny nebyly, do destičky bylo pipetováno opět 10 μl . Všechny vzorky byly měřeny v duplikátu. Ke všem vzorkům i kalibračním roztokům bylo pomocí multikanálové pipety přidáno 200 μl pracovního roztoku C. Pro vznik barevného komplexu je ideální teplota 37 °C, proto se vzorky nechaly inkubovat v termomixéru ve tmě po dobu 30 min. Po inkubaci byl barevný komplex měřen spektrofotometricky pomocí čtečky Spark při 562 nm.

5. Výsledky

5.1 BCA stanovení bílkoviny

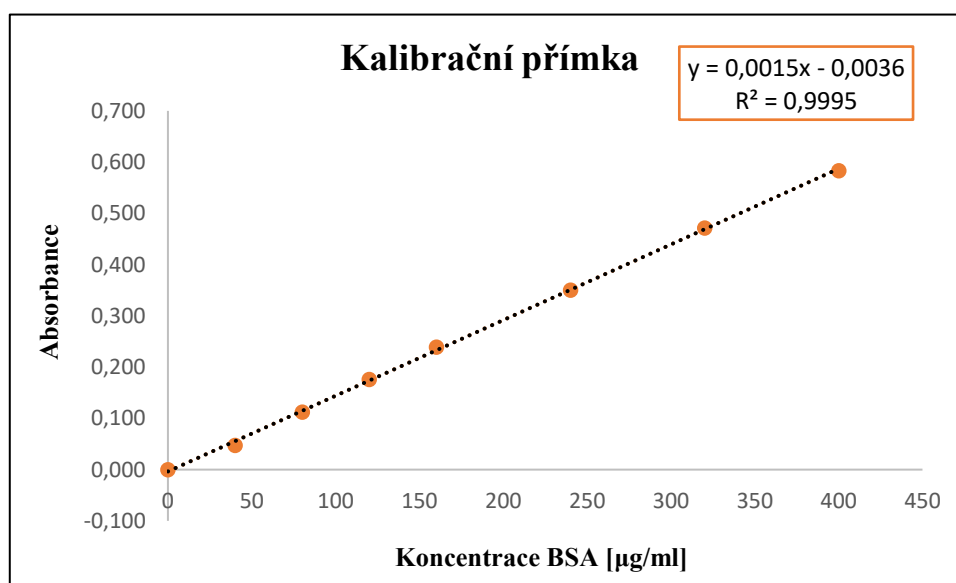
5.1.1 Kalibrační přímka

Kalibrační roztoky byly měřeny v triplikátu, mezi kterými byly variační koeficienty $\leq 6\%$. Od průměru absorbancí kalibračních roztoků je odečtena absorbance slepého vzorku (tabulka 5 a 6). Byla sestrojena kalibrační přímka (obr. 13 a 14) pro stanovení koncentrace bílkoviny u vzorků vajíček, larev a dospělců.

Vajíčka a larvy

Tabulka 5: Hodnoty absorbancí pro jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků vajíček a larev

Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Průměr A	Průměr A po odečtení slepého vzorku
0	0,106	0,000
40	0,153	0,047
80	0,219	0,112
120	0,282	0,176
160	0,345	0,239
240	0,456	0,350
320	0,578	0,472
400	0,690	0,583

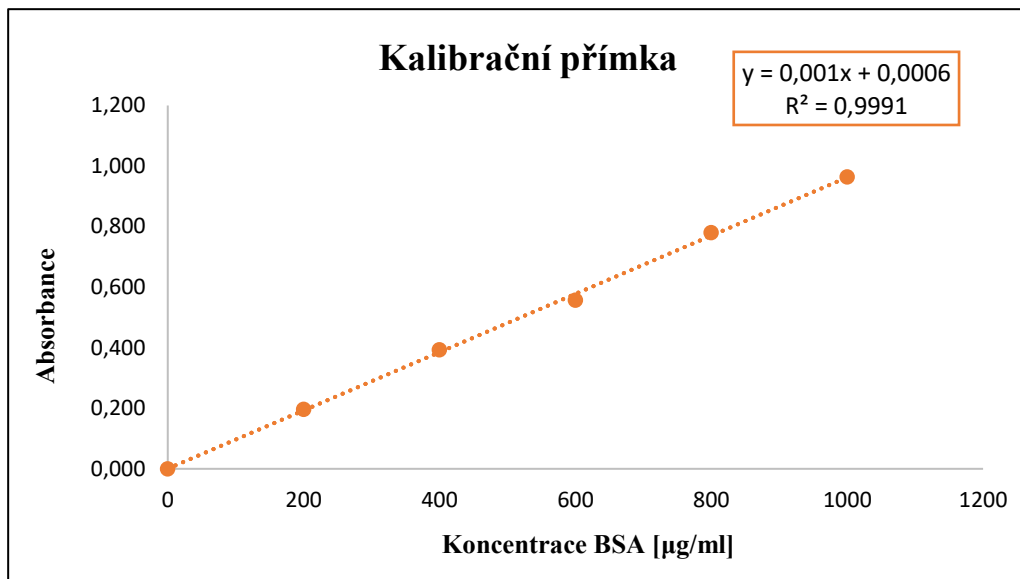


Obrázek 13: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny u vajíček a larev

Dospělci

Tabulka 6: Hodnoty absorbančí pro jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků dospělců

Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Průměr A	Průměr A po odečtení slepého vzorku
0	0,107	0,000
200	0,304	0,196
400	0,500	0,393
600	0,664	0,557
800	0,887	0,780
1000	1,071	0,964



Obrázek 14: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny u dospělců

5.1.2 BCA stanovení bílkoviny u vývojových stádií *H. contortus*

Vzorky vajíček, larev L1 a dospělců ISE a IRE kmene byly měřeny v duplikátu, mezi kterými byly variační koeficienty $\leq 10\%$. U vzorků byla proměřena absorbance, od těchto hodnot odečtena absorbance slepého vzorku (tabulka 5 a 6) a podle rovnic kalibračních přímek (obr. 13 a 14) byly vypočítány koncentrace proteinů (tabulky 7, 8, 9). Kontrolní vzorky (K) obsahovaly biologický materiál (vajíčka/larvy/dospělce) bez FLU.

Vajíčka

Tabulka 7: Koncentrace bílkoviny u vajíček *H. contortus*; * $n=8$

Vajíčka s FLU [μM]	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]		
	Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE – FLU 0,5	109	8	7
ISE – K	153	17	11
IRE – FLU 0,5	96	11	12
IRE – K	100	11	11
ISE – FLU 1	122	14	12
ISE – K	106	22	20
IRE – FLU 1	165	31	19
IRE – K	169	19	11
ISE – FLU 5	116	19	16
ISE – K	96	6	6
IRE – FLU 5	167	17	10
IRE – K	187	12	7

Larvy

Tabulka 8: Koncentrace bílkoviny u larev *H. contortus*; *n=6

Larvy L1 s FLU [μM]	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]		
	Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE – FLU 0,5	70	44	62
ISE – K	74	39	53
IRE – FLU 0,5	64	11	16
IRE – K	81	9	11
ISE – FLU 1	83	22	27
ISE – K	74	39	53
IRE – FLU 1	89	34	39
IRE – K	87	4	4
ISE – FLU 5	55	19	34
ISE – K	63	11	17
IRE – FLU 5	129	15	12
IRE – K	150	40	27

Dospělci

Tabulka 9: Koncentrace bílkoviny u dospělců *H. contortus*; *n=6

Dospělci s FLU 5 μM	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]		
	Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE samice	327	58	18
ISE samice – K	406	61	15
ISE samci	223	16	7
ISE samci – K	220	20	9
IRE samice	273	28	10
IRE samice – K	215	18	8
IRE samci	156	20	13
IRE samci – K	144	21	15

5.2 Stanovení redukce FLU u *H. contortus*

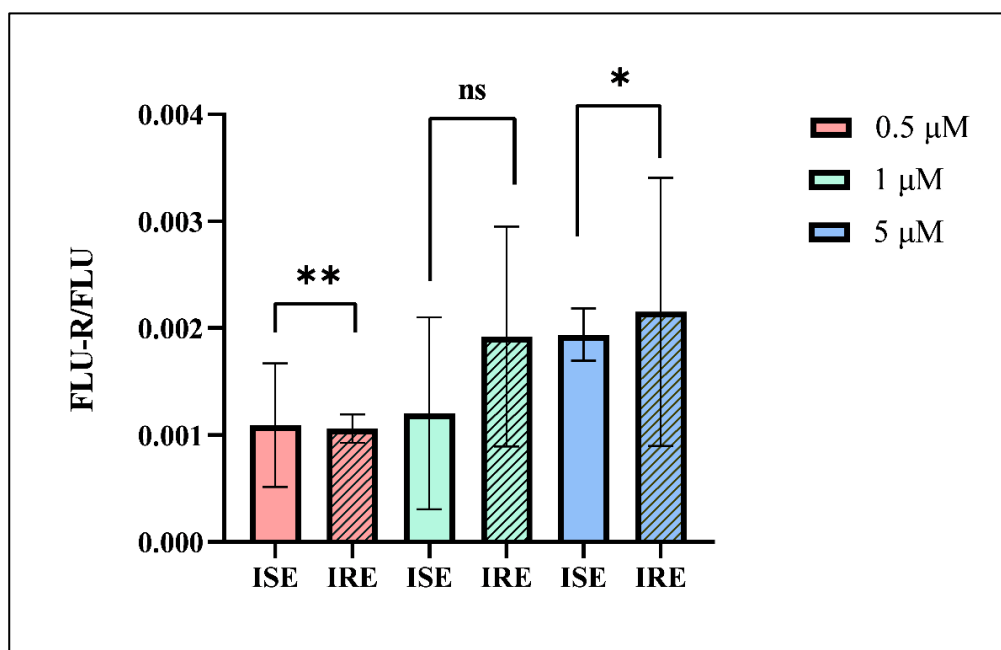
5.2.1 Stanovení FLU-R ve vajíčkách, larvách a dospělích

Množství vytvořeného FLU-R bylo měřeno v homogenátu vajíček, larev a dospělců *H. contortus*. Získané hodnoty ploch FLU a FLU-R byly vztaženy na 1 mg proteinu. Následně byl stanoven poměr ploch FLU-R/FLU (tabulky 10, 11 a 12). Hodnoty FLU-R/FLU byly vyhodnoceny parametrickým nepárovým T-testem (obr. 15, 16 a 17), za statisticky významné hodnoty jsou považovány rozdíly od hladiny významnosti $P \leq 0,05$.

Vajíčka

Tabulka 10: Poměr ploch FLU-R/FLU u vajíček ISE a IRE kmene s danou koncentrací FLU; * $n=8$

Kmen	Substrát FLU [μM]	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	0,5	0,00135	0,00009	6
	1	0,00120	0,00084	70
	5	0,00194	0,00023	12
IRE	0,5	0,00106	0,00012	12
	1	0,00192	0,00096	50
	5	0,00274	0,00068	25



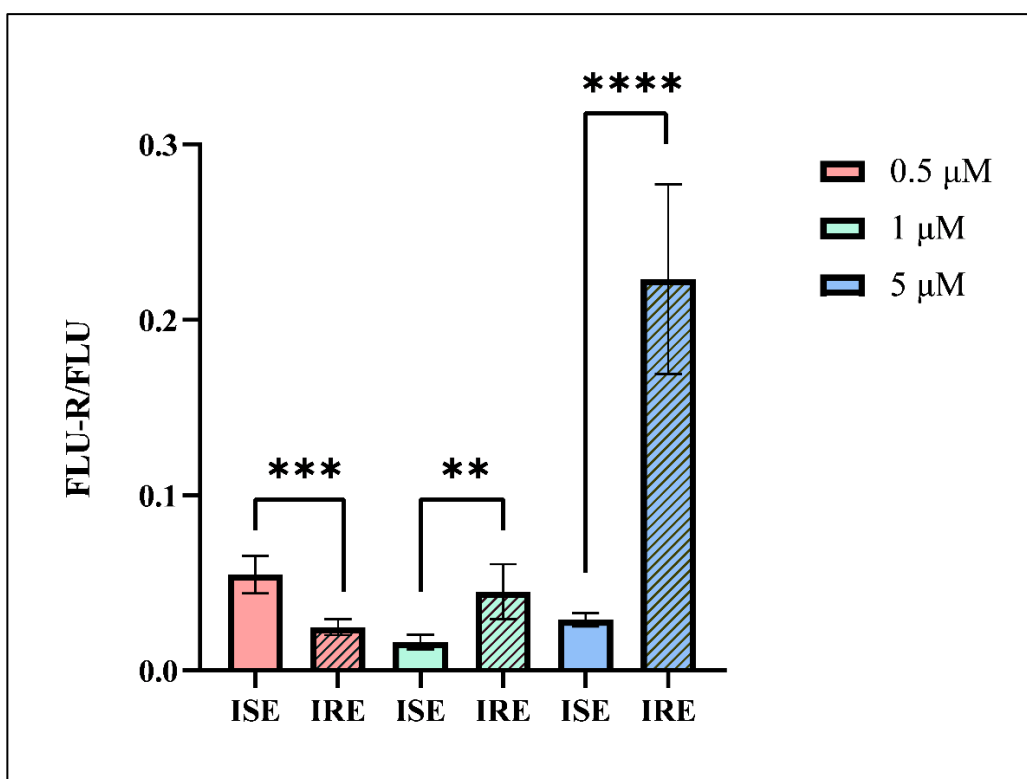
Obrázek 15: Tvorba FLU-R/FLU u vajíček ISE a IRE kmene

$ns = P \geq 0,05$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$

Larvy

Tabulka 11: Poměr ploch FLU-R/FLU u larev ISE a IRE kmene s danou koncentrací FLU; *n=6

Kmen	Substrát FLU [μM]	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	0,5	0,05468	0,00950	17
	1	0,01620	0,00371	23
	5	0,02882	0,00351	12
IRE	0,5	0,02479	0,00418	17
	1	0,04496	0,01424	32
	5	0,22250	0,04818	22



Obrázek 16: Tvorba FLU-R/FLU u larev ISE a IRE kmene

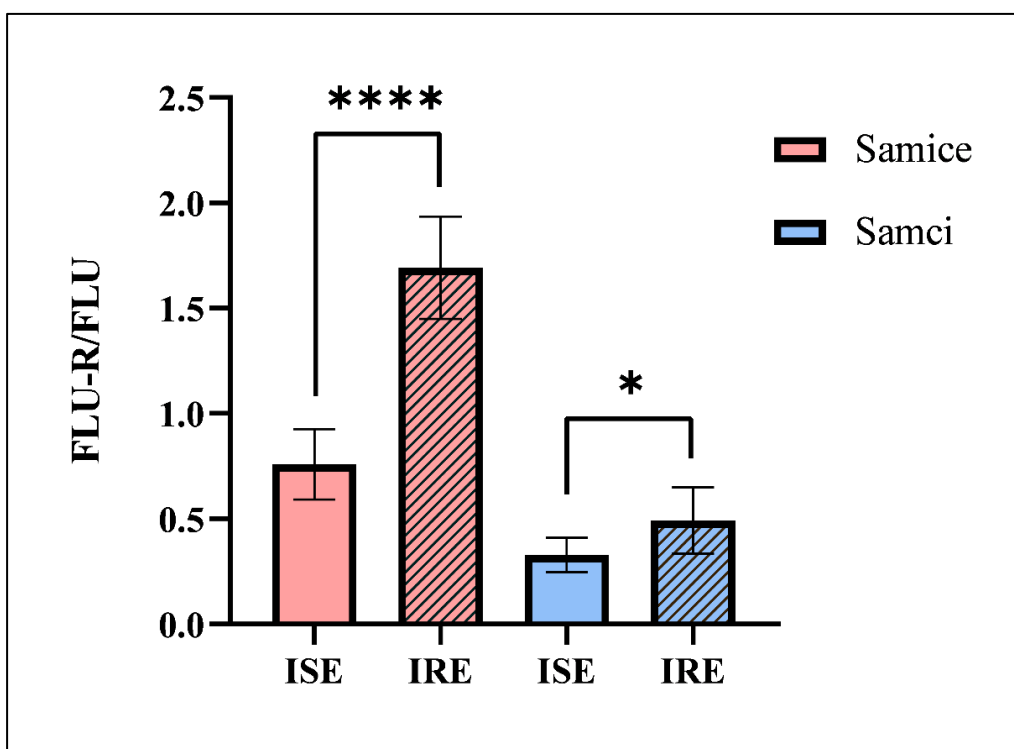
** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$; **** = $P \leq 0,0001$

Z výsledků stanovení FLU-R/FLU je patrné, že u vajíček i larev byla zaznamenána metabolická aktivita. Při porovnání vajíček a larev vidíme, že produkce FLU-R je až 20x vyšší u larválního vývoje. Největší nárůst FLU-R je patrný u larev IRE kmene s koncentrací FLU 5 μM , které vyprodukovaly až 10x více FLU-R než ISE kmen.

Dospělci

Tabulka 12: Poměr ploch FLU-R/FLU u dospělců ISE a IRE kmene s FLU 5 μ M; *n=6

Kmen	Pohlaví	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	<i>Samice</i>	0,75802	0,15293	20
	<i>Samci</i>	0,32757	0,07571	23
IRE	<i>Samice</i>	1,69181	0,22203	13
	<i>Samci</i>	0,49150	0,14416	29



Obrázek 17: Tvorba FLU-R/FLU u dospělců ISE a IRE kmene

* = $P \leq 0,05$; **** = $P \leq 0,0001$

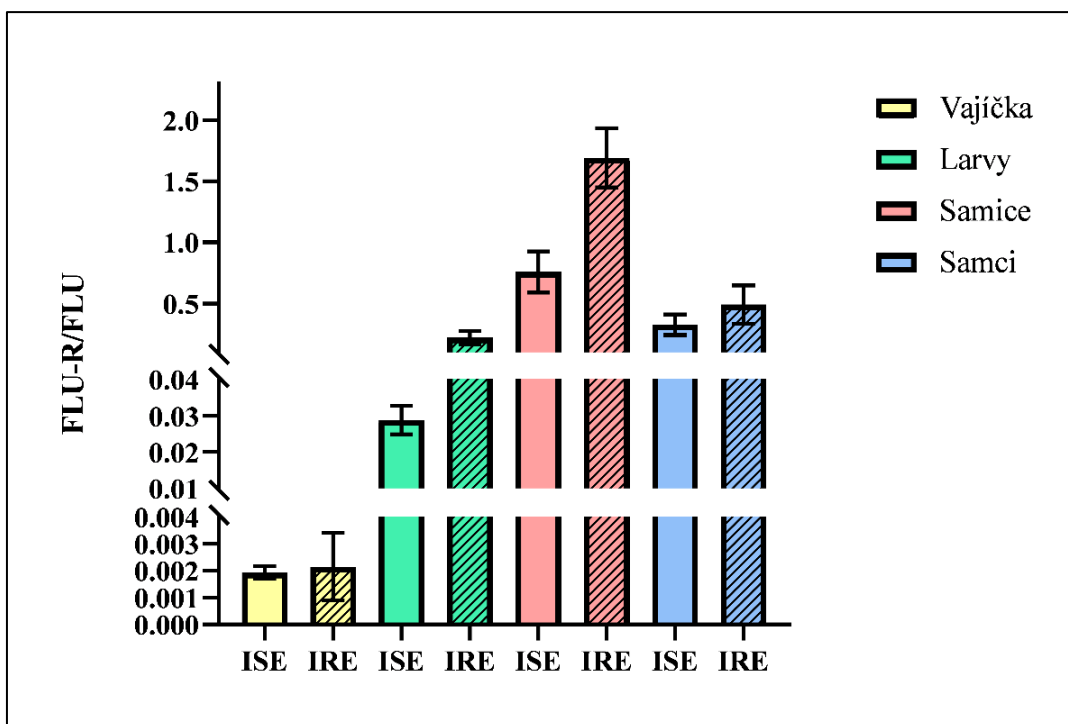
U dospělých jedinců byla zaznamenána očekávaná metabolická aktivita, jejich produkce FLU-R je až 10x vyšší než u larválního vývoje L1. Při porovnání obou pohlaví vidíme, že více metabolicky aktivní jsou samičky. Statisticky významné jsou všechny hodnoty FLU-R/FLU vajíček, larev a dospělců, kromě hodnot vajíček inkubovaných s 1 μ M FLU.

5.2.2 Porovnání množství FLU-R v hlísticích kmene ISE a IRE

Tabulka 13 obsahuje průměrné hodnoty ploch FLU-R/FLU se směrodatnými odchylkami a variačními koeficienty pro daná vývojová stádia ISE a IRE kmene inkubovanými s FLU (5 μ M). Z obrázku 18 je zřejmé, že hlístice kmene IRE ve všech vývojových stádiích více redukuje FLU než hlístice kmene ISE. Nejvíce metabolicky aktivní jsou dospělé samičky.

Tabulka 13: Poměr ploch FLU-R/FLU vývojových stádií ISE a IRE kmene s FLU o koncentraci 5 μ M

Kmen	Stádium	Metabolit FLU-R		
		Průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	<i>Vajíčka</i>	0,00194	0,00023	12
	<i>Larvy</i>	0,02882	0,00351	12
	<i>Samice</i>	0,75802	0,15293	20
	<i>Samci</i>	0,32757	0,07571	23
IRE	<i>Vajíčka</i>	0,00274	0,00068	25
	<i>Larvy</i>	0,22250	0,04818	22
	<i>Samice</i>	0,32757	0,07571	23
	<i>Samci</i>	0,49150	0,14416	29



Obrázek 18: Tvorba FLU-R/FLU u vývojových stádií ISE a IRE kmene s FLU o koncentraci 5 μ M

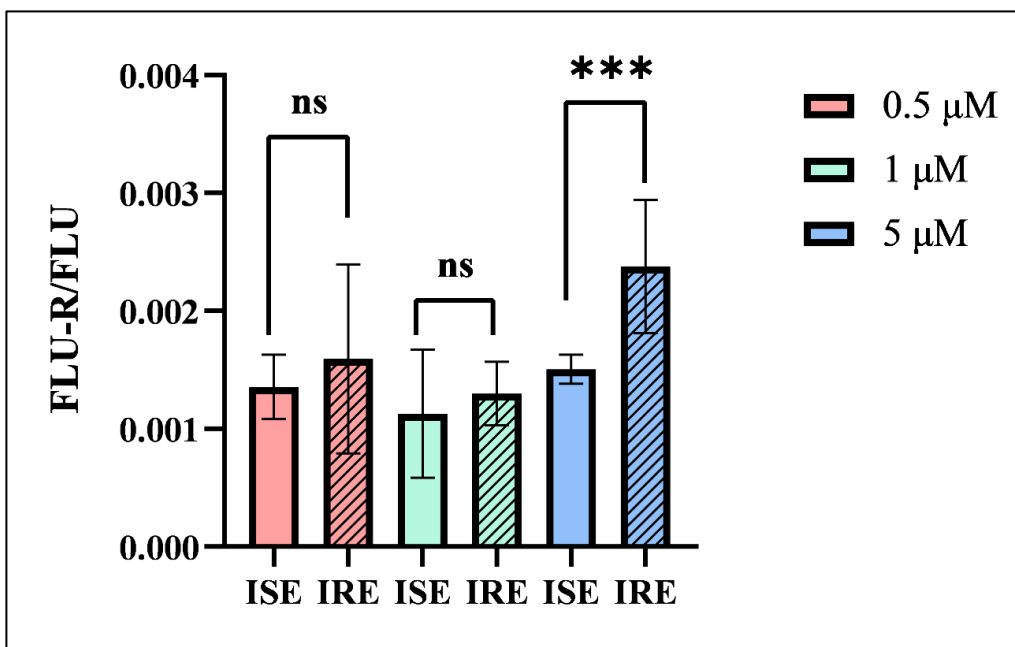
5.2.3 Stanovení FLU-R v médiích

Poměr FLU-R/FLU byl také stanoven ve vodném roztoku, ve kterém se inkubovala vajíčka, larvy a dospělci (tabulky 14, 15) a také v živném médiu, kde probíhala inkubace dospělých jedinců (tabulka 16). Hodnoty FLU-R/FLU byly vyhodnoceny parametrickým nepárovým T-testem (obr. 19, 20 a 21).

Vajíčka

Tabulka 14: Poměr ploch FLU-R/FLU ve vodném roztoku vajíček ISE a IRE kmene s danou koncentrací FLU; *n=8

Kmen	Substrát FLU [μM]	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	0,5	0,00136	0,00024	18
	1	0,00113	0,00051	45
	5	0,00151	0,00012	8
IRE	0,5	0,00159	0,00075	47
	1	0,00130	0,00025	19
	5	0,00238	0,00053	22

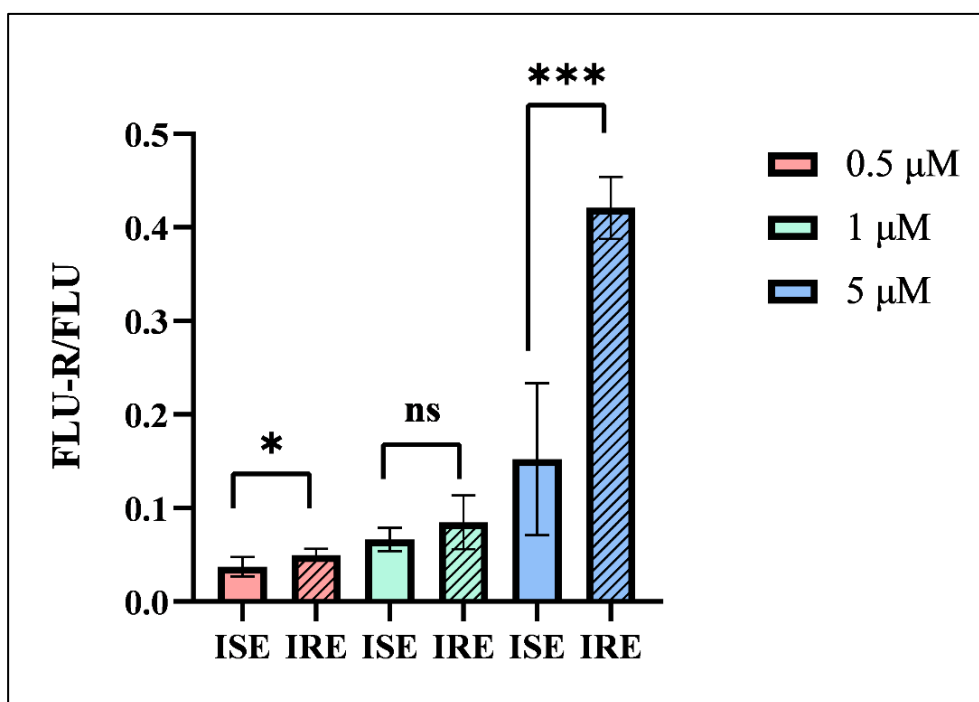


Obrázek 19: Tvorba FLU-R/FLU ve vodném roztoku vajíček ISE a IRE kmene
 ns = $P \geq 0,05$; *** = $P \leq 0,001$

Larvy

Tabulka 15: Poměr ploch FLU-R/FLU ve vodném roztoku larev ISE a IRE kmene s danou koncentrací FLU; *n=6

Kmen	Substrát FLU [μM]	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	0,5	0,03710	0,00931	25
	1	0,06653	0,01116	17
	5	0,15231	0,07272	48
IRE	0,5	0,04990	0,00584	12
	1	0,08461	0,02625	31
	5	0,42097	0,02964	7

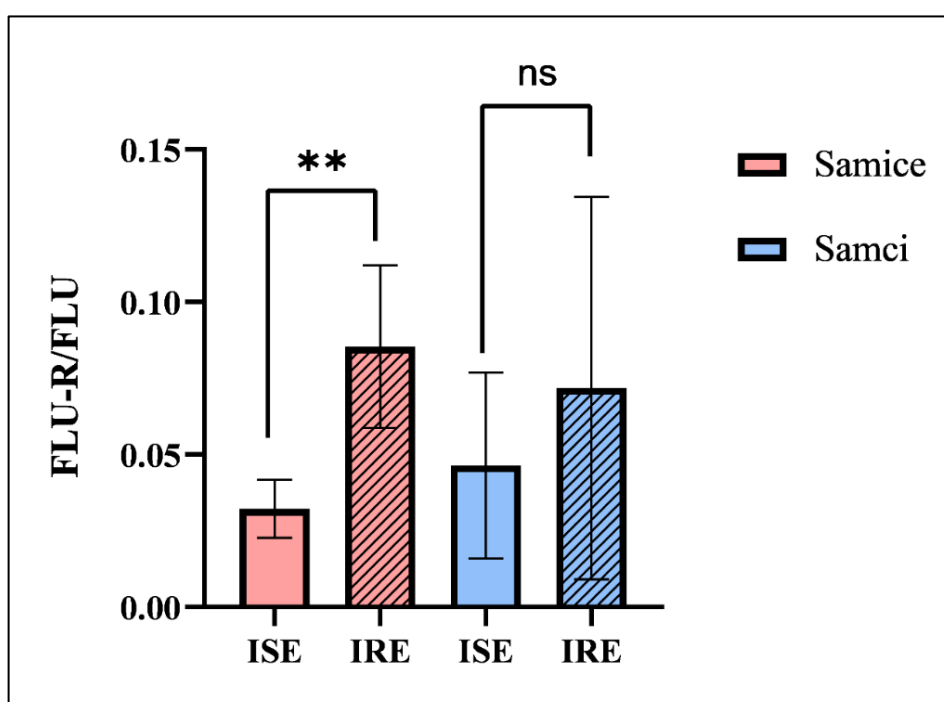


Obrázek 20: Tvorba FLU-R/FLU ve vodném roztoku larev ISE a IRE kmene
 ns = $P \geq 0,05$; * = $P \leq 0,05$; *** = $P \leq 0,001$

Dospělci

Tabulka 16: Poměr ploch FLU-R/FLU v živném médiu dospělců ISE a IRE kmene s FLU o koncentraci 5 μ M; *n=6

Kmen	Pohlaví	Metabolit FLU-R		
		Průměr*	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	<i>Samice</i>	0,03220	0,00865	27
	<i>Samci</i>	0,04638	0,02775	60
IRE	<i>Samice</i>	0,08536	0,02180	26
	<i>Samci</i>	0,07176	0,05119	71



Obrázek 21: Tvorba FLU-R/FLU v živném médiu dospělců ISE a IRE kmene
ns = $P \geq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$

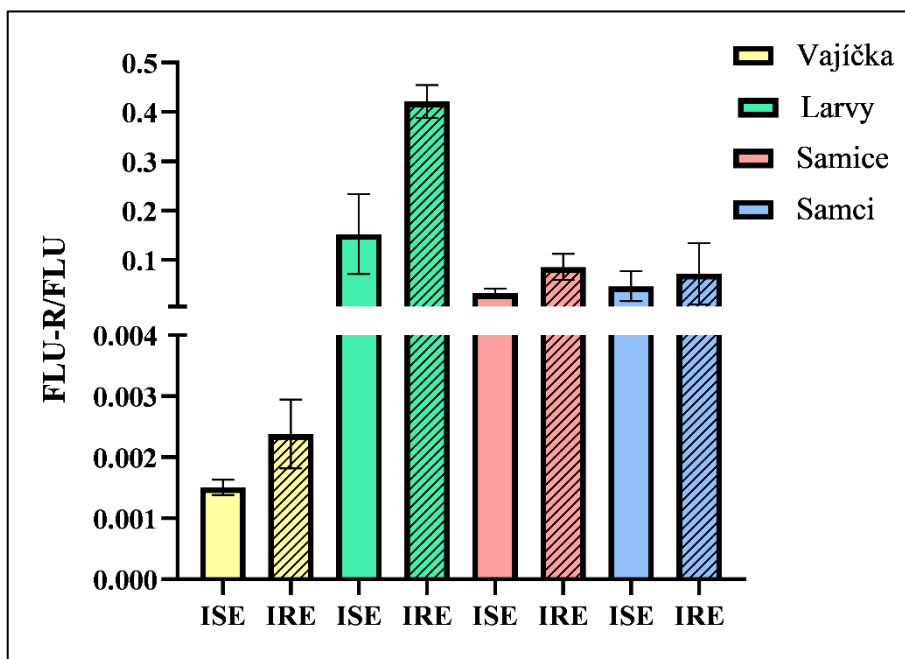
Výsledky statického testu médií ukazují, že se jedná o daleko méně statisticky významné hodnoty FLU-R/FLU. Za statisticky významné nelze považovat hodnoty vajíček inkubovaných s 0,5 a 1 μ M FLU, larev inkubovaných s 1 μ M FLU a také hodnoty dospělých samců. Víceméně stejné množství FLU-R/FLU, jako u vodného roztoku larev, bylo stanoveno také v živném médiu dospělých jedinců.

5.2.4 Porovnání množství FLU-R v médiích od hlístic kmene ISE a IRE

Průměrné hodnoty ploch FLU-R/FLU se směrodatnými odchylkami a variačními koeficienty pro vodní roztoky a živná média s FLU o koncentraci 5 μM , ve kterých probíhaly inkubace vajíček, larev a dospělců, jsou obsaženy v tabulce 17. Z obrázku 22 je patrné vyšší množství FLU-R v médiích všech vývojových stádií kmene IRE oproti médiím od kmene ISE.

Tabulka 17: Poměr ploch FLU-R/FLU vodních suspenzí a živných médií ISE a IRE kmene s FLU o koncentraci 5 μM

Kmen	Stádium	Metabolit FLU-R		
		Průměr	Směrodatná odchylka	Variační koeficient [%]
ISE	<i>Vajíčka</i>	0,00151	0,00012	8
	<i>Larvy</i>	0,15231	0,07272	48
	<i>Samice</i>	0,03220	0,00865	27
	<i>Samci</i>	0,04638	0,02775	60
IRE	<i>Vajíčka</i>	0,00238	0,00053	22
	<i>Larvy</i>	0,42097	0,02964	7
	<i>Samice</i>	0,08536	0,02180	26
	<i>Samci</i>	0,07176	0,05119	71



Obrázek 22: Tvorba FLU-R/FLU u vodních suspenzí a živných médií ISE a IRE kmene s FLU o koncentraci 5 μM

6. Diskuse

Gastrointestinální parazit malých přežvýkavců *Haemonchus contortus* způsobuje onemocnění haemonchózu, jejíž terapie je založená na podávání anthelmintik. Mezi nejvíce užívaná anthelmintická léčiva patří benzimidazoly, jejichž jedním ze zástupců je i námi studované léčivo FLU. Terapii haemonchózy a jiných onemocnění způsobených parazitickými hlísticemi komplikuje fenomén rozvíjející se rezistence hlístic vůči účinku léčiva. Existuje více způsobů, jak se hlístice dokáže bránit účinku benzimidazolů. Mezi farmakodynamické mechanismy rezistence patří zejména schopnost hlístice snížit vazbu benzimidazolů na β -tubulin. Díky jednonukleotidovým polymorfismům dochází v rezistentních kmenech ke změně struktury β -tubulinu. Tento mechanismus rezistence byl také popsán u larválního vývoje L3 vlasovky slezové (Kotze et al., 2011).

Mezi farmakokinetické mechanismy rezistence patří zvýšení biotransformace (tj. deaktivace) léčiva. Hlavní reakcí první fáze biotransformace FLU u *H. contortus* je redukce karbonylové skupiny FLU za vzniku méně účinného metabolitu, FLU-R (Vokřál et al., 2012). Redukce probíhá pravděpodobně pomocí biotransformačních enzymů z nadrodin SDR a AKR (Stuchlíková et al., 2018). Zatímco schopnost dospělců *H. contortus* redukovat FLU je již dlouho známa (Vokřál et al., 2012), redukce FLU nebyla studována u nižších vývojových stádií.

Vývojový cyklus vlasovky slezové je rozdělen do tří hlavních stádií, a to vajíček, larev a dospělých jedinců. Vajíčka i larvy se běžně setkávají se sub-letálními dávkami FLU v exkrementech a v půdě na pastvě ošetřených zvířat, avšak jejich schopnost redukovat FLU nebyla dosud popsána. Zjištění této schopnosti u vajíček a larev vlasovky slezové a porovnání kmene citlivého a rezistentního může napomoci k pochopení mechanismu rezistence a v celkovém boji proti rozšiřující se anthelmintické rezistenci.

V experimentu byly použity vajíčka, larvy vývojového stádia L1 a dospělí jedinci ISE a IRE kmene. Vajíčka a larvy byly inkubovány se třemi různými koncentracemi FLU (0,5; 1; 5 μ M). Dospělí jedinci, z důvodu nedostatku biologického materiálu, byli inkubováni s jednou koncentrací FLU (5 μ M). Při testu líhnutí vajíček bylo možno použít více koncentrací FLU. Protože vykazoval FLU o koncentraci 5 μ M ovicidní účinek u 33 % vajíček, nebyly zvoleny vyšší koncentrace, ale právě 5x a 10x

menší. Vajíčka byla měřena v osmi biologických replikátech, larvy a dospělci v šesti replikátech. Rovněž byly připraveny kontrolní vzorky, které obsahovaly biologický materiál bez substrátu FLU. Před samotnou analýzou byly všechny vzorky upravovány za použití SPE metody a následně pomocí HPLC-MS/MS byl stanoven poměr FLU-R ku parentnímu léčivu FLU.

Hodnoty FLU-R/FLU byly statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism pomocí parametrického nepárového T-testu. U vajíček a larev byl porovnán ISE a IRE kmen v rámci jedné koncentrace substrátu FLU. U dospělců byl porovnán ISE a IRE kmen samiček a samců.

Z výsledků stanovení FLU-R/FLU ve vývojových stádiích je zřejmé, že během vývojového cyklu dochází k postupnému zvyšování produkce FLU-R. Nejvíce metabolicky aktivní jsou dospělé samičky *H. contortus* a ve většině případů byl zaznamenán nárůst FLU-R u IRE kmene oproti kmene ISE. V homogenátu dospělých jedinců se vyskytuje až 10x více FLU-R oproti jejich médiu. Rozdíl v množství FLU-R mezi homogenáty vajíček či larev a jejich vodném roztoku je minimální.

Kontakt nižších vývojových stádiích se sub-letálními dávkami FLU v exkrementech a v půdě by mohl vést k rozvoji zvýšené schopnosti deaktivovat FLU redukcí karbonylové skupiny vlivem zvýšené exprese karbonylreduktáz. Štěrbová *et al.* (2023) prokázala, že největší expresi většiny vybraných SDR enzymů projevuje larvální stádium vlasovky slezové. Tím bylo poukázáno na důležitou funkci těchto enzymů během života larev ve vnějším prostředí. Právě díky zvýšené expresi SDR se larva může chránit před reaktivními karbonyly i proti anthelmintickému účinku FLU. S velkou pravděpodobností by s lékovou rezistencí mohly být spojeny geny SDR1, SDR12, SDR13, SDR16, protože exprese těchto SDR je konzistentně zvýšena ve většině stádiích vlasovky slezové rezistentního kmene IRE oproti citlivému kmene ISE.

Kromě SDR byly u *H. contortus* studovány enzymy z nadrodiny CYP, které hrají důležitou roli hlavně v oxidačních přeměnách xenobiotik. U hlístic byla prokázána účast CYP34 a CYP35 v metabolismu xenobiotik a lékové rezistenci. Expese těchto enzymů byla také stanovena v různých vývojových stádiích vlasovky slezové. Nejvyšší exprese většiny enzymů nadrodiny CYP byla zaznamenána v larválním stádiu. Pouze nízká expese těchto enzymů byla zjištěna u *H. contortus* ve stádiu vajíček (Laing *et al.*, 2015).

Studie Gigliotiho *et al.* (2022) zjistila, že larvální stádia vlasovky slezové (L1) jsou schopna se podílet na aktivním buněčném efluxu léčiva, např. ivermektinu, prostřednictvím P-glykoproteinů. Jelikož nejvyšší exprese P-glykoproteinů prokazovaly právě larvy L1, eflux léčiva je tak potencionálním mechanismem rezistence hlístice vůči některým anthelmintikům. Celkové znalosti o mechanismech rezistence během ontogenetického vývoje hlístic jsou však značně omezené a je zapotřebí se problematice i nadále věnovat. Rovněž je třeba intenzivně hledat nová léčiva účinná i proti rezistentním kmenům vlasovek a také cesty, jak vývoj lékové rezistence omezit.

Jednou z alternativních strategií k léčbě haemonchózy a k omezení lékové rezistence u vlasovky slezové patří použití léčivých rostlin. Studie od Váradyové *et al.* (2018) porovnávala 13 léčivých rostlin typických pro střední Evropu. Mezi ně patřil také pelyněk pravý, který vykazoval nejvýznamnější anthelmintické účinky v testu líhnutí vajíček i v testu vývoje larev. Navíc bylo zjištěno, že vyšší ovicidní a larvicidní aktivitu vykazovaly vodné extrakty rostlin oproti methanolovým extraktům. Dále byla zkoumána také spigellie lékařská (Araújo *et al.*, 2017). Frakce listových proteinů spigellie lékařské vykazovala inhibiční účinek na líhnutí vajíček vlasovky slezové. Oproti tomu nejvyšší inhibiční účinek na migraci larev vykazovala frakce proteinů ze stonku a kořene spigellie. Výsledky naznačují, že proteiny ze spigellie lékařské představují slibné anthelmintické léčivé látky proti vývojovým stádiím vlasovky slezové. Využití léčivých rostlin k prevenci či léčbě haemonchózy by bylo přínosné jak z hlediska omezení rozvoje rezistence, tak i z hlediska snížení kontaminace životního prostředí syntetickými léčivy.

7. Závěr

V teoretické části této diplomové práce byl popsán vývojový cyklus hlístice *H. contortus* a objasněna problematika haemonchózy a její terapie, rezistence hlístic vůči anthelmintikům a úlohy reduktáz. Rovněž byla zpracována teorie extrakce SPE, zabývající se zejména vývojovými trendy, a teorie analytické metody HPLC-MS/MS.

V experimentální části byly:

- Úspěšně izolovány vajíčka a larvy L1 *H. contortus* kmene ISE a IRE z trusu ovce domácí. Dospělci byli izolováni z žaludku ovce domácí.
- Inkubovány vajíčka a larvy L1 se třemi různými koncentracemi FLU. Inkubace dospělců probíhala s jednou koncentrací FLU.
- Stanoveny poměry množství FLU-R a FLU v biologických vzorcích i ve vzorcích medií pomocí HPLC-MS/MS.
- Porovnány schopnosti jednotlivých vývojových stádií redukovat FLU. Podařilo se prokázat metabolickou aktivitu vajíček i larev *H. contortus* obou kmenů. Nejvíce FLU-R dokázaly vyprodukovat dospělé samičky, jedná se tak o nejvíce metabolicky aktivní stádium vývoje této hlístice.
- Rovněž byla porovnána schopnost redukovat FLU mezi kmény ISE a IRE. Ve většině případů produkoval IRE kmen více FLU-R než kmen ISE.

8. Seznam zkratek

- 2D IT – lineární iontová past
- 3D IT – sférická iontová past
- A – absorbance
- ACN – acetonitril
- AKR – aldo-ketoreduktázy
- APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku
- APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku
- Asn – asparagin
- BCA – kyselina bicinchoninová
- BSA – hovězí sérový albumin
- CBR – karbonylreduktáza
- CI – chemická ionizace
- CNS – centrální nervová soustava
- CO₂ – oxid uhličitý
- CuSO₄ · 6H₂O – síran měďnatý hexyhydrát
- CYP – cytochrom P
- ddH₂O – ultračistá voda
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DNA – deoxynukleová kyselina
- EI – elektronová ionizace
- ESI – ionizace elektrosprejem
- FLU – flubendazol
- FLU-D3 – deuterovaný flubendazol
- FLU-R – redukovaný flubendazol
- GST – glutathion-S-transferáza
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- ICR – iontová cyklotronová rezonance
- IRE – kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika
- ISE – kmen citlivý na anthelmintika
- Lys – lysin
- MALDI – ionizace desorpcí laserem za účasti matrice

- MRM – selektivní záznam více reakcí
- MS – hmotnostní spektrometrie
- MS/MS – hmotnostní detekce v tandemu
- Na₂CO₃ – uhličitan sodný
- Na₂HPO₄·12H₂O – hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
- NADPH – redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
- NaH₂PO₄·2H₂O – dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát
- NaHCO₃ – hydrogen uhličitan sodný
- NaOH – hydroxid sodný
- NP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
- Orbitrap – elektrostatická orbitální past
- Q1, Q2, Q3 – první, druhý a třetí kvadrupól
- QqQ – trojitý kvadrupól
- RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
- SCAN – skenovací záznam hmotnostního spektra
- SDR – dehydrogenázy/reduktázy z krátkým řetězcem
- Ser – serin
- SIM – statický záznam hmotnostního spektra
- SPE – extrakce na pevnou fázi
- SPME – mikroextrakce na pevné fázi
- SRM – selektivní záznam jedné reakce
- TOF – analyzátor doby letu
- Tyr – tyrosin
- UDP – uridindifosfát
- UGT – UDP-glykosyltransferázy
- UHPLC – ultra-účinná kapalinová chromatografie
- π-SPE-PT – mikro-SPE ve špičkách pipet

9. Použitá literatura

- Adduci, I., Sajovitz, F., Hinney, B., Lichtmannsperger, K., Joachim, A., Wittek, T., & Yan, S. (2022). Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(18), 2339. <https://doi.org/10.3390/ani12182339>
- Amini, S., Ebrahimzadeh, H., Seidi, S., & Jalilian, N. (2020). Preparation of electrospun polyacrylonitrile/Ni-MOF-74 nanofibers for extraction of atenolol and captopril prior to HPLC-DAD. *Mikrochimica acta*, 187(9), 508. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04483-5>
- Araújo, S. A., Soares, A. M. D. S., Silva, C. R., Almeida Júnior, E. B., Rocha, C. Q., Ferreira, A. T. D. S., Perales, J., & Costa-Júnior, L. M. (2017). In vitro anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*. *PloS one*, 12(12), e0189803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189803>
- Azeez, S., Babu, R. O., Aykkal, R., & Narayanan, R. (2012). Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. *Journal of molecular modeling*, 18(1), 151–163. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1035-2>
- Barrett J. (2009). Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology*, 136(12), 1633–1642. <https://doi.org/10.1017/S003118200900568X>
- Bártíková, H., Vokřál, I., Kubíček, V., Szotáková, B., Prchal, L., Lamka, J., Várady, M., & Skálová, L. (2012). Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary parasitology*, 187(3-4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.008>
- Belay, M. H., Precht, U., Mortensen, P., Marengo, E., & Robotti, E. (2022). A Fully Automated Online SPE-LC-MS/MS Method for the Determination of 10 Pharmaceuticals in Wastewater Samples. *Toxics*, 10(3), 103. <https://doi.org/10.3390/toxics10030103>
- Bell, R. M. B., Villalobos, E., Nixon, M., Miguelez-Crespo, A., Murphy, L., Fawkes, A., Coutts, A., Sharp, M. G. F., Koerner, M. V., Allan, E., Meijer, O. C., Houtman, R., Odermatt, A., Beck, K. R., Denham, S. G., Lee, P., Homer, N. Z. M., Walker, B. R., & Morgan, R. A. (2021). Carbonyl reductase 1 amplifies glucocorticoid action in adipose tissue and impairs glucose tolerance in lean mice. *Molecular metabolism*, 48, 101225. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101225>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in parasitology*, 93, 181–238. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>
- Bojko, B., Gorynski, K., Gomez-Rios, G. A., Knaak, J. M., Machuca, T., Cudjoe, E., Spetzler, V. N., Hsin, M., Cypel, M., Selzner, M., Liu, M., Keshjavee, S., & Pawliszyn, J. (2014). Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 94(5), 586–594. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.44>
- Crilly, J. P., Evans, M., Tähepõld, K., Sargison N. (2020) Haemonchosis: dealing with the increasing threat of the barber's pole worm. *Livestock*. Vol. 25, No. 5. <https://doi.org/10.12968/live.2020.25.5.237>

Cvilink, V., Kubíček, V., Nobilis, M., Krízová, V., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Kubenová, M., Novotná, R., Gavelová, M., & Skálová, L. (2008). Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 151(2-4), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.010>

Čermáková, Z., Valenta, Z., Buchta, V. (2009) Parazitičtí helminti člověka. *Folia Gastroenterol Hepatol.* [online]. Dostupné z: <http://www.pro-fovia.org/files/1/2009/1/Cermakova>

Dallière, N., Bhatla, N., Luedtke, Z., Ma, D. K., Woolman, J., Walker, R. J., Holden-Dye, L., & O'Connor, V. (2016). Multiple excitatory and inhibitory neural signals converge to fine-tune *Caenorhabditis elegans* feeding to food availability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(2), 836–848. <https://doi.org/10.1096/fj.15-279257>

Dargie, J. D., & Allonby, E. W. (1975). Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *International journal for parasitology*, 5(2), 147–157. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90021-1)

Dobšíková, R., Šíroková, Z., Blahová, J. (2012) *Farmakologie v produkci potravin, pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie. Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie. Brno.* [online]. Dostupné z <https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Farmakologie-v-produkci-potravin>

Dong, M. W., (2019) *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists.* USA: Wiley. ISBN 9781119313793.

Emery, D. L., Hunt, P. W., & Le Jambre, L. F. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?. *International journal for parasitology*, 46(12), 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>

Eysker, M. (1980). Experiments on inhibited development of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in The Netherlands. *Research in veterinary science*, 30(1), 62–65.

Friedecký, D., Lemr, K. (2012) Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.*, 20 (41), No. 3, p. 152–157.

Furtado, L. F. V., de Paiva Bello, A. C. P., & Rabelo, É. M. L. (2016). Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta tropica*, 162, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021>

Gabrielli, F., Antinucci, M., & Tofanelli, S. (2022). Gene Structure Evolution of the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR) Family. *Genes*, 14(1), 110. <https://doi.org/10.3390/genes14010110>

Giglioti, R., Da Silva Ferreira, D. F., Luciani G. F., Louvandini, H., Okino, C. H., Niciura, S. C. M., De Sena Oliveira, M. C., Talamini do Amarante, A. F., Katiki, L. M. (2022) Potential of *Haemonchus contortus* first-stage larvae to characterize anthelmintic resistance through P-glycoprotein gene expression. *Small Ruminant Research*. 106864. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106864>.

Gräff, M., Buchholz, P. C. F., Stockinger, P., Bommarius, B., Bommarius, A. S., & Pleiss, J. (2019). The Short-chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database (SDRED): A

classification and analysis system for a highly diverse enzyme family. *Proteins*, 87(6), 443–451. <https://doi.org/10.1002/prot.25666>

Háková, M., Havlíková, L. C., Švec, F., Solich, P., & Šatínský, D. (2020). Nanofibers as advanced sorbents for on-line solid phase extraction in liquid chromatography: A tutorial. *Analytica chimica acta*, 1121, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.045>

Harder A. (2002). Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and outlook. *Parasitology research*, 88(3), 272–277. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0535-x>

Harder A. (2016). The Biochemistry of *Haemonchus contortus* and Other Parasitic Nematodes. *Advances in parasitology*, 93, 69–94. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.010>

Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metabolism reviews*, 39(1), 87–144. <https://doi.org/10.1080/03602530600969440>

Holčapek, M. (2020) Hmotnostní spektrometrie a hmotnostní spektrometrie v organické analýze [online]. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>

Horák, T., Čulík, J., Jurková, M., Čejka, P., Kellner, V. (2006) Využití SPE a SPME při analýze piva. *Kvasny Prum.* 52(3): 78-82. <https://doi.org/10.18832/kp2006006>

Chaudhry, U., Redman, E. M., Raman, M., & Gilleard, J. S. (2015). Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 45(11), 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.04.007>

Chen, C., Ding, Y., Liu, H., Sun, M., Wang, H., & Wu, D. (2022). Flubendazole Plays an Important Anti-Tumor Role in Different Types of Cancers. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 519. <https://doi.org/10.3390/ijms23010519>

Chen, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G. H., & Feng, X. S. (2021). Pretreatment and determination methods for benzimidazoles: An update since 2005. *Journal of chromatography. A*, 1644, 462068. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462068>

Ibrahim, S., & Temtem, T. (2022). Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Irum, S., Ahmed, H., Mukhtar, M., Mushtaq, M., Mirza, B., Donskow-Łysoniewska, K., Qayyum, M., & Simsek, S. (2015). Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.028>

Jiaojiao, M., Jinhua, L., Jingchao, H., Min, Z., Hongkun, Z. (2019). Solubility Modeling and Solvent Effect for Flubendazole in 12 Neat Solvents; *Journal of Chemical & Engineering*, 64 (3), 1237-1243. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b01126>

Jurášek, V., Dubinský, P. (1993) *Veterinární parazitologie*. Bratislava: Príroda. ISBN 80-07-00603-6.

Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*, 186(1-2), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>

Karlíček, R., a kol. (2013) *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2202-6.

Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., & Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(24), 3895–3906. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8588-y>

Köhler, P. (2006) *Metabolic physiology of parasites*. *General parasitology*. Parey. <https://doi.org/10.1055/b-0034-47351>

Kotze, A. C., Cowling, K., Bagnall, N. H., Hines, B. M., Ruffell, A. P., Hunt, P. W., & Coleman, G. T. (2011). Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 2, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.02.003>

Křížová-Forstová, V., Lamka, J., Cvilink, V., Hanušová, V., & Skálová, L. (2010). Factors affecting pharmacokinetics of benzimidazole anthelmintics in food-producing animals: the consequences and potential risks. *Research in veterinary science*, 91(3), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.12.013>

Kučera, R. (2020) *Úprava biologického vzorku před analýzou*. Přednáška z předmětu *Analýza exogenních látek*. Dostupné ze studijních materiálů Farmaceutické fakulty UK.

Laing, R., Bartley, D. J., Morrison, A. A., Rezansoff, A., Martinelli, A., Laing, S. T., & Gilleard, J. S. (2015). The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 45(4), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.001>

Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I. J., Beech, R. N., Redman, E., Holroyd, N., Bartley, D. J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M., Jackson, F., Johnston, S. L., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A. A., Reid, A. J., ... Cotton, J. A. (2013). The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome biology*, 14(8), R88. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r88>

Laing, R., Martinelli, A., Tracey, A., Holroyd, N., Gilleard, J. S., & Cotton, J. A. (2016). *Haemonchus contortus*: Genome Structure, Organization and Comparative Genomics. *Advances in parasitology*, 93, 569–598. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.016>

Le Jambre L. F. (1995). Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *International journal for parasitology*, 25(3), 269–273. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00118-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00118-8)

Li, N., Zhang, T., Chen, G., Xu J., Ouyang, G., Zhu, F. (2021) Recent advances in sample preparation techniques for quantitative detection of pharmaceuticals in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116318>

Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Wirtherle, N. C., Nicholas, D. R., Cox, G. G., & Conder, G. A. (2011). 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*, 181(2-4), 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.008>

Macarthur, F.A., Kahn, L.P., Window, R.G. (2013). Immune response of twin-bearing Merino ewes when infected with *Haemonchus contortus*: effects of fat score and prepartum supplementation. *Livest. Sci.* 157 (2e3), 568e576.

Malátková, P., Maser, E., & Wsól, V. (2010). Human carbonyl reductases. *Current drug metabolism*, 11(8), 639–658. <https://doi.org/10.2174/138920010794233530>

Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., & Skálová, L. (2016). The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in parasitology*, 32(6), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>

Matysová, L. (2020) Hmotnostní spektrometrie. Přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Dostupné ze studijních materiálů Farmaceutické fakulty UK.

McKellar, Q. A., & Jackson, F. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in parasitology*, 20(10), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.002>

Mompó-Roselló, O., Ribera-Castelló, A., Simó-Alfonso, E. F., Ruiz-Angel, M. J., García-Alvarez-Coque, M. C., & Herrero-Martínez, J. M. (2020). Extraction of β -blockers from urine with a polymeric monolith modified with 1-allyl-3-methylimidazolium chloride in spin column format. *Talanta*, 214, 120860. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120860>

Murayama, C., Kimura, Y., & Setou, M. (2009). Imaging mass spectrometry: principle and application. *Biophysical reviews*, 1(3), 131. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0015-6>

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2082, Albendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3334, Fenbendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenbendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 4030, Mebendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 40854, Oxfendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxfendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 5430, Thiabendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiabendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 50248, Triclabendazole. Retrieved April 30, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triclabendazole>.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 35802, Flubendazole. Retrieved February 21, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flubendazole>.

Nnadi, P. A., Kamalu, T. N., & Onah, D. N. (2009). The effect of dietary protein on the productivity of West African Dwarf (WAD) goats infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 161(3-4), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.014>

Nováková, L. (2019) Hmotnostní spektrometrie. Přednáška z předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Dostupné ze studijních materiálů Farmaceutické fakulty UK.

Nováková, L., Douša, M., a kol. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha. ISBN 978-80-260-4243-3

Oakley A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, 43(2), 138–151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>

Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z. (2002) *Základní analytická chemie*, skripta. Praha: Karolinum

Ouyang, Y., Li, Q., Kuang, X., Wang, H., Wu, J., Ayepa, E., Chen, H., Abrha, G. T., Zhang, Z., Li, X., & Ma, M. (2020). YMR152W from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a novel aldehyde reductase for detoxification of aldehydes derived from lignocellulosic biomass. *Journal of bioscience and bioengineering*, 131(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.09.004>

Pakharukova, M. Y., Ershov, N. I., Vorontsova, E. V., Katokhin, A. V., Merkulova, T. I., & Mordvinov, V. A. (2012). Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felinus*: identification and characterization. *Molecular and biochemical parasitology*, 181(2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.11.005>

Penning T. M. (2015). The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*, 234, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>

Penning, T. M., Jonnalagadda, S., Trippier, P. C., & Rižner, T. L. (2021). Aldo-Keto Reductases and Cancer Drug Resistance. *Pharmacological reviews*, 73(3), 1150–1171. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000122>

[Phenomenex \(2017\) The Complete Guide to Solid Phase Extraction \(SPE\) - A method development and application guide. \[online\] Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/13868f78-8e68-4e8f-8eb7-d36ec8787b93.pdf>](#)

Playford, M. C., Smith, A. N., Love, S., Besier, R. B., Kluver, P., & Bailey, J. N. (2014). Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). *Australian veterinary journal*, 92(12), 464–471. <https://doi.org/10.1111/avj.12271>

Prchal, L., Bártíková, H., Bečanová, A., Jirásko, R., Vokřál, I., Stuchlíková, L., Skálová, L., Kubíček, V., Lamka, J., Trejtnar, F., & Szotáková, B. (2015). Biotransformation of anthelmintics and the activity of drug-metabolizing enzymes in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Parasitology*, 142(5), 648–659. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001711>

Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 2, 134–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.04.001>

Roos, M. H., Otsen, M., Hoekstra, R., Veenstra, J. G., & Lenstra, J. A. (2004). Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 34(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.002>

Scarcella, S., Solana, M. V., Fernandez, V., Lamenza, P., Ceballos, L., & Solana, H. (2013). Increase of glutathione S-transferase, carboxyl esterase and carbonyl reductase in *Fasciola hepatica* recovered from triclabendazole treated sheep. *Molecular and biochemical parasitology*, 191(2), 63–65. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.09.002>

Skálová, L., a kol. (2017) *Metabolismus léčiv a Jiných Xenobiotik*, Karolinum Press. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/techlib-ebooks/detail.action?docID=5488848>.

Sobotníková, J. (2004) *Extrakce SPE*. [online]. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/SPE_SLE_SFE_2021_web

Stuchlíková, L. R., 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(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>

Štěrbová, K., Rychlá, N., Matoušková, P., Skálová, L., & Raisová Stuchlíková, L. (2023). Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Veterinary research*, 54(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01148-y>

Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sánchez-Flores, A., Brooks, K. L., Tracey, A., Bobes, R. J., Fragoso, G., Sciuotto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H. M., Cai, X., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T. A., Deplazes, P., ... Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature12031>

Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., & Vellema, P. (2015). *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary parasitology*, 209(3-4), 278–280. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.026>

van Wyk, J. A., Gerber, H. M., & Groeneveld, H. T. (1980). A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 47(3), 147–158.

Váradyová, Z., Písařčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., & Várady, M. (2018). Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental parasitology*, 195, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.009>

Vercruyse, J., Claerebout, E. (2014) *Overview of Anthelmintics* [online]. Dostupné z: <https://www.msdsvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/overview-of-anthelmintics>

- Vlčková, H., Pilařová, V., Novák, O., Solich, P., & Nováková, L. (2017). Micro-SPE in pipette tips as a tool for analysis of small-molecule drugs in serum. *Bioanalysis*, 9(11), 887–901. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0033>
- Vokřál, I., Bártíková, H., Prchal, L., Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., & Kubíček, V. (2012). The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 139(10), 1309–1316. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000595>
- Williams, A. R., Ropiak, H. M., Fryganas, C., Desrues, O., Mueller-Harvey, I., & Thamsborg, S. M. (2014). Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasites & vectors*, 7, 518. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0518-2>
- Yang, Y., Ma, Y., Chen, X., Guo, X., Yan, B., & Du, A. (2015). Screening and analysis of Hc-ubq and Hc-gst related to desiccation survival of infective *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary parasitology*, 210(3-4), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.020>
- Yu, J., Sun, H., Zhang, J., Hou, Y., Zhang, T., Kang, J., Wang, Z., Yang, Q., & Long, R. (2020). Analysis of Aldo-Keto Reductase Gene Family and Their Responses to Salt, Drought, and Abscisic Acid Stresses in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 754. <https://doi.org/10.3390/ijms21030754>
- Zhang, T., Qiu, J., Chen, G., Xu, J., Zhu, F., & Ouyang, G. (2019). Uptake of pharmaceuticals acts as an abiotic stress and triggers variation of jasmonates in Malabar spinach (*Basella alba* L.). *Chemosphere*, 236, 124711. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124711>