

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



**STUDIUM TRANSPORTNÍ AKTIVITY
P-GLYKOPROTEINU-9.2 VLASOVKY SLEZOVÉ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, PhD.

Hradec Králové 2023

Bc. Kateřina Kohoutová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce doc. Ing. Petře Matouškové, PhD. za poskytnutí zajímavého tématu, odborný dohled a za veškerou pomoc při provádění experimentů a v průběhu sepisování diplomové práce, zejména za její ochotu, vstřícnost a cenné rady, bez kterých by tato práce nevznikla. Děkuji i katedře biochemických věd za možnost realizace experimentů a také za předání vědomostí v předmětech, které jsem v průběhu studia absolvovala. Děkuji také GA UK, která vypracování této diplomové práce v rámci projektu č. 1171620 podpořila finančně.

Prohlášení

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

V Hradci Králové 2023

Bc. Kateřina Kohoutová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Kohoutová

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, PhD.

Název diplomové práce: Studium transportní aktivity P-glykoproteinu-9.2 vlasovky slezové

Hemonchóza je globálně rozšířené onemocnění postihující drobné přežvýkavce. Původcem tohoto onemocnění je gastrointestinální hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), která se živí krví svého hostitele. Terapie hemonchóz pomocí anthelmintik je komplikována celosvětově se rozšiřující rezistencí. Jednou z možných příčin rozvoje anthelmintické rezistence je snížení koncentrace anthelmintika v organismu červa v důsledku zvýšené exprese P-glykoproteinů z nadrodiny ABC transportérů. Studium transportní aktivity těchto transportérů by mohlo pomoci pochopit mechanismus rozvoje rezistence a zefektivnit léčbu hemonchóz.

Cílem předložené diplomové práce bylo charakterizovat transportní aktivitu P-glykoproteinu-9.2 a jeho interakci s vybraným inhibitorem pomocí heterologního expresního systému. Adherentní buněčná linie HEK293 byla transfekována plazmidem nesoucím gen Pgp-9.2 vlasovky slezové. Úspěšná exprese byla ověřena dot blotem. Transportní eseje bohužel poukazovaly na neschopnost P-glykoproteinu-9.2 přenášet substráty skrz buněčnou membránu v použité buněčné linii.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Kohoutová

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

Title of diploma thesis: The efflux transport activity of P-glycoprotein-9.2 from *Haemonchus contortus*

Haemonchosis is a globally widespread disease affecting small ruminants. The causative agent of the disease is the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*, which feeds of the blood of its host. The treatment of haemonchosis with anthelmintics is complicated by the worldwide spread of resistance. One possible cause of the development of anthelmintic resistance is a decrease in anthelmintic concentration in the worm due to increased expression of P-glycoproteins from the ABC transporter superfamily. The study of the transport activity of these transporters could help to understand the mechanism of resistance development and make the treatment of haemonchosis more effective.

The aim of this thesis was to characterize the transport activity of P-glycoprotein-9.2 and its interaction with a selected inhibitor using a heterologous expression system. The adherent cell line HEK293 was transfected with a plasmid carrying the Pgp-9.2 gene of the *Haemonchus contortus*. Successful expression was verified by dot blot. Unfortunately, transport essays indicated the inability of P-glycoprotein-9.2 to translocate substrates across the cell membrane in the used cell line.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 VLASOVKA SLEZOVÁ (<i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>).....	10
2.1.1 Geografické rozšíření	10
2.1.2 Životní cyklus.....	11
2.1.3 Morfologie.....	12
2.1.4 Hemonchóza	13
2.1.5 Léčba hemonchózy.....	15
2.2 ANTHELMINTIKA.....	16
2.2.1 Anthelmintická rezistence	18
2.2.2 Anthelmintická rezistence u vlasovky slezové.....	20
2.2.3 Metody detekce anthelmintické rezistence.....	22
2.2.4 Prevence rozvoje anthelmintické rezistence	24
2.3 ABC TRANSPORTÉRY	25
2.3.1 Struktura	25
2.3.2 Efluxní mechanismus.....	26
2.3.3 Lidské ACB transportéry.....	27
2.3.4 ACB transportéry u vlasovky slezové.....	31
3. CÍL PRÁCE	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1 MATERIÁLY.....	36
4.1.1 Biologický materiál.....	36
4.1.2 Enzymy.....	36
4.1.3 Chemikálie.....	36
4.1.4 Markery.....	36
4.1.5 Kity	36
4.1.6 Pufry a média	37
4.2 TECHNICKÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	37
4.2.1 Přístroje.....	37
4.2.2 Laboratorní pomůcky	37
4.3 BUNĚČNÉ LINIE.....	38
4.4 METODIKA	39
4.4.1 Pasážování buněk.....	39
4.4.2 Transfekce.....	39
4.4.3 Dot blot	40
4.4.4 Transportní esej.....	41
4.4.5 Stanovení bílkoviny	43
4.4.6 Polymerázová řetězová reakce	44
4.4.7 Agarózová elektroforéza.....	46
4.4.8 Statistické vyhodnocení dat	46
5. VÝSLEDKY	47
5.1 OPTIMALIZACE TRANSFEKCE PLAZMIDEM EXPRIMUJÍCÍM GFP	47
5.2 OVĚŘENÍ ÚSPĚŠNOSTI TRANSFEKCE METODOU DOT BLOT	48
5.3 VYHODNOCENÍ TRANSPORTNÍCH ESEJÍ	49
5.3.1 Rhodaminová esej.....	51
5.3.2 Calceinová esej.....	54
5.3.3 Porovnání výsledků jednotlivých transportních esejí	54
5.4 DETEKCE MYKOPLAZMAT	55
6. DISKUSE	57
7. ZÁVĚR.....	61

8.	POUŽITÉ ZKRATKY	62
9.	SEZNAM TABULEK	64
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
11.	SEZNAM GRAFŮ	66
12.	POUŽITÁ LITERATURA	67

1. ÚVOD

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je vysoce patogenní krevsající hlístice, která napadá abomasum drobných přežvýkavců. Infekce způsobená vlasovkou, tzv. hemonchóza, je závažné onemocnění, které snižuje produkci nakaženého zvířete a následně způsobuje jeho úhyn. V důsledku tohoto onemocnění dochází celosvětově k výrazným ekonomickým a hospodářským ztrátám (Naeem *et al.* 2021).

Zásadní komplikací při léčbě hemonchóz je neustále se prohlubující anthelmintická rezistence. Její rozvoj je spojen zejména s intenzivním a nekontrolovaným podáváním těchto látek, ale také s vysokou adaptabilitou a genetickým polymorfismem vlasovky slezové. V současné době byla rezistence zaznamenána již u všech tříd doposud vyvinutých anthelmintik (Fissiha *et Kinde* 2021, Besier *et al.* 2016a). Vlasovka disponuje jak specifickými, tak nespecifickými mechanismy, jež ji chrání před účinky použitého anthelmintika. Specifické mechanismy se mohou projevit jako změny v sekvencích DNA, jejichž následkem dojde ke změně cílového místa pro anthelmintikum. Nespecifické mechanismy jsou zprostředkovány enzymy metabolizujícími xenobiotika (XMEs, z angl. Xenobiotic Metabolising Enzymes) a membránovými efluxními transportéry (Lespine *et al.* 2012, Matoušková *et al.* 2016).

V souvislosti s rozvojem rezistence jsou nejvíce studovány ABC (z angl. ATP binding cassette) transportéry, které využívají energii skladovanou ve formě adenosin trifostátu (ATP) k aktivnímu transportu substrátu přes buněčnou membránu. Spektrum substrátů transportovaných pomocí těchto membránových proteinů je velmi různorodé. Může se jednat o antibiotika, toxiny, steroidy, polysacharidy, ionty, lipidy, peptidy či proteiny (Thomas *et Rampé* 2018). ABC transportéry hlístic jsou uspořádány do sedmi podrodin (ABC-A až ABC-G) na základě podobnosti ve funkci. Nejvíce pozornosti je věnováno podrodině B, do které patří P-glykoproteiny (Langeland *et al.* 2021). Právě ty jsou v současnosti hojně skloňovány v souvislosti s rozvojem lékové rezistence u hlístic. Hlavním důvodem je opakovaně pozorovaná zvýšená exprese těchto transportérů u rezistentních kmenů. U vlasovky slezové bylo identifikováno 10 homologů P-glykoproteinu, jako hlavní podílejší se na rezistenci byly určeny dva Pgp-2 a Pgp-9 (Ardelli 2013, Pacheto *et al.* 2022).

Právě Pgp-9.2 byl předmětem zkoumání předložené diplomové práce v rámci které jsme studovali jeho transportní aktivitu provedením několika transportních esejí. Charakterizace efluxního transportu P-glykoproteinů a jeho možná inhibice u parazitických hlístic by mohly být klíčovým krokem pro pochopení mechanismu rezistence a také selhání athelmintické terapie.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Vlasovka slezová je vysoce patogenní krevsající hlístice, která se taxonomicky řadí do třídy *Secernentea*, řádu *Strongylida*, čeledi *Trichonstrongylidae* a rodu *Haemonchus*. Typickým hostitelem jsou drobní přežvýkavci, zejména ovce a kozy. Název tohoto parazita je odvozen od místa jeho působení, tedy slezu, konečného oddílu žaludku přežvýkavců (Tak *et al.* 2014). Onemocnění způsobené *H. contortus* se nazývá hemonchóza. Nakažení jedinci trpí anémií a hypoproteinémií. Zasažený trávicí systém nefunguje jak má, je ovlivněn příjem dusíku a organických látek. Zvíře neprospívá a ztrácí hmotnost, což snižuje jeho produktivitu. Těžká nebo neléčená infekce pak může vést i k jeho úhynu (Adduci *et al.* 2022). Primárním důsledkem infekce je signifikantní pokles v produkci vlny a mléka, což vede k výrazným ekonomickým ztrátám (Arsenopoulos *et al.* 2021).

Infekce způsobené parazitickými hlísticemi jsou celosvětově kontrolovány pomocí anthelmintik. I v případě optimálně načasované, strategické léčby je tento způsob terapie velmi nákladný a ve většině případů pouze částečně účinný. Nadměrné a časté používání anthelmintik navíc v minulosti vedlo ke značným problémům s rozšířením rezistentních kmenů hlístic (Roeber *et al.* 2013).

2.1.1 Geografické rozšíření

H. contortus nejlépe prospívá v teplém a vlhkém prostředí. Prevalence hemonchóz je proto značně vysoká v tropických klimatických pásmech obou hemisfér v oblasti mezi rovnoběžkami 23,5° severní a jižní šířky, kde jsou teploty dostatečně vysoké, aby umožnily celoroční vývoj infekčních larev. Klíčovým faktorem je také dostatek vláhy, neboť larvální vývoj a přežívání je v obdobích sucha zpomaleno. Ve vlhkých tropech představuje hemonchóza neustálou hrozbu, neboť zvířata mohou zůstat trvale nakažena.

Výskyt vlasovek není omezen pouze na tropické oblasti. Dalšími místy výskytu jsou jih Afriky, východní Austrálie, vybrané části jihu USA, jih a východ Asie a střed jižní Ameriky, pro která jsou charakteristická teplá deštivá léta. Těchto krátkých období

v roce jsou vlasovky schopné, díky svému vysokému biotickému potenciálu, využívat pro jejich vývoj a působit krátké sezónní epidemie.

Vzhledem ke klíčové úloze klimatických faktorů při určování současného rozšíření helmintů, budou trvalé změny klimatu ovlivňovat globální výskyt a význam vlasovky slezové. To bude mít za následek, že délka období příznivých pro její vývoj se pravděpodobně prodlouží. Zvýšené riziko hemonchózy je relativně velké zejména kvůli, již zmíněnému, vysokému biotickému potenciálu, adaptabilitě a genetickému polymorfismu tohoto parazita. Změny spojené s globálním oteplením již začínají být patrné. V roce 2003 bylo v Nizozemsku zaznamenáno neobvykle vysoké zatížení jehňat infekcí způsobenou *H. contortus*. Podobně tomu je i ve Spojeném Království, kde za posledních 30 let průzkumy ukazují rostoucí prevalenci infekcí způsobených *H. contortus*, zejména v severních oblastech (Besier *et al.* 2016a).

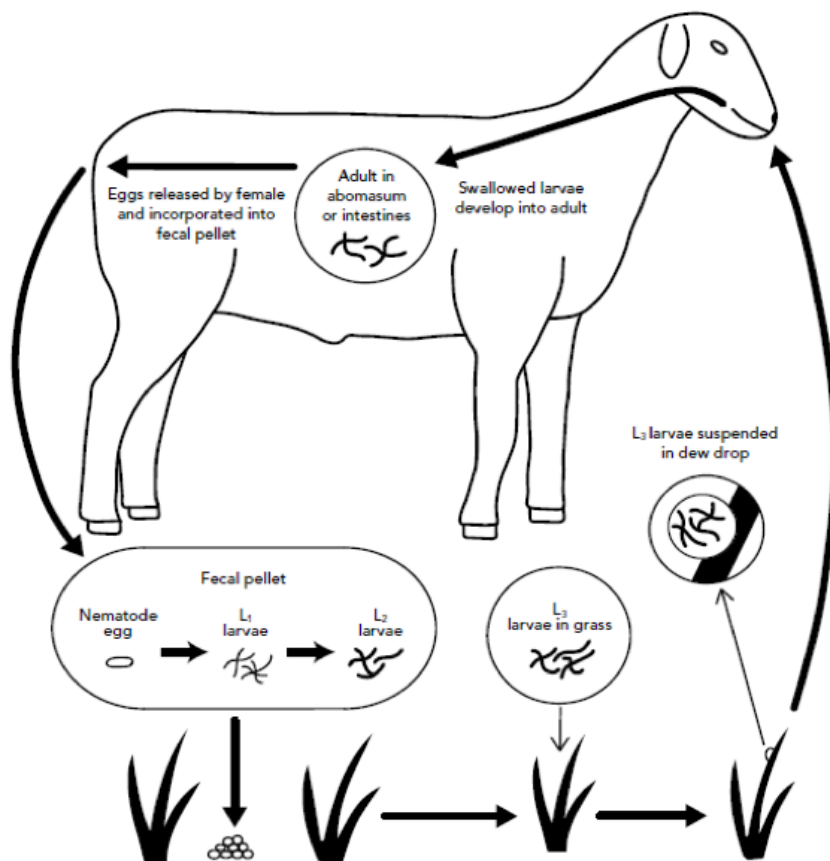
2.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus vlasovek je přímý a zahrnuje šest vývojových stádií (obr. 1). Zhruba první polovinu svého života žije vlasovka volně, mimo tělo hostitele, zbylou část působí paraziticky.

Prvním vývojovým stádiem jsou vajíčka, která naklade dospělá samička v infikovaném slezu. Jedná se o oválný shluk zhruba čtyř buněk, který spolu s trusem opouští tělo hostitele, neboť další změny probíhají výhradně za přítomnosti kyslíku. Poté, už mimo tělo hostitele, pokračuje jejich vývoj prvním (L1), druhým (L2) a třetím larvální stádiem (L3) (Nikolaou *et Gasser* 2006). Tento proces trvá od jednoho do sedmi dnů v závislosti na klimatických podmínkách, optimální teplotní rozmezí je 15-37 °C v kombinaci s 80-100% vlhkostí (Naeem *et al.* 2021). Každá larva prochází dvěma fázemi vývoje. V průběhu první fáze se krmí a roste, druhá fáze je neaktivní (tzv. letargická), během které dochází k podstatným strukturním změnám, jejichž výsledkem je plně vyvinuté larvální stádium s novou kutikulou. Třetí larvální stádium je označováno jako infekční, neboť je spolu s potravou přeneseno do trávicího traktu hostitele. Po ingesci L3 larva putuje do slezu, kde se zbavuje kutikuly a přeměňuje se na čtvrté larvální stádium (L4) a následně dospělou hlístici. Obě tato stádia se živí

krví přežvýkavce. Po oplodnění samcem kladou dospělé samice v infikovaném slezu až několik tisíc vajec denně (Nikolaou *et Gasser* 2006).

Vhodná teplota a vlhkost jsou kritickými parametry pro vývoj zejména prvních tří larválních stádií, tedy té fáze cyklu, kdy vlasovka žije volně. Nepříznivé počasí jsou vlasovky schopny přečkat ve stavu tzv. hypobiózy, během které dočasně zastaví svůj vývoj, dokud nenastanou opět vhodné podmínky (Arsenopoulos *et al.* 2021).



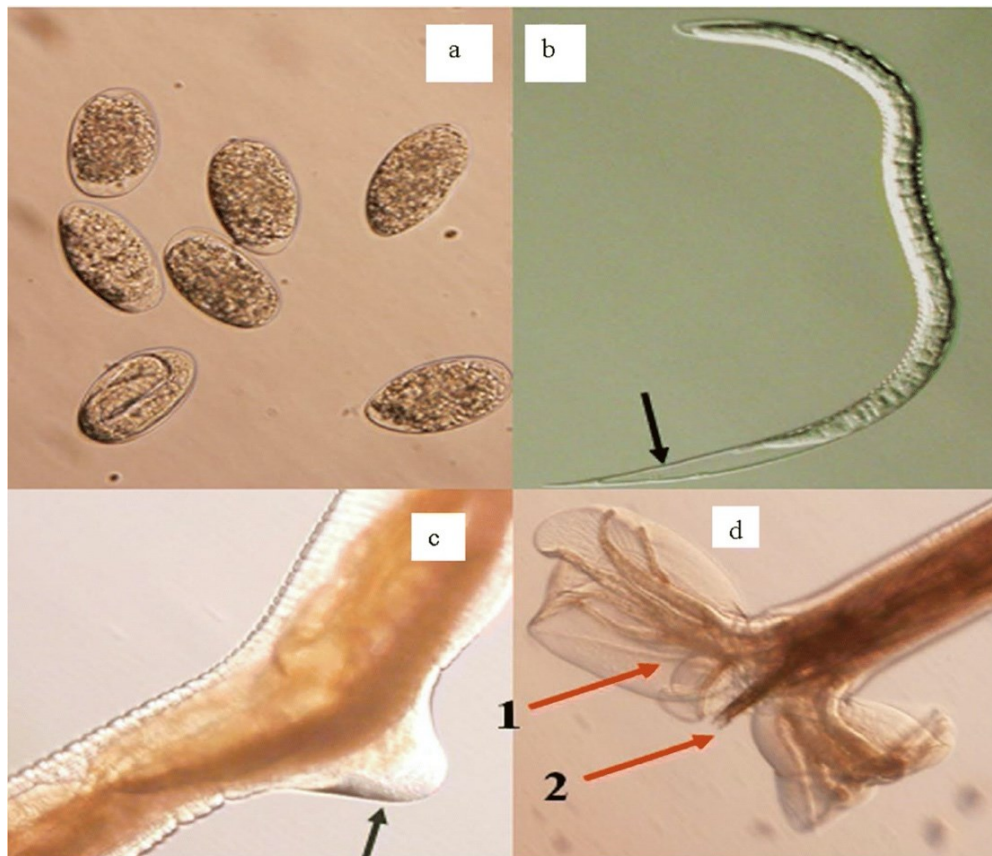
Obrázek 1 Životní cyklus *H. contortus*

Převzato z: Machen *et al.* 1998

2.1.3 Morfologie

Dospělé vlasovky jsou na vlas tenké s postupným anteriorním zúžením. Celé tělo je bělavě žluté, nicméně pozřená krev jej barví do červena. Trávicí trakt začíná ústní dutinou, která je vybavena lancetou sloužící k narušení sliznice hostitele. Samci nesou na konci těla kopulační bursu a pár jehlicovitých spikulí. Samice mají vulvu překrytou

chlopňovitým výběžkem a bílou dělohu, která se obtáčí kolem krví naplněných střev a vytváří pro vlasovku typické vinutí. Rozdíl mezi pohlavími je patrný také v délce těla, samci (10-20 mm) jsou zpravidla menší než samice (18-30 mm). Tělo hlístic je pokryto kutikulou tvořenou zejména kolagenem, která zajišťuje ochranu v gastrointestinálním traktu (Tak *et al.* 2014, Arenopoulos *et al.* 2021, Naeem *et al.* 2021). Vývojová stádia a morfologické znaky *H. contortus* jsou vidět na obrázku 2.



Obrázek 2 Vývojová stádia a morfologické znaky *H. contortus*

Na obrázku jsou vidět vývojová stádia a charakteristické znaky *H. contortus*: (a) – vajíčka, (b) – L3 larva s patrným koncovým zúžením, (c) – chlopňovitý výběžek, který překrývá vulvu dospělé samice, (d) – kopulační bursa (1) a spikule (2) dospělého samce

Převzato z: Naeem *et al.* 2021

2.1.4 Hemonchóza

Patofyziologie hemonchózy a její přidružené klinické projevy jsou spojené s anémií, která se rozvíjí na základě krevsající aktivity parazita. Vlasovky začínají sát

krev ve chvíli, kdy dosáhnou čtvrtého larválního stádia, anémii je možné detekovat 10-12 dní od nakažení. Každý dospělý červ je za den schopen vysát 30-50 μ L krve, což činí 30 ml denně v případě, že je zvíře parazitováno tisícem infekčních larev. Závažnost onemocnění úzce souvisí s počtem usídlených larev a existuje silná korelace mezi ztrátou krve a množstvím dospělých vlasovek v organismu zvířete. Důsledek infekce proto do značné míry závisí na rychlosti příjmu infekčních larev, imunitní odpovědi hostitele a aktivaci erytropoézy (Arsenopoulos *et al.* 2021, Besier *et al.* 2016a).

V závislosti na rozsahu infekce a intenzitě odpovědi organismu rozlišujeme tři typy hemonchózy – hyperakutní, akutní a chronickou.

Hyperakutní forma se vykytuje relativně vzácně. Zvíře je infikováno až 30 000 dospělými vlasovkami, což vede k rozvoji hemoragické gastritidy a signifikantní anémie. Objevuje se také bledost sliznic (zejména spojivek), podkožní edémy, otok čelisti a meléna. Jedinec progresivně slábne až nakonec kolabuje a hyne.

Pro akutní formu tohoto onemocnění je charakteristický pozvolnější rozvoj a infekce 2 000 až 20 000 vlasovkami. Zvíře nejprve jeví známky mírné anémie, která je ale kompenzována aktivací hematopoetických procesů. Po několika týdnech pak dochází k poklesu hematokritu, vyčerpání zásob železa, organismus už nezvládá nahrazovat krevní ztráty, což způsobí vznik perzistentní smrtelné anémie.

Infekci menším počtem vlasovek po delší dobu charakterizujeme jako chronickou formu hemonchózy. K jejímu rozvoji dochází v oblastech s méně příznivými podmínkami pro vývoj larválních stádií a typicky je doprovázena infekcemi způsobenými i jinými helminty. Může být také důsledkem neúspěšné anthelmintické terapie. Klinicky je často tato forma nerozpoznána, dokud nedojde k nárůstu počtu červů, nebo k oslabení imunitního systému hostitele. Zvíře vypadá podvyživené, neroste a dochází ke snížení produkce vlny a mléka (Arsenopoulos *et al.* 2021, Besier *et al.* 2016a).

Existuje několik způsobů, jak potvrdit, zda se jedná o infekci *H. contortus*. V první řadě sledujeme přítomnost klinických projevů onemocnění. Jak již bylo zmíněno, vlasovky jsou velmi plodné a v čerstvém trusu nemocných zvířat je velké

množství vajíček. Ta sice nelze odlišit od vajíček příbuzných cizopasníků, ale pokud jsou přítomny L3 larvy, mohou být spolehlivě identifikovány při koprologickém vyšetření. V tropických a subtropických oblastech je populární systém FAMACHA (z angl. Faffa Malan Chart). Na základě tabulky se hodnotí zabarvení spojivek, díky čemuž je možné odhadnout závažnost anémie. Dále se využívají molekulárně-biologické metody, z nichž dnes převažuje metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. Polymerase Chain Reaction). V případě úmrtí zvířete pitva odhalí přítomnost dospělých vlasovek a značné petechie na sliznici žaludku, dále také ascites, velmi bledé sliznice nebo submadibulární edém. *Post-mortem* diagnóza je velmi přesná, ale je nutná dobrá znalost morfologie dospělé vlasovky. Diagnostiku mohou doplnit i hematologická vyšetření, která potvrdí anémii, snížené hodnoty hematokritu a hemoglobinu (Arsenopoulos *et al.* 2021, Naeem *et al.* 2021).

2.1.5 Léčba hemonchózy

Lékem volby při terapii infekcí způsobených gastrointestinálními hlísticemi jsou anthelmintika (Adduci *et al.* 2022). V posledních 50 letech byla chemická kontrola parazitárních infekcí u hospodářských zvířat velmi úspěšná, a to hlavně díky značné efektivitě anthelmintik, které dokázaly zajistit redukci více než 95 % hlístic. Bohužel intenzivní a nekontrolované podávání těchto látek vedlo k rozšíření rezistentních kmenů vlasovek (Fissiha *et al.* 2021). Existují studie zabývající se dalšími nekonvenčními látkami a jejich vlivem na průběh hemonchóz. Příkladem mohou být antiprotozoika, heterocyklické sloučeniny nebo organofosfáty, které pro své toxické působení nebyly v minulosti použity, ale ukázalo se, že úspěšně fungují proti rezistentním kmenům *H. contortus* (Naeem *et al.* 2021).

Byly vyvinuty kontrolní strategie, jejichž integrace může pomoci zefektivnit léčbu hemonchóz. Mezi tyto strategie patří kvalitní vybraná strava, dále také pravidelná rotace pastvin či cílená léčba. Kvalitní strava zaměřená na dostatečný příjem bílkovin posílí imunitní systém hostitele a redukuje tak proliferaci parazita. Pravidelná rotace pastvin zajistí minimální kontakt s infekčními larvami a zamezí další kontaminaci pastvy novými vajíčky. Praktikuje se také cílená léčba, kdy jsou anthelmintika podána pouze vybraným jedincům na základě pravidelných vyšetření, což umožní vyselektovat

citlivější zvířata a snížit tak náklady na anthelmintika (Arsenopoulos *et al.* 2021, Naeem *et al.* 2021).

2.2 Anthelmintika

Mezi nejčastěji používaná moderní anthelmintika patří benzimidazoly (BZ), makrocyclické laktony (ML), imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny a také deriváty aminoacetonitrilu (AAD) (Arsenopoulos *et al.* 2021). Mechanismus účinku vybraných anthelmintik je shrnut v tabulce 1.

Tabulka 1 Mechanismus účinku vybraných anthelmintik

Cílové místo	Třída	Zástupci
Mikrotubuly	Benzimidazoly	Thiobendazol, mebendazol, albendazol, netobimine
	Aminoacetonitrilové deriváty	Monepantel
Iontové kanály	Tetrahydropyrimidiny	Pyrantel, morantel
	Imidazothiazoly	Levamisol
	Makrocyclické laktony	Ivermektin, moxidectin
	Spiroindoly	Derquantel
	----	Piperazin
Energetický metabolismus	Salicylanilidy	Closantel
	Chlorované sulfonamidy	Clorsulon

Modifikováno podle: Köhler 2001, Abongwa et al. 2017

Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou, od svého uvedení na trh v roce 1960, hojně využívány ke kontrole parazitů jak ve veterinární, tak lidské medicíně. Jedná se o širokospektrá anthelmintika, která jsou dobře tolerována a bez výrazných vedlejších účinků (Son *et al.* 2020). Primárním mechanismem účinku benzimidazolů je selektivní vazba na cytoskeletální protein β -tubulin, který, spolu s α -tubulinem, tvoří základní složku

mikrotubulů (Jaeger *et* Costa 2017). Důsledkem této vazby je inhibice polymerace tubulinu, čímž je zabráněno formaci mikrotubulů. Současně je inhibován příjem glukózy a deplece glykogenu (Taman *et* Azab 2014). Mikrotubuly jsou dynamické buněčné organely, které zasahují do řady životně důležitých pochodů, včetně mitózy, motility a transportu. Interakce s léčivem vede k vychýlení z rovnováhy a akumulaci volného tubulinu. Vzhledem k mnoha klíčovým rolím, které mikrotubuly v buněčných procesech zastávají, vede jejich destrukce ke smrti buňky (Köhler 2001).

Makrocyclické laktony

Do této skupiny anthelmintik se řadí avermektiny (např. ivermektin (IVM) a doramektin) a milbemyminy (např. moxidektin). Tato léčiva se používají ke kontrole nematodóz u zvířat, ale jsou také lékem volby při léčbě onchocerkózy u lidí. Makrocyclické laktony cílí na glutamátém řízené chloridové kanály (GluCl_s), které ve své struktuře obsahují α -podjednotku. Jedná se o proteinové komplexy, které jsou fylogeneticky příbuzné s GABA chloridovými kanály obratlovců a pravděpodobně vykazují i podobnou sestavu podjednotek. Ivermektin působí jako agonista glutamátu, který je zodpovědný za otevírání chloridových kanálů. V nízkých koncentracích ivermektin pouze potencuje účinek glutamátu, při vyšších koncentracích způsobí přímé otevření kanálu (Köhler 2001). Následkem je zvýšený influx chloridových iontů do buňky, hyperpolarizace a svalová paralýza červa (Roeber *et al.* 2013, Köhler 2001).

Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Zástupce této kategorie anthelmintik tvoří dvě strukturně odlišné skupiny látek, jež mají podobný mechanismus účinku - imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny. Tyto látky se chovají jako agonisté neurotransmiteru acetylcholinu. Selektivně aktivují nikotinový receptor pro acetylcholin (nAChR), který se nachází na povrchu svalových buněk hlístic. Vazba těchto léčiv na rozpoznávací místo excitačního receptoru způsobí depolarizaci buňky, jež vede ke spastické paralýze svaloviny červa. (Köhler 2001, Abongwa *et al.* 2017).

Salicylanilidy a substituované fenoly

Mechanismem účinku těchto látek je inhibice energetického metabolismu parazitů. Při terapii hemonchóz se uplatňují zejména closantel, rafoxanid, disofenol a nitroxynil. Jedná se o úzkospektrá anthelmintika, která působí specificky proti krevsajícím helintům. Mají zvláštní význam pro tlumení infekcí způsobených *H. contortus*, protože některé z nich (closantel a disofenol) poskytují prodloužený protektivní účinek i několik týdnů po podání. Tato skutečnost však vedla k rozvoji rezistentních kmenů v endemických oblastech, kde byl intenzivně používán, ale obecně je neobvyklá v situacích s nižším rizikem, kde není opodstatněné použití dlouhodobě působícího anthelmintika (Besier *et al.* 2016b).

Aminoacetonitrilové deriváty

Aminoacetonitrilové deriváty představují novější třídu anthelmintik se širokým spektrem účinku, včetně rezistentních kmenů, a nízkou toxicitou. Nejznámějším zástupcem této skupiny je monepantel, který působí jako agonista nikotinových receptorů pro acetylcholin. Výsledkem této interakce je spastická paralýza a smrt červa. Při podání v nízkých koncentracích (< 1 nM) působí jako pozitivní alosterický modulátor, při koncentracích vyšších (> 0,1 μM) se chová jako plný agonista (Abongwa *et al.* 2017, Lanusse *et al.* 2016).

Spiroindoly

Derquantel byl prvním semisyntetickým členem této skupiny anthelmintik. Na trh byl uveden v roce 2010 pro použití v kombinaci s makrocyclickým laktonem abamektinem pod obchodním názvem STARTECK. Derquantel působí jako antagonist nikotinových receptorů a ve spojení s abamektinem má vynikající širokospektrou účinnost proti parazitickým hlísticím, včetně těch, které jsou rezistentní k benzimidazolům, levamisolu a makrocyclickým laktonům (Abongwa *et al.* 2017).

2.2.1 Anthelmintická rezistence

Anthelmintická rezistence (AR) je definována jako schopnost parazita tolerovat dávku anthelmintika, která by byla pro normální citlivou populaci smrtelná (Muchiut

et al. 2018). Aby došlo k rozvoji rezistence musí část populace vystavená účinkům anthelmintika přežít léčbu, rozmnožit se a předat geny asociované s rezistencí svým potomkům. S další selekcí a reprodukcí se frekvence těchto genů v populaci zvyšuje (Sangster *et al.* 2018).

Protože má rezistence genetický základ, lze ji zaznamenat jako změny v sekvencích DNA, které ovlivňují funkci nebo expresi jiných genových produktů. Cílená rezistence je způsobena mutací receptoru, který je cílem léčiva a souvisí s jeho mechanismem účinku. Tato mutace může být způsobena jednonukleotidovými polymorfismy (SNPs, z angl. Single Nucleotide Polymorphisms) nebo jinými genetickými změnami, jež vedou ke změnám v aminokyselinových sekvencích receptoru a afinitě receptoru k léčivu. Může dojít také ke změnám v pomocných bílkovinách nebo jiných látkách, které se podílí na správném fungování receptoru, změnám v regulačních složkách, které ovlivňují úroveň exprese receptoru, změnám v důležitosti funkce receptoru pro životaschopnost organismu, nebo v remediačních či kompenzačních mechanismech (Lespine *et al.* 2012).

Všechny tyto procesy jsou příkladem specifických mechanismů rezistence, jež zaznamenáváme typicky např. u vlasovek rezistentních k benzimidazolům (Lespine *et al.* 2012). Vedle toho disponují hlístice řadou nescifických mechanismů, které chrání organismus parazita před xenobiotiky nezávisle na jejich struktuře. Tyto mechanismy jsou zprostředkovány enzymy metabolizujícími xenobiotika a membránovými efluxními proteiny (Matoušková *et al.* 2016).

Rezistence byla zaznamenána již u všech tříd anthelmintik a má se za to, že čas potřebný k jejímu rozvoji od uvedení léčiva na trh je v současné době méně než 10 let. Jedná se o dynamický proces, jehož průběh může ovlivnit řada faktorů – hostitel, parazit, typ anthelmintika a jeho užití, prostředí, ve kterém se nakažené zvíře nachází a také klimatické podmínky (Fissiha *et Kinde* 2021).

Ve veterinární medicíně je standardně vyžadováno, aby anthelmintikum při jednorázovém ošetření efektivně odstranilo 95 % parazitických hlístic z organismu hostitele. Účinnost nižší než tato hodnota, a jednoznačně účinnost nižší než 90 %, je považována za důkaz rezistence na anthelmintika (Lespine *et al.* 2012).

2.2.2 Anthelmintická rezistence u vlasovky slezové

Rezistence k benzimidazolům

Rezistence k benzimidazolům je spojena se změnami ve struktuře β -tubulinu. Následkem SNPs dochází k záměně aminokyseliny v genu pro β -tubulin izotyp 1, což brání vazbě léčiva (Fissiha *et* Kinde 2021). Nejčastěji se jedná o bodovou mutaci na 200. pozici, kde dochází k záměně fenylalaninu za tyrozin (F200Y). Mezi další SNPs patří bodové mutace na pozici 167 (F167Y) a 198 (E198A). Ty se však objevují méně často (Arsenopoulos *et al.* 2021).

Rezistence k makrocyclickým laktonům

Mechanismus rezistence k makrocyclickým laktonům nebyl doposud zcela objasněn. Studie zabývající se avermektin- a moxidektin-rezistentními populacemi *H. contortus* zaznamenaly zvýšenou frekvenci alel pro α -podjednotku GluCl_s, což naznačuje, že mutace v tomto genu může souviset s rozvojem rezistence (Fissiha *et* Kinde 2021). Další výzkum vedl ke zjištění, že současně s rezistencí jsou přítomny polymorfismy v genech pro P-glykoprotein (Pgp), které vedou ke zvýšené expresi tohoto efluxního transportéru (Arsenopoulos *et al.* 2021).

Rezistence k imidazothiazolům/tetrahydropyrimidinům

Rezistence k této skupině anthelmintik je založena na změnách v nikotinovém receptoru pro acetylcholin. Provedené studie odhalily mutace v genech pro podjednotku zmíněného receptoru. U vlasovky slezové se jedná konkrétně o geny *Hco-unc-63* a *Hco-acr-8*, které byly detekovány u rezistentních kmenů, nikoli však u kmenů citlivých. Následkem těchto mutací dochází k produkci proteinu, který se váže na nikotinové receptory a znemožňuje tak vazbu léčiva na cílové místo. Jiná skupina vědců zaznamenala významné snížení exprese genů *Hco-unc-29.3* a *Hco-unc-63* u rezistentní populace vlasovek. Navíc byl potvrzen pokles všech čtyř typů genu *Hco-unc-29* (*Hco-unc-29.1*, *-29.2*, *-29.3* a *-29.4*). Po dalším prozkoumání rezistentních kmenů byla zaznamenána vyšší úroveň rezistence u všech subpopulací, u kterých byla snížena exprese genů kódujících nikotinové receptory *Hco-unc-63a*, *-63B*, *-29.2*, *-29.4*, *-26 a -acr-8a* (Arsenopoulos *et al.* 2021).

Rezistence k amincetonitrilovým derivátům

V rámci experimentálních studií byly larvy *H. contortus* po několika generacích selektovány pomocí AAD, konkrétně monepantelu. Vzniklé mutantní linie pak vykazovaly rezistenci k terapeutickým dávkám léčiva. U těchto rezistentních linií byly nalezeny mutace v genech (*Hco-des-2H*, *Hco-acr-23H* a *Hco-MPTL-1*) pro nikotinové receptory. Zaznamenané změny vedly k defektnímu sestřihu, inzercím a bodovým mutacím, jejichž následkem byla předčasná terminace proteinu (Kotze et Prichard 2016, Arsenopoulos et al. 2021).

Rezistence k salicylanilidům

Closantel je úzkospektré anthelmintikum působící pouze proti krevsajícím parazitům jako je *H. contortus* nebo *Fasciola hepatica*. Z tohoto důvodu mu bylo věnováno méně pozornosti, než častěji používaným širokospektrým anthelmintikům jako jsou benzimidazoly (Kotze a Prichard 2016). V rámci studie byl porovnán příjem a metabolismus closantelu u rezistentních a citlivých kmenů. Výsledkem bylo zjištění, že ani jedna skupina nevykazovala schopnost metabolicky zpracovat toto léčivo. Pravděpodobnou příčinou rezistence je tedy snížený příjem closantelu rezistentními parazity, silnější vazba tohoto léčiva k albuminu a zvýšená exkrece z těla rezistentních červů (Arsenopoulos et al. 2021).

Enzymy metabolizující xenobiotika

Xenobiotika představují cizorodé sloučeniny, které nemohou být využity jako zdroj energie, či prekurzor pro syntézu biomolekul. V organismu jsou tyto látky neutralizovány sofistikovanými detoxikačními systémy, které jsou reprezentovány pomocí enzymů metabolizujících xenobiotika. Výsledkem jsou hydrofilnější produkty, které jsou snadněji vyloučeny.

Biotransformace xenobiotik je rozdělena do dvou fází. Během první fáze dochází k odkrytí nebo vnesení hydrofilních skupin do molekuly xenobiotika prostřednictvím oxidačních, redukčních nebo hydrolytických reakcí. Nejdůležitější enzymy první fáze jsou bezesporu cytochromy P450 (CYPs), které katalyzují přeměnu řady exogenních i endogenních sloučenin. V druhé fázi jsou xenobiotika, nebo jejich

metabolity vzniklé během první fáze biotransformace, konjugovány s endogenní sloučeninou. Mezi nejznámější zástupce enzymů druhé fáze patří glutation-S-transferázy (GSTs) a UDP-glykosyltransferázy (UGTs).

Zvýšená exprese různých XMEs může přispívat ke snížení účinnosti anthelmintické terapie a rozvoji rezistence. Navzdory relativně nízkému množství genů pro CYPs u hlístic byla u několika druhů pozorována oxidace anthelmintik a v některých případech byla zvýšená oxidační aktivita spojena s rezistencí k léčivům. S cizorodými sloučeninami interagují také membránové efluxní transportéry, které rozdělujeme do pěti rodin: ABC transportéry, MATE transportéry (z angl. Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporters), MFS transportéry (z angl. Major Facilitator Superfamily Transporters), RND transportéry (z angl. Resistance Nodulation Division Transporters) a SMR transportéry (z angl. Small Multidrug Resistance Transporters). V souvislosti s AR jsou nejvíce studovány ABC transportéry, které budou popsány níže (Matoušková *et al.* 2016).

2.2.3 Metody detekce anthelmintické rezistence

Rezistence nemusí být jediným důvodem selhání anthelmintické terapie. Na vině může být nesprávná dávka léčiva, nebo jiné onemocnění vyznačující se podobnými klinickými příznaky. S nárůstem AR se proto zvyšuje poptávka po spolehlivých a standardizovaných detekčních metodách (Fissiha *et Kinde* 2021).

In vivo metody

Populární metodou pro posouzení účinnosti anthelmintik je test úbytku vajíček v trusu infikovaného zvířete (FECRT, z angl. Faecal Egg Count Reduction Test). Technika porovnává počet vajíček v trusu hostitele před a po léčbě. Vzorky by měly být sbírány 10-14 dní po podání anthelmintika, protože ošetření může dočasně zastavit kladení vajíček, aniž by došlo k usmrcení dospělých hlístic (Fissiha *et Kinde* 2021). Rezistence je v testované populaci přítomna, jestliže procentuální snížení počtu vajíček je menší, než 95 % a spodní 95% hladina spolehlivosti je nižší než 90 %. Tento test má určité limity, mezi které se řadí náklady na jeho provedení, nedostatečná přesnost, odlišný obsah vajíček v jednotlivých vzorcích a také nízká citlivost. I přes vyjmenované

nedokonalosti je tato metoda detekce doporučena Světovou asociací pro pokrok ve veterinární parazitologii (WAAVP, z angl. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) pro rutinní diagnostiku rezistence (Kotze *et* Prichard 2016, Sangster *et al.* 2018).

***In vitro* metody**

V posledních letech je předmětem zkoumání vývoj metod, které by sloužily jako alternativy k FECRT testu. Jednou z možností jsou *in vitro* biologické testy, které využívají volně žijící stádia parazita k měření citlivosti na anthelmintika. Zmíněné testy jsou cenově dostupnější, relativně rychlé a vyhýbají se jakýmkoliv negativním dopadům na hospodářská zvířata a nenesou s sebou některé nepřesnosti FECRT testu (Kotze *et* Prichard 2016).

Ke zjištění přítomnosti rezistence na benzimidazolová anthelmintika se používá test líhnutí vajíček (EHT, z angl. Egg Hatch Test). Benzimidazoly zabraňují embryonaci a líhnutí vajíček parazitických helmintů. Čerstvá vajíčka jsou umístěna do 96-jamkové destičky a inkubována s různými koncentracemi anthelmintika po dobu 48 hodin při teplotě 27 °C. Vajíčka rezistentních kmenů, i přes přítomnost potenciálně letálních dávek léčiva, pokračují ve vývoji a líhnou se v larvy (Fissiha *et* Kinde 2021).

Další metodu detekce je test larvální vývoje (LDT, z angl. Larval Development Test). V průběhu testu jsou vajíčka, nebo první larvální stádia, vystavena různým koncentracím vybraného anthelmintika. Pro citlivé kmeny je inkubace s anthelmintikem letální, zatímco rezistentní jedinci jsou schopni pokračovat ve vývoji a dosáhnout stádia infekční larvy (Jabbar *et al.* 2006, Kotze *et* Prichard 2016).

Test motility larev (LMT, z angl. Larval Motility Test), nebo také test larvální paralýzy, byl vyvinut pro detekci rezistence k nikotinovým agonistům (levamisolu a morantelu) (Taylor *et al.* 2002). Infekční larvy jsou po dobu 24 hodin ve tmě inkubovány při 25 °C v různých koncentracích anthelmintika. Následně jsou na 20 minut vystaveny světlu. Rezistentní larvy jsou světlem stimulovány a jeví známky motility. Poté se vypočítá počet nepohyblivých larev jako podíl z celkového počtu testovaných larev při každé koncentraci (Fissiha *et* Kinde 2021).

Molekulární metody

Molekulární metody se vyznačují vysokou citlivostí a specifitou a je díky nim možné detekovat mutace na úrovni 1 % populace. To představuje velkou výhodu ve srovnání s klasickými parazitárními metodami, neboť dokáží odhalit rezistentní parazity ve velmi raném stádiu. Kromě toho lze materiál na provedení analýzy získat nejen z dospělých vlasovek, ale také z L3 larev a vajíček. Díky tomu je možné se vyhnout porážení hospodářských zvířat za účelem získání dospělců vlasovky slezové. Nejčastěji jsou využívány tyto techniky: alelově-specifická PCR, real-time PCR, pyrosekvencování a PCR, jež analyzuje polymorfismy restričních fragmentů (Kotze et Prichard 2016, Muchiut et al. 2018).

2.2.4 Prevence rozvoje anthelmintické rezistence

Vývoj nových anthelmintik je zdlouhavý a nákladný proces, proto je potřeba s rozvahou používat stávající způsoby, které minimalizují rozvoj rezistence.

Důležitým preventivním opatřením je korektní užití léčiva. Vyšší riziko rozvoje rezistence je spojeno s podáním nedostatečné dávky nebo s častou a opakovanou aplikací anthelmintik ze stejné třídy. Před podáním je proto doporučeno nejprve spolehlivě určit typ hlístice a vybrat účinné anthelmintikum. Dále také dodržet přiložené pokyny a léčivo správně nadávkovat (Fissiha et Kinde 2018). Jinou strategií k oddálení rezistence je použití dvou anthelmintik z různých tříd s podobným spektrem, ale jiným mechanismem účinku. Kombinace mebendazolu s levamisolem se v minulosti ukázala být účinná proti infekcím způsobeným *H. contortus* (Shalaby 2013).

Rezistence je genetická výhoda, jež se fenotypově projeví až poté, co frekvence rezistentních alel dosáhne poměrně vysokých hodnot. Proto je důležité, aby preventivní opatření byla zaměřena na snížení rychlosti, s jakou se kumulují rezistentní alely. Strategie na zpomalení rozvoje rezistence musí být implementovány v rané fázi vývoje rezistence dříve, než se objeví jakýkoliv klinický důkaz o snížení účinku léčiva. Toho lze dosáhnout dodržováním doporučených postupů, které zajistí udržení dostatečné úrovně refugií (Shalaby 2013, Fissiha et Kinde 2021). Refugium je část populace parazita, jež není vystavena působení léčiva. Nepodléhá

tudíž selekčnímu tlaku a zajistí tak udržení citlivých jedinců v populaci (Shalaby 2013, Sangster 2018). Parazitologové proto doporučují selektivní přístup, kdy jsou léky podány pouze zvířatům, která léčbu potřebují. Léčba zvířat, jež jsou méně zatížena červy totiž nepřispívá ke kontrole parazitů a odstraňuje důležitý zdroj refugií, čímž se urychluje rozvoj rezistence (Shalaby 2013).

2.3 ABC transportéry

ABC transportéry se řadí do velké a rozmanité nadrodiny ABC proteinů, jež nacházíme napříč všemi organismy. Jedná se o membránové komplexy, které využívají energii skladovanou ve formě ATP k aktivnímu transportu substrátu přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu. Spektrum substrátů, které mohou být transportovány pomocí ABC transportérů, je velmi různorodé. Může se jednat o antibiotika, toxiny, steroidy, lipidy, ionty, polysacharidy, peptidy či proteiny (Thomas *et al.* 2018).

Podle směru transportu rozlišujeme ABC transportéry s importní a exportní funkcí. U prokaryotických buněk nacházíme oba tyto typy lokalizované v cytoplazmatické membráně. Zajišťují import pro buňku důležitých živin a export endogenních látek či xenobiotik. U eukaryot se mohou tyto transportéry nacházet i na membránách dalších organel. U těchto buněk plní ABC transportéry zejména funkci efluxní pumpy (Dean *et al.* 2022, Wilkens 2015, Beek *et al.* 2014).

2.3.1 Struktura

Typický ABC transportér je tvořen dvěma odlišnými doménami, transmembránovou doménou (TMD, z angl. Transmembrane Domain) a nukleotid-vázající doménou (NBD, z angl. Nucleotide Binding Domain). Lokalizace těchto domén je odlišná v závislosti na druhu buňky, u eukaryot se nachází společně na jednom polypeptidovém řetězci, zatímco u prokaryot jsou odděleně na izolovaných polypeptidových řetězcích. Dále rozlišujeme transportéry podle struktury na celistvé a poloviční. Celistvé sestávají z polypeptidového řetězce, který nese všechny čtyři domény (TMD-NBD-TMD-NBD), zatímco transportéry poloviční jsou tvořeny dvěma polypeptidovými řetězci, kde každý nese dvě domény (TMD-NBD), a aby vznikl plně

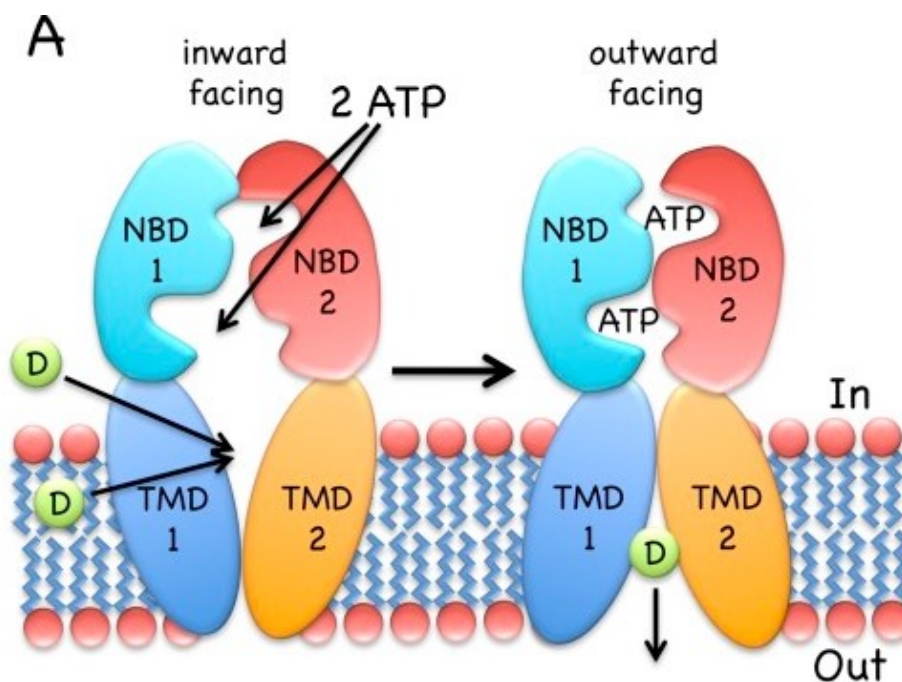
funkční transportér, musí proběhnout dimerizace. Domény, které jsou součástí polovičních transportérů mohou být na obou polypeptidových řetězcích identické (homodimerní) nebo odlišné (heterodimerní) (Wilkens 2015, Beek *et al.* 2014).

Hydrofilní NBD doména je orientována směrem do cytoplazmy. Ve své struktuře obsahuje vysoce konzervované motivy potřebné pro vazbu a hydrolýzu molekuly ATP. První z těchto motivů je Walkerův motiv A, jež skrze lyzinová rezidua interaguje s β - a γ -fosfáty ATP. Dalším nezbytným motivem je Walkerův motiv B, jehož úkolem je koordinace hořčnatých iontů, které jsou nezbytné pro hydrolýzu ATP. Důležitou součástí je i LSGGQ motiv, který se nachází v α -helikální subdoméně a podílí se na vazbě ATP. Dalšími konzervovanými motivy jsou D-smyčka, která přímo nasedá na Walkerův motiv B a představuje kontaktní místo dvou NBD domén, a A-smyčka obsahující ve své sekvenci aromatická rezidua (zejména tyrozin) podílející se na umístění ATP. Dvě NBD domény jsou situovány tak, že konzervované motivy jsou zrcadlově orientovány proti sobě, takže vznikají dvě vazebná místa pro ATP (Beek *et al.* 2014).

TMD doména prochází lipidovou dvojvrstvou a vytváří hydrofobní pór, skrz který je translokován substrát. Je složena z několika segmentů (α -helixů), jejichž počet je variabilní v závislosti na typu transportéru. Efluxní ABC transportéry mají zpravidla 6 α -helixů na jednu TMD doménu, zatímco importéry mají těchto úseků 10-20. TMD domény neobsahují žádné konzervované sekvence a jsou velmi strukturně variabilní, což umožňuje transport chemicky různorodých substrátů (Wilkens 2015).

2.3.2 Efluxní mechanismus

Transportní cyklus začíná vazbou substrátu k TMD doméně (obr. 3). Poté dojde k vazbě dvou molekul ATP a dimerizaci NBD domén. Tento krok vyvolá konformační změny v TMD doménách, které změní svoje postavení ze směřujících dovnitř, na směřující vně. Substrát je následně translokován skrz membránu a uvolněn do extracelulárního prostoru. ATP je hydrolyzováno za vzniku adenosin difosfátu (ADP) a fosfátu (P_i), jakmile jsou tyto molekuly uvolněny a NBD domény disociují, transportér se vrací do výchozího stavu (Wilkens 2015).



Obrázek 3 Exportní mechanismus ABC transportéru

Přiložený obrázek znázorňuje exportní mechanismus ABC transportéru. Transportér je otevřen směrem do cytosolu a na cílové místo TMD domén se váže substrát (D). Dvě molekuly ATP se váží na NBD domény, které následně dimerizují. TMD domény mění svoji konformaci, otevírají se směrem vně a dochází k uvolnění substrátu.

Převzato z: Wilkens 2015

2.3.3 Lidské ABC transportéry

Lidský genom kóduje 48 ABC transportérů, které jsou uspořádány do sedmi podrodin (ABC-A až ABC-G) na základě strukturní podobnosti, pořadí a sekvenční homologie v NBD a TMD doménách (Chen *et al.* 2016, Dean *et al.* 2022). Většina těchto transportních komplexů je lokalizována na kartáčovém lemu enterocytů, kanalikulární membráně hepatocytů, membráně proximálních tubulů ledvin a také jako součást membrány epiteliálních buněk hematencefalické bariéry. Tyto struktury zajišťují transport substrátů přes plazmatické membrány a ochranu buněk před xenobiotiky, zároveň mohou svým hojným výskytem v gastrointestinálním traktu ovlivňovat absorpci, distribuci, exkreci a obecně farmakokinetiku podaných léčiv. Některé ABC transportéry jsou také zodpovědné za udržení homeostázy endogenních agens (Choi *et al.* 2014).

Specifické mutace v genech pro ABC transportéry byly pozorovány u některých genetických onemocnění. Příkladem je cystická fibróza, autozomálně recesivní onemocnění, jehož rozvoj zapříčiňuje mutace v genu pro transmembránový receptor CFTR (z angl. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), který funguje jako chloridový kanál a hraje důležitou roli v exokrinní sekreci. V plicích nemocného dochází následkem mutace k produkci hustého lepkavého hlenu, který může ucpávat dýchací cesty a vést k život ohrožujícím infekcím. Další onemocnění, která souvisí s mutací v genu pro ABC transportér jsou Tangierská choroba (ABCA1), hypertrichóza (ABCA5), Dubinův-Johnsonův syndrom (ABCC2), X-vázaná adrenoleukodystrofie (ABCD1) a další (Dean *et al.* 2022).

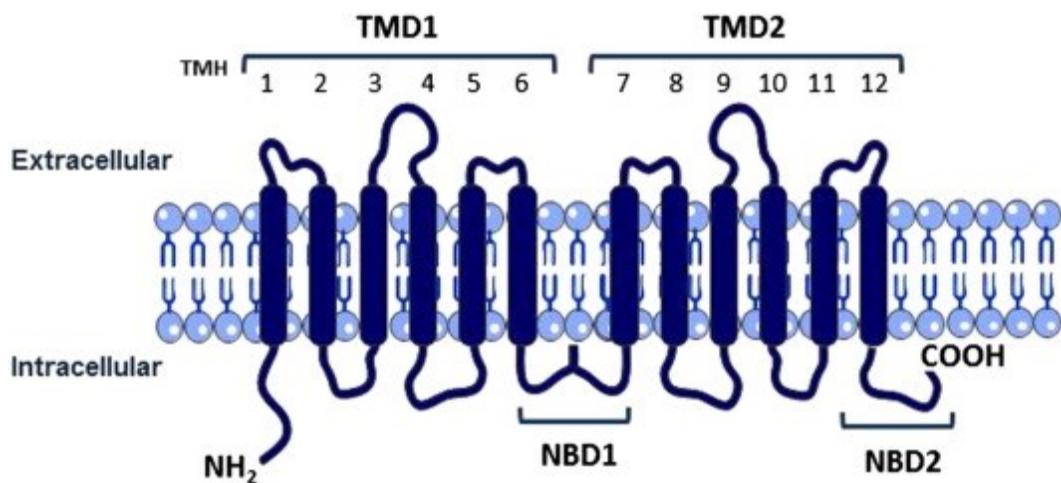
Další významnou oblastí, do které ABC transportéry zasahují, je farmakoterapie nádorových onemocnění. Zejména se jedná o rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR), která bývá jedním z hlavních problémů při léčbě rakoviny. Získaná rezistence chrání buňky nejen před léčivem používaným během terapie, ale také před ostatními léčivy, které, mohou, ale nemusí, být strukturně či funkčně podobné vybranému chemoterapeutiku. Podstatou MDR je zvýšená exprese ABC transportérů rakovinnými buňkami. Výsledkem je zvýšený eflux léčiva z rezistentní buňky. Jedním z možných způsobů, jak se vyvarovat MDR, je doplnit terapii o inhibitory ABC efluxních pump, které zajistí, že intracelulární koncentrace farmaka nebude snížena. MDR fenotyp je spojován zejména se zvýšenou expresí P-glykoproteinu (P-gp/ABCB1), multidrug resistance-associated proteinu 1 (MRP1/ABCC1) a breast cancer resistance proteinu (BCRP/ABCG2) (Chio *et Yu* 2014).

P-glykoprotein

P-glykoprotein (obr. 4), známý také jako multidrug resistance protein 1 (MDR1), byl poprvé izolován z kolchicin-rezistentních buněk ovárií čínského křečka. Je syntetizován v endoplazmatickém retikulu jako glykosylovaný meziprodukt, následně modifikován v Golgiho aparátu a exportován na buněčný povrch. Lidský P-glykoprotein je kódován dvěma MDR geny (MDR1/ABCB1 a MDR3/ABCB4), které vznikají duplikací a jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromozomu 7q21. Výsledný transportér je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem o délce 1280 aminokyselin a molekulové

hmotnosti 170 kDa (Silva *et al.* 2015). Hojně zastoupen je na apikálním povrchu epiteliálních buněk střev, žlučových, proximálních tubulů ledvin, pankreatických vývodů, nadledvin, placenty a také jako součást hematoencefalické a hemototestikulární bariéry. Jeho fyziologickou rolí je eliminace endogenních metabolitů a ochrana orgánů před cizorodými a potenciálně nebezpečnými látkami (Silva *et al.* 2015, Genovese *et al.* 2017, Elmeliegy *et al.* 2020).

P-glykoprotein je schopný vázat a transportovat z buňky velké množství chemicky, strukturně a farmakologicky rozličných sloučenin. Mezi jeho substráty se řadí chemoterapeutika, blokátory vápenatých kanálů, steroidní látky, lineární a cyklické peptidy, fluorescenční barviva, pesticidy a další. Jedná se většinou o slabě amfipatické a relativně hydrofobní sloučeniny, které často, není to ale pravidlem, obsahují ve své struktuře aromatický kruh a kladně nabitý atom dusíku (Silva *et al.* 2015).



Obrázek 4 Topologický model lidského P-glykoproteinu

Struktura P-glykoproteinu je tvořena dvěma homologními polovinami. Součástí každé z nich je jedna TMD doména, která sestává ze šesti α -helixů, a jedna NBD doména orientovaná směrem do cytosolu.

Převzato z: Silva *et al.* 2015

Multidrug resistance-associated protein 1

Multidrug resistance-associated protein 1 byl poprvé klonován z buněčné linie lidského plicního karcinomu v roce 1992. Je kódován ABCC1 genem lokalizovaným na 16p13.1 chromozomu za vzniku 1531 aminokyselin dlouhého polypeptidu s molekulovou hmotností 190 kDa. Tento transportér je exprimován ve většině tkání s relativně vysokými hladinami v plicích, slezině, varlatech, ledvinách, nadledvinách, štítné žláze a močovém měchýři. Dále je také součástí hematoencefalické, hematotestikulární a hematolivorové bariéry. Strukturně se jedná o atypický ABC transportér skládající se ze tří TMD a dvou NBD domén (Yin *et* Zhang 2011, Ma *et al.* 2014).

MRP1 zajišťuje transport širokého spektra substrátů od protinádorových léčiv po fluorescenční barviva. Mezi známá protinádorová léčiva se řadí antracykliny, epipodofylotoxiny, *Vinca* alkaloidy, metotrexát, mitoxantron a kamptoteciny. Dále jsou pomocí něho transportovány další typy farmak jako jsou léky podávané HIV pozitivním pacientům nebo antibiotika. Kromě látek exogenních přes tento transportér probíhá také transport látek tělu vlastních, kde se jedná zejména o volný glutation, glutation-konjugované leukotrieny, konjugáty kyseliny glukuronové a sulfonové (Yin *et* Zhang 2011).

Breast cancer resistance protein

Breast cancer resistance protein byl objeven a poprvé klonován z doxorubicin rezistentních buněk nádoru prsu. Transportér dlouhý 655 aminokyselin, o molekulové hmotnosti 72 kDa, je kódován lidským BCRP genem, který je lokalizován na 4q22 chromozomu. Strukturně se jedná o transportér poloviční, tvořený jednou TMD a jednou NBD doménou, který funguje jako homodimer, či jako tetradimer spojený disulfidickými můstky (Staud *et* Pavek 2005).

BCRP vykazuje vysokou efluxní kapacitu a širokou substrátovou specifitu. Je exprimován na apikální membráně buněk placenty, tenkého a tlustého střeva, hepatocytů, proximálních tubulů ledvin, mozku a v celé řadě nádorových buněk. Mezi jeho substráty patří kladně či záporně nabitě organické ionty, a dále také protinádorová léčiva, například metotrexát, flavopiridol, metoxantron

nebo kaptoteciny. Fotosenzitizéry, jako je feoforbid A či protoporfyrin IX a jim podobné sloučeniny, se také řadí mezi substráty tohoto transportéru, což naznačuje, že BCRP je možnou příčinou buněčné rezistence na fotodynamickou terapii. (Staud *et Pavek* 2005, Mao *et Unadkat* 2015).

2.3.4 ACB transportéry u vlasovky slezové

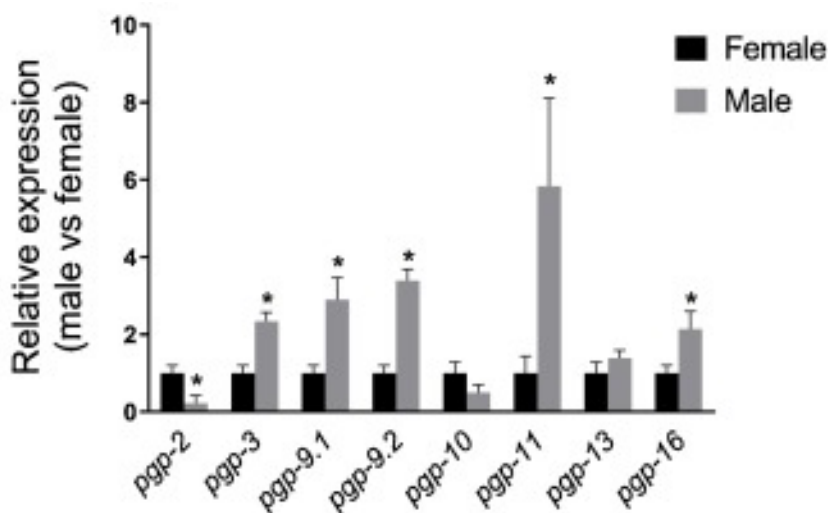
ABC transportéry hlístic jsou uspořádány do sedmi podrodin (ABC-A až ABC-G) na základě podobnosti ve funkci. V současnosti je nejvíce studována hlavně podrodina B, jež zahrnuje P-glykoproteiny (Langeland *et al.* 2021).

P-glykoproteiny jsou významnou součástí detoxikačního systému hlístic. Na rozdíl od savců, u nichž nalezneme dva až tři geny pro P-glykoprotein, vykazují hlístice přítomnost 7 až 15 genů pro tento transportér. Je pravděpodobné, že vyšší počet homologů souvisí s nepřítomností hematoencefalické bariéry a proto P-glykoproteiny zajišťují ochranu a transportní funkce nervové tkáně (Ardelli 2013).

P-glykoproteiny jsou dnes hojně skloňovány v souvislosti s rozvojem anthelmintické rezistence. Důvodem je zvýšená exprese těchto efluxních proteinů, jež byla opakovaně prokázána u rezistentních kmenů. Inhibicí jejich funkce došlo ke zvýšení citlivosti k anthelmintiku. Stejný fenomén byl pozorován i u savců. U vlasovky slezové bylo doposud identifikováno 10 homologů P-glykoproteinu, jako hlavní podílejší se na rezistenci byly určeny Pgp-2 a Pgp-9 (Ardelli 2013, Pacheto *et al.* 2022).

Reyes-Guerrero a kolektiv (2020) sledovali hladiny transkripce mRNA 10 funkčních genů pro P-glykoproteiny u dvou izolátů *H. contortus*, citlivých a rezistentních k IVM, a dále také porovnali genovou expresi v rámci vývojových stádií (vejíčka, L3 a L4 larvy a dospělci). U volně žijících stádií rezistentních vlasovek byla zaznamenána signifikantně zvýšená exprese genu pro Pgp-16. L4 larvy vykazovaly signifikantně zvýšenou míru exprese pro geny Pgp-1, Pgp-2, Pgp-10, Pgp-11 a Pgp-12 a u dospělců byly signifikantně zvýšeny hladiny všech genů pro P-glykoprotein, s výjimkou Pgp-10 (Reyes-Guerrero *et al.* 2020). Konstitutivní exprese P-glykoproteinů u *H. contortus* se liší také v závislosti na pohlaví. Studie provedená v roce 2019 prokázala vyšší míru exprese u samců vlasovky slezové (obr. 5). Rozdíly mezi pohlavími byly patrné i po vystavení dospělců subletálními dávkami IVM. Změny v expresi vyvolané tímto

léčivem byly opět výraznější u samců, signifikantně byla zvýšena zejména exprese Pgp-9.2, dále také Pgp-9.1, Pgp-10 a Pgp-13. U samic se jednalo o Pgp-10 a Pgp-11 (Kellerová *et al.* 2019).



Obrázek 5 Porovnání exprese vybraných *P*-glykoproteinů u samců a samic *H. contortus*
Převzato z: Kellerová *et al.* 2019

***P*-glykoprotein-2**

P-glykoprotein-2 byl prvním ABC transportérem, který byl přímo spojen s rezistencí k makrocyclickým laktonům u *H. contortus*. Godoy a kolektiv (2015) zjistili, že míra exprese Pgp-2 je nejvýraznější v hlavové části červa, konkrétně v oblasti hltanu a hlavových nervů, dále také v blízkosti sensorických papil a na úrovni střev. Ortolog Hco-pgp-2 u *Caenorhabditis elegans* (Cel-pgp-2) je exprimován v oblasti střev a také v hltanu. Střevní Cel-pgp-2 se podílí na pinocytóze, okyselení lysozomů a ukládání lipidů. Lokalizace Hco-pgp-2 v proximální části střeva naznačuje podobnou funkci, včetně modulace a transportu lipidových substrátů. Expese Pgp-2 v hlavové oblasti může být klíčová pro pochopení rezistence k ML, jelikož inaktivace téhož ortologu u *C. elegans* vedla ke zvýšení citlivosti (Godoy *et al.* 2015a).

***P*-glykoprotein-3**

Jedny z hlavních efektorových buněk, se kterými se *H. contortus* v organismu hostitele setká jsou eozinofilní granulocyty. Produkty eozinofilních granul sestávají

ze čtyř vysoce bazických proteinů, které jsou toxické pro hlístice. Issouf a kolektiv (2014) proto sledovali, zda-li přítomnost těchto sloučenin ovlivní míru exprese P-glykoproteinů. Vajíčka *H. contortus* vystavená produktům eozinofilních granul vykazovala zvýšený eflux rhodaminu 123 z buněk. Výstupem studie bylo tvrzení, že produkty eozinofilních granul specificky interagují s P-glykoproteiny, konkrétně došlo k indukci exprese Pgp-3 a v menší míře zvýšené expresi Pgp-16 (Issouf *et al.* 2014).

P-glykoprotein-9

Godoy a kolektiv (2016) sledovali expresi Pgp-9 u dospělých červů *H. contortus*. Objevili, že u vlasovky pravděpodobně existují tři kopie genu pro Pgp-9 (Pgp-9.1, Pgp-9.2 a Pgp-9.3). Pomocí specifické protilátky se podařilo spolehlivě lokalizovat expresi Pgp-9.1 v reprodukčním systému samic, konkrétně v děloze. Význam transportního proteinu v tomto místě se doposud nepodařilo objasnit. Pravděpodobné je, že Pgp-9.1 zajišťuje odstranění xenobiotických produktů z děložní tkáně a transport lipidových molekul nezbytných pro dozrání vajíček. Zvýšená exprese Pgp-9.1 také chrání děložní svalovinu před paralyzujícím účinkem avermektinů, díky čemuž je umožněno uvolňování vajíček z těla samice (Godoy *et al.* 2016).

Pgp-9.2 byl metodou RNA *in situ* hybridizace lokalizován v histologických řezech vlasovky slezové. U samic byl detekován v hypodermis, intestinální tkáni, vaječnicích a děloze (Funioková 2022).

P-glykoprotein-13

P-glykoprotein-13 byl u *H. contortus* lokalizován v trávicím traktu, na povrchu buněk vystylajících vylučovací kanálky, dále také v oblasti hlavových nervů, amfid a hltanu. Přítomnost Pgp-13 na povrchu epiteliálních buněk larev a dospělců vlasovky koresponduje s předchozím nálezem Pgp-9.1 v děloze, jehož zapojení do redukce toxických sloučenin během embryonálního vývoje bylo pozorováno také u *C.elegans* a savců. Pgp-13 sdílí strukturní podobnost s Cel-pgp-12, Cel-pgp-13 a Cel-pgp-14, což naznačuje, že se jedná o ortology s podobnou funkcí (David *et al.* 2018).

P-glykoprotein-16

Funkce a lokalizace transportéru Pgp-16 u vlasovky slezové není doposud objasněna. U dospělých jedinců rezistentních kmenů byla pozorována vyšší míra exprese tohoto homologu v porovnání s ostatními vývojovými stádii. Dále bylo zjištěno, že Pgp-16 spolu s některými dalšími transportéry interaguje s produkty eozinofilních granul hostitele, takže zaujímá důležitou úlohu v ochraně před imunitní reakcí hostitelského organismu (Godoy *et al.* 2015b).

3. CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce bylo studium transportní aktivity efluxního transportéru P-glykoproteinu-9.2 vlasovky slezové.

Práce vyžadovala provedení těchto dílčích kroků:

- Transfekce HEK293 buněk plazmidem nesoucím Pgp-9.2
- Kontrola úspěšnosti transfekce a potvrzení exprese proteinu metodou dot blot
- Provedení transportních esejí za účelem hodnocení efluxní aktivity Pgp-9.2

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Biologický materiál

- Plazmid pCI, Promega
- Primární protilátka: Anti 6x HisTag
- Primery pro detekci Mycoplasma spp.
- Sekundární protilátka: Goat Anti-Rabbit

4.1.2 Enzymy

- DNA polymeráza, Jena Bioscience
- Trypsin, Sigma-Aldrich

4.1.3 Chemikálie

- Agaróza, Serva
- Destilovaná voda
- dNTP směs, New England Biolabs
- PBS/0,5% SDS, Sigma-Aldrich
- Redestilovaná voda
- Substráty P-glykoproteinu
 - Rhodamin 123, Sigma-Aldrich
 - Calcein AM, Sigma-Aldrich
- Valspodar, Sigma-Aldrich

4.1.4 Markery

- Evagreen® fluorescent Gel Stain, JenaBioscience
- DNA ladder 100 bp, New England Biolabs

4.1.5 Kity

- Lipofectamine™ Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific™
- ECL Prime Western blotting detection reagent, Amersham™
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific™

4.1.6 Pufry a média

- Eagle's minimal essential medium (EMEM), Biosera
- Hank's balanced salt solution médium (HBSS), Biosera
- Fosfátový pufr (PBS), Sigma-Aldrich
- TBST pufr
- TEA pufr

4.2 Technické vybavení a laboratorní pomůcky

4.2.1 Přístroje

- Destičkový spektrofotometr Infinite M200 PRO, Tecan
- Elektroforetická souprava OWL, Bio-Rad
- Inkubátor, Memmert
- Kývačka, iBiotech
- Laboratorní váha M-Prove, Sartorius
- Laminární box, Bioair
- Mikrovlnná trouba, Zanussi
- Spark Multimode Reader, Tecan
- Mikroskop NIB-100, Novel Optics
- Mikroskop Eclipse TS 100, Nikon
- PCR cykler MJ mini, Bio-Rad
- Pipety, Eppendorf
- Termomixer, Eppendorf
- UV transluminátor s kamerou, Alliance-Uvitec
- Vortex V1, Biosan
- Vodní lázeň s termostatem, Memmert

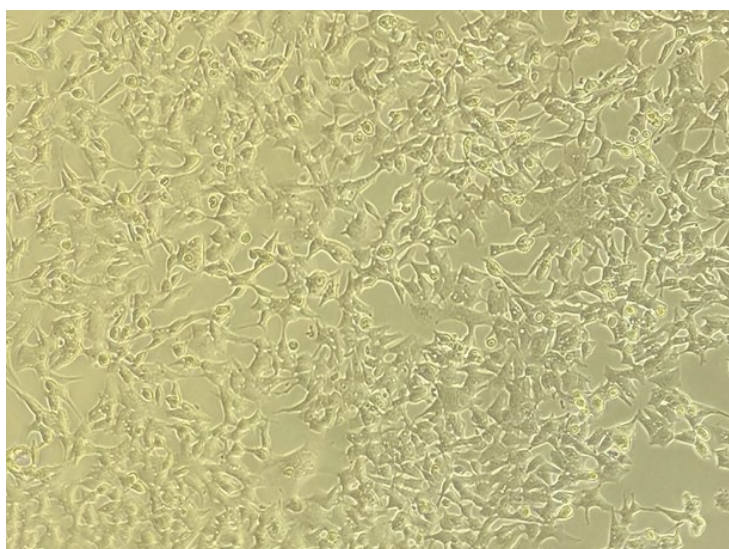
4.2.2 Laboratorní pomůcky

- 24-jamkové destičky, TPP
- 96-jamková mikrotitrační destička, Gama group
- Bürkerova komůrka
- Kahan
- Kádinky

- Krycí sklíčka
- Kultivační lahve 75 cm², TPP
- Laboratorní rukavice
- Mikrozkušavky 0,2 ml, Eppendorf
- Multikanálová pipeta, Eppendorf
- Nitrocelulózová membrána, Bio-rad
- Parafilm
- Pinzeta
- Skleněné pipety 5 ml a 10 ml
- Stojánek na zkumavky
- Špičky, Eppendorf
- Vanička

4.3 Buněčné linie

Pro experiment byly použity HEK293 (Human Embryonic Kidney) buňky (obr. 6). Jedná se o buněčnou linii odvozenou od ledvinných buněk potráceného embrya, která byla transformována lidským adenovirem typu 5. Imortalizace proběhla poprvé v roce 1973 inkorporací fragmentu virového genomu do 19. chromozomu buněk. Tato skutečnost vedla k narušení mechanismů kontroly buněčného cyklu a také k inhibici apoptózy, čehož dnes využíváme k opakované kultivaci buněk (Malm *et al.* 2020).



Obrázek 6 Mikroskopický pohled na buněčnou linii HEK293

4.4 Metodika

4.4.1 Pasážování buněk

Pasážování buněk je proces, při kterém se oddělí část buněk z pěstované kultury a přenesou se do nové kultivační lahve současně s přidáním nového média. Takto je zabezpečen kontinuální růst dané buněčné kultury.

Pasážování probíhalo dvakrát týdně v laminárním boxu při dostatečné konfluenci buněk, tj. 70-90 %. Ke kultivaci bylo použito Eagle's minimal essential medium (EMEM) s L-glutaminem a 10% fetálním hovězím sérem (FBS, z angl. Fetal Bovine Serum). Před samotným pasážováním se nejprve ve vodní lázni zahřálo médium, fosfátový pufr (PBS, z angl. Phosphate Buffer Saline) a trypsin na teplotu 37 °C. Z kultivační lahve se odstranilo médium a přisedlé buňky se dvakrát opláchly 7 ml PBS. Následně byla přidána 1 ml trypsinu a buňky byly vloženy na 3-5 minut zpět do inkubátoru, kde došlo k oddělení buněk ode dna kultivační lahve. Účinek trypsinu byl neutralizován přidáním 5 ml kultivačního média a buňky byly pomocí pipety resuspendovány. Část suspenze, jejíž objem se určil na základě výchozí konfluency, byla umístěna do nové lahve s 12 ml média a inkubována za standardních podmínek (37 °C, 5% CO₂). Buňky byly průběžně testovány na přítomnost mykoplazmat.

4.4.2 Transfekce

Transfekce je proces, během kterého je exogenní nukleová kyselina vnesena do hostitelské buňky za účelem modifikace její genetické informace. Rozvoj technologií v této oblasti dnes umožňuje transfekci různých typů nukleových kyselin, mezi něž se řadí deoxyribonukleové kyseliny (DNA), ribonukleové kyseliny (RNA), ale také malé nekódující RNA kyseliny jako jsou siRNA, shRNA a miRNA (Chong *et al.* 2021).

V průběhu tohoto experimentu byly HEK293 buňky transfekovány 500 ng plasmidové DNA podle instrukcí v Lipofectamine™ 3000 Reagent protokolu.

Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce a nasazeny na 24-jamkovou destičku v počtu 1,5 x 10⁵/ml. Destička byla následně vložena do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂), kde byly buňky kultivovány 24 hodin do 70-90% konfluency. Následující den se v laminárním boxu z jamek odsálo kultivační médium a bylo nahrazeno 450 µl

čerstvého EMEM média, které bylo ve vodní lázni předehřáto na teplotu 37 °C. Pro transfekci byl připraven roztok, který obsahoval plasmidovou DNA, Opti-MEM médium a P3000 Reagent. K němu byl, v poměru 1:1, přidán roztok Lipofectaminu v Opti-MEM médiu. Tato směs se nechala 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě a následně byla po kapkách přidána k buňkám. Do některých jamek bylo přidáno samotné Opti-MEM jako negativní kontrola porovnání aktivit. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky transfekované plazmidem exprimujícím zelený fluorescenční protein (GFP, z angl. Green Fluorescent Protein). Po transfekci byly buňky 72 hodin uloženy v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂.

4.4.3 Dot blot

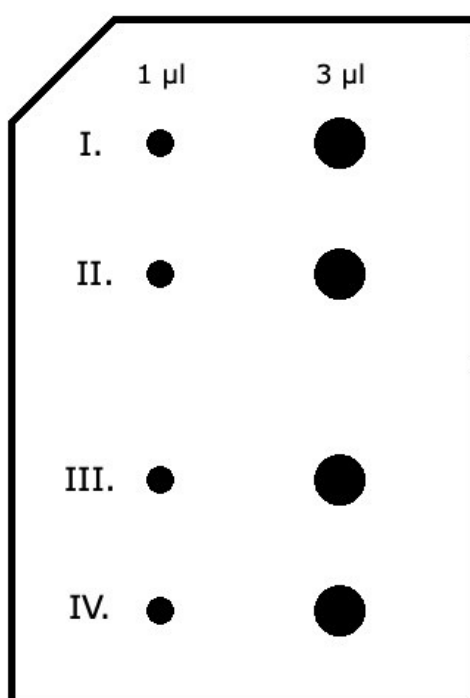
Metoda dot blot je používána pro detekci proteinu ve vzorku. Přítomnost konkrétního proteinu je detekována pomocí primární protilátky, která se na něj specificky váže. Navázaná primární protilátka je následně rozpoznána značenou sekundární protilátkou, kterou je možné chemiluminiscenčně či fluorescenčně detekovat (Gwozdz *et Dorey* 2017).

Během tohoto experimentu sloužila metoda dot blot k ověření úspěšné transfekce. Pro detekci byla použita primární králičí protilátka Anti-6x HisTag a sekundární kozí protilátka Anti-Rabbit s navázanou křenovou peroxidázou. K realizaci chemiluminiscenční detekce byl použit ECL Prime Western blotting detection reagent.

Na nitrocelulózovou membránu byly napipetovány vzorky vybrané z první a druhé transfekce – z každé transfekce jeden vzorek z jamky s transfekovanými buňkami a jeden vzorek z jamky, která sloužila jako pozadí (netransfekované buňky ovlivněné pouze transfekčním činidlem). Každý vzorek byl napipetován dvakrát, vždy v objemu 1 µl a 3 µl. Rozložení vzorků na membráně je vidět na obrázku 7. Po zaschnutí byla membrána v blotovací krabici zalita roztokem 5% mléka a ponechána na kývačce po dobu 60 minut. Následně byl roztok mléka slit, membrána opláchnuta redestilovanou vodou a další hodinu inkubována na kývačce zalitá primární protilátkou. Po uplynutí dané doby se primární protilátka slila, membrána byla čtyřikrát po pěti minutách opláchnuta TBST pufrem a následně opět hodinu inkubována na kývačce

tentokrát s protilátkou sekundární. Poté se sekundární protilátka slila a membrána byla opláchnuta stejně jako po inkubaci s primární protilátkou.

Dalším krokem byla chemiluminiscenční detekce. Roztok A (luminol solution) a roztok B (peroxide solution) z Amersham reakčního kitu byly smíchány v poměru 1:1. Vzniklou směsí byla přelita nitrocelulózová membrána a inkubována v temnu po dobu 5 minut. Pomocí pinzety byla membrána přenesena na eurofólii, do které byla vodotěsně zabalena. Následně byla detekce provedena pomocí zobrazovacího zařízení Uvitec Alliance.



Obrázek 7 Rozložení vzorků na nitrocelulózové membráně

Přiložené schéma ilustruje, jak byly jednotlivé vzorky umístěny na membráně – I. vzorek pozadí z první transfekce, II. vzorek pozadí z druhé transfekce, III. vzorek proteinu z první transfekce, IV. vzorek proteinu z druhé transfekce

4.4.4 Transportní esej

Transportní aktivita transfekovaného Pgp-9.2 byla testována provedením efluxní esej. Jako transportní substráty byla použita fluorescenční barviva rhodamin 123 a calcein AM.

Rhodamin 123 je lipofilní sloučenina, jež se hromadí v mitochondriích díky negativnímu potenciálu na vnitřní membráně těchto organel, zároveň se jedná o specifický substrát ABC transportérů, konkrétně P-glykoproteinu. Eflux rhodaminu zprostředkovaný P-glykoproteinem vedl k vývoji funkčních testů umožňujících analyzovat aktivitu tohoto transportéru. Jedná se zejména o metody průtokové cytometrie a fluorescenční analýzy (Jouan *et al.* 2012). Calcein AM slouží jako indikátor životaschopnosti buněk. Jedná se o nefluoreskující hydrofobní sloučeninu, která snadno prostupuje neporušenou buněčnou membránou. Uvnitř buňky je přeměněn esterázami na zeleně fluoreskující hydrofilní produkt, který sloužil jako substrát pro efluxní transportér (Chung *et al.* 2017).

Při použití fluorescenčního substrátu odráží intenzita fluorescence aktivitu transportéru. Buňky exprimující transportér vykazují nižší hodnoty fluorescence než buňky kontrolní. V přítomnosti inhibitoru by měla intenzita fluorescence být srovnatelná s intenzitou kontrolních buněk, neboť dochází k akumulaci substrátu uvnitř buňky.

Rhodaminová efluxní esej

Ve vodní lázni bylo na teplotu 37 °C zahřáto Hank's balanced salt solution (HBSS) médium a transfekované buňky byly podrobeny mikroskopické kontrole. Následně bylo EMEM médium v jamkách nahrazeno 500 μ l HBSS média, jež obsahovalo 10 μ M rhodamin 123. Do vybraných jamek byl navíc přidán roztok inhibitoru, použit byl valsopodar v koncentraci 10 μ M. Buňky byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby bylo odebráno HBSS médium a buňky byly dvakrát opláchnuty roztokem PBS. V dalším kroku bylo přidáno 500 μ l PBS/0,5% SDS, po čemž následovala 5 minutová inkubace na termomixeru. Po inkubaci bylo z každé jamky odebráno dvakrát 100 μ l a byla změřena fluorescence za následujících podmínek: excitační vlnová délka 458 nm, emisní vlnová délka 530 nm.

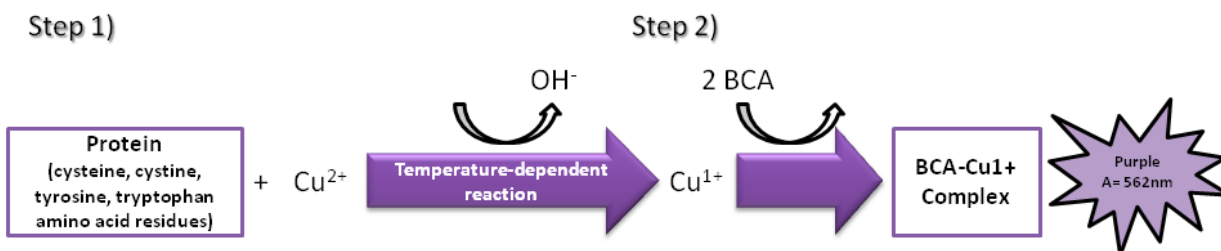
Calceinová efluxní esej

Calceinová efluxní esej byla provedena podobným způsobem jako esej rhodaminová. K buňkám bylo přidáno 500 μ l HBSS média s calceinem AM v koncentraci

2 μM a do vybraných jamek byl opět přidán valspodar v koncentraci 10 μM . Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 60 minut. Následně bylo odebráno HBSS médium, buňky byly dvakrát opláchnuty PBS a 5 minut inkubovány s 500 μl PBS/0,5% SDS. Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 488 nm a emisní vlnové délce 517 nm.

4.4.5 Stanovení bílkoviny

Bicinchoninová metoda (BCA, z angl. Bicinchonin Acid Assay) se využívá ke stanovení koncentrace proteinu ve vzorku. Proteiny reagují v zásaditém prostředí s Cu^{2+} . Výsledkem této interakce je redukce měďnatých iontů na ionty měďné, které následně reagují s kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového komplexu. Koncentrace proteinu je měřena spektrofotometricky, komplex vykazuje nejvyšší absorpenci při vlnové délce 562 nm. Absorbance je úměrná množství proteinu a je vypočítána na základě porovnání se známým standardem, jako je např. boviní sérový albumin (BSA, z angl. Bovine Serum Albumin) (Johnson 2012). Schéma reakce je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8 Schéma stanovení proteinů metodou BCA

Převzato z: Johnson 2012

Ke stanovení koncentrace proteinu byl při tomto experimentu použit Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

Do 96-jamkové destičky se napipetovaly roztoky standardů, které byly připraveny naředěním BSA destilovanou vodou tak, aby odpovídaly příslušným koncentracím (viz tabulka 2). Následně byly do dalších jamek napipetovány vzorky v tetraplikátech. Roztoky standardů i vzorků byly pipetovány v objemu 10 μl . Do takto připravených

jamek bylo pomocí automatické multikanálové pipety přidáno 200 μl pracovního roztoku C připraveného smícháním pracovních roztoků A a B v poměru 50:1. Následně byla destička vložena do termomixeru, kde byla inkubována po dobu 30 minut (37 °C, 350 rpm). Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

Tabulka 2 Příprava roztoků standardů

Číslo roztoku	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	0,1% roztok BSA [μl]	Destilovaná voda [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

4.4.6 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je metoda rychlého zmnožení vybraného úseku DNA. Celý proces amplifikace zahrnuje tři kroky. V prvním kroku proběhne za vysokých teplot denaturace DNA. V druhém kroku dojde k nasednutí primerů na specifická místa DNA. Posledním krokem je syntéza DNA, kterou zajišťuje termostabilní enzym DNA polymeráza. Tyto kroky se cyklicky opakují, dokud nedojde k amplifikaci dostatečného množství původní molekuly DNA (Joshi *et* Deshpande 2011).

Pomocí PCR detekce byla ve vzorcích buněčných kultur testována přítomnost *Mycoplasma sp.* Jako zdrojový materiál sloužilo médium s buňkami, ve kterém daná kultura rostla alespoň dva dny.

Nejprve byl dle tabulky 3 připraven master mix ve 4,5 násobném množství. Připravená směs byla rozpipetována do čtyř 0,2 ml mikrozkušavek po 24 μl . Do dvou mikrozkušavek byl přidán 1 μl kultivačního média, které bylo opakovaně odebíráno buňkám při pasáži. Zkušavka se samotným master mixem sloužila jako negativní

kontrola a do čtvrté mikrozkušavky byla napipetována pozitivní kontrola. Připravené vzorky byly promíchány na vortexu a vloženy do cyklu. Sekvence použitých primerů je vidět v tabulce 4, reakční podmínky jsou popsány v tabulce 5.

Tabulka 3 Složení reakční směsi (master mix)

Složka směsi	Objem [μ l]
10x reakční pufr Taq Buffer	5
10 mM dNTP Mix	1
směs 20 μ M primeru FV-Myco-F a 20 μ M primeru FV-Myco-R	1,25
Polymeráza Taq	0,1
Voda	16,65
Celkový objem	24

Tabulka 4 Použité primery

FV-Myco-F	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
FV-Myco-R	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G

Tabulka 5 Reakční podmínky

Opakování	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	
1x	94	2 min	Aktivace polymerázy
30x	94	30 s	Denaturace
	60	30 s	Annealing
	72	1 min 30 s	Extenze
1x	72	5 minut	Závěrečná extenze
1x	4		Ochlazení vzorku

4.4.7 Agarózová elektroforéza

K detekci produktů amplifikovaných během PCR byla použita agarózová elektroforéza. Princip této metody spočívá v rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů nukleové kyseliny, která je dána jejich rozdílnou velikostí. Platí, že delší fragmenty migrují pomaleji než kratší. Nukleová kyselina nese díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybuje směrem k anodě (Lab Guide 2022).

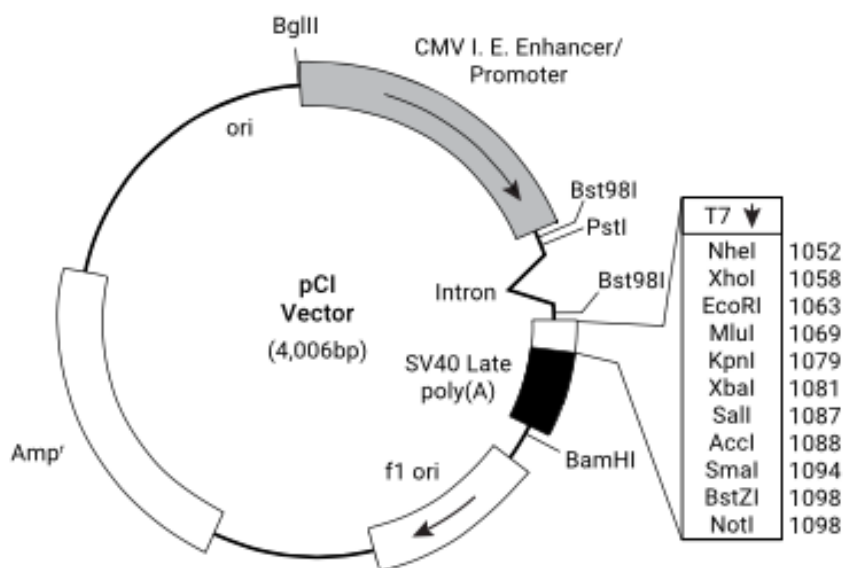
Separace produktů probíhala v 1% agarózovém gelu, který byl připraven rozpuštěním 0,4 g agarózy ve 40 ml TEA pufru. Připravená směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. Ještě horký gel byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem, který byl po zatuhnutí z gelu vytažen. Z každé mikroskopické vaničky bylo odebráno 8 μ l vzorku a na parafilmu smícháno s nanášecí barvou. Po smíchání byly vzorky pomocí pipety vneseny do jamek, které vznikly v gelu po vytažení hřebínku. Spolu se vzorky byly do gelu aplikovány také 4 μ l velikostního markeru, tzv. DNA ladderu, který sloužil k odhadu velikosti separovaných fragmentů. Při tomto experimentu byl použit marker obsahující fragmenty od 100 do 1500 párů bazí dlouhé. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V do úplného rozdělení fragmentů (cca 30 minut).

4.4.8 Statistické vyhodnocení dat

Po normalizaci na množství bílkoviny byla získaná data transportních esejí z měření fluorescence statisticky zhodnocena v programu GraphPad Prism 9 metodou nepárového Studentova t-testu. Za statisticky významné by byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti $p \leq 0,05$.

5. VÝSLEDKY

V předložené experimentální práci byla zkoumána transportní aktivita P-glykoproteinu gastrointestinální hlístice vlasovky slezové. Konkrétně se jednalo o Pgp-9.2 vybraný doc. Ing. Petrou Matouškovou, PhD. Do vektoru pCI (obr. 9) gen Pgp-9.2 zaklonovala a sekvenci ověřila Dr. Linh T. Nguyen, jež působí na katedře biochemických věd.



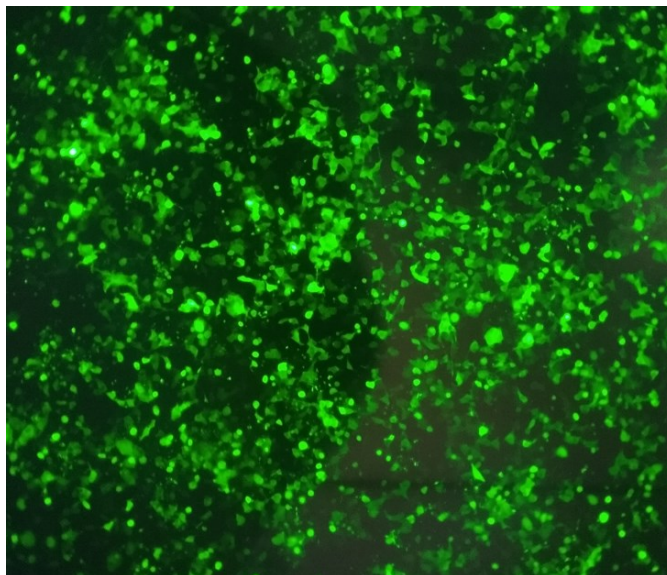
Obrázek 9 Plazmid pCI

Převzato z: *Promega*

5.1 Optimalizace transfekce plazmidem exprimujícím GFP

Před transfekcí plazmidem exprimujícím Pgp-9.2 byly buňky v rámci optimalizace nejprve transfekovány plazmidem exprimujícím zelený fluorescenční protein. Buňky byly nasazeny na 24-jamkovou destičku v počtu $1 \times 10^5/\text{ml}$, $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ a $2 \times 10^5/\text{ml}$. Následujícím krokem byla transfekce buněk plazmidem nesoucím GFP. Po 72 hodinách inkubace byly buňky zkontrolovány pod fluorescenčním mikroskopem, kde v případě úspěšné transfekce bylo možné pozorovat zelené zbarvení a schopnost fluorescence buněk (obr. 10). Nejlépe transfekce proběhla u buněk nasazených v počtu $1,5 \times 10^5/\text{ml}$, a proto byly v tomto počtu buňky nasazeny i při transfekci Pgp-9.2.

Transfekce buněk plazmidem exprimujícím GFP probíhala také současně s transfekcí buněk plazmidem s Pgp-9.2, kde sloužila jako pozitivní kontrola. I v tomto případě byla pozorováno zvýšené zelené zbarvení a schopnost fluorescence buněk.

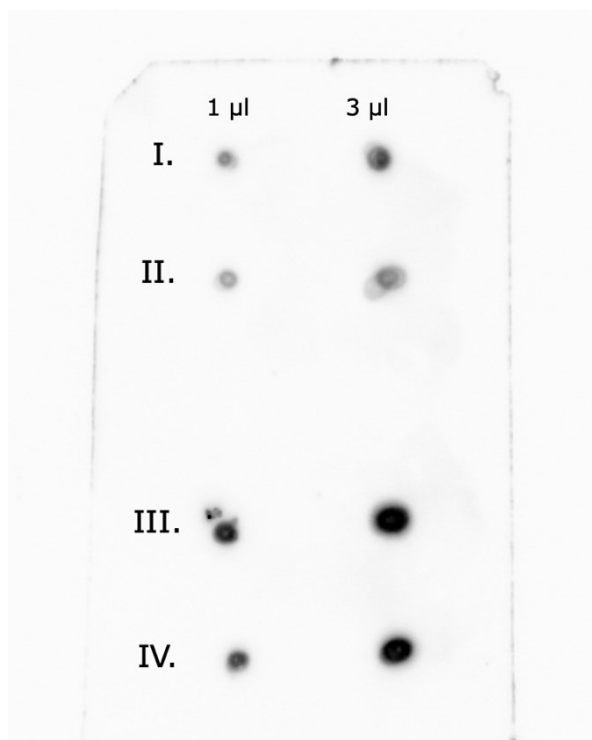


Obrázek 10 Mikroskopický pohled na HEK293 buňky transfekované plazmidem nesoucím GFP

5.2 *Ověření úspěšnosti transfekce metodou dot blot*

Metodou dot blot byla ověřena úspěšnost transfekce a také skutečnost, že HEK293 buňky opravdu exprimují Pgp-9.2. Histidinová kotva přítomná na C-konci exprimovaného proteinu byla detekována pomocí specifické anti-HisTag protilátky. Primární protilátka byla poté rozeznána protilátkou sekundární s navázanou křenovou peroxidázou. Tento enzym reagoval s peroxidem vodíku, který následně způsobil oxidaci luminolu na luminiscenční produkt, který umožnil chemiluminiscenční detekci.

Hodnoceny byly vzorky proteinů odebrané po první a druhé transfekci. Současně s nimi byly pro porovnání na membránu naneseny také vzorky pozadí. Každý vzorek vždy v koncentraci 1 μ l a 3 μ l. Na obrázku 11 je vidět nitrocelulózoová membrána po chemiluminiscenční detekci. V místech, kam byly napipetovány vzorky proteinů je možné pozorovat pozitivní chemiluminiscenci (vzorek III. a IV.). Metodou dot blot bylo tedy potvrzeno, že transfekce buněk plazmidem exprimujícím Pgp-9.2 proběhla úspěšně.



Obrázek 11 Nitrocelulózová membrána po chemiluminiscenční detekci

Nitrocelulózová membrána po chemiluminiscenční detekci - I. vzorek pozadí z první transfekce, II. vzorek pozadí z druhé transfekce, III. vzorek proteinu z první transfekce, IV. vzorek proteinu z druhé transfekce

5.3 Vyhodnocení transportních esejí

Pro posouzení transportní aktivity Pgp-9.2 byla provedena transportní esej. Jako fluorescenční substráty byly použity rhodamin 123 a calcein AM.

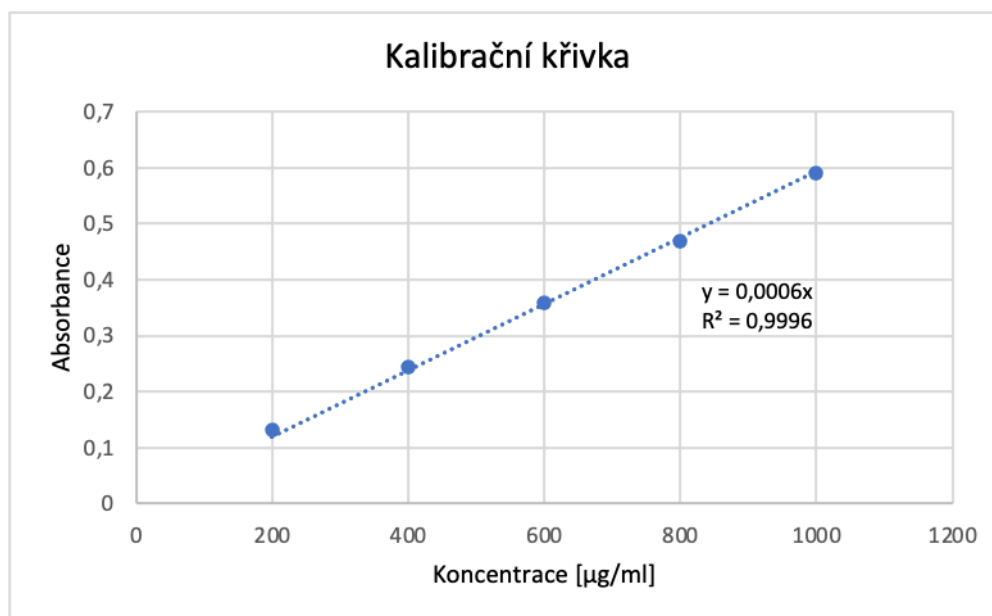
Protože jsou P-glykoproteiny efluxní transportéry, bylo v průběhu experimentu sledováno, zda bude fluorescenční substrát z transfekovaných HEK293 buněk pumpován ven. Současně byla posuzována efluxní aktivita transportéru v přítomnosti inhibitoru. V ideálním případě by buňky exprimující P-glykoprotein vykazovaly nižší míru fluorescence v porovnání s buňkami kontrolními, zatímco u buněk ovlivněných přítomností inhibitoru by byla míra fluorescence podobná buňkám kontrolním. Získané výsledky ale bohužel nekorespondovaly s touto hypotézou.

Zhruba 72 hodin po transfekci byly buňky inkubovány s HBSS médiem, jež, v závislosti na prováděné esej, obsahovalo buď 10 µM rhodamin 123, nebo 2 µM calcein AM. Do vybraných jamek byl přidán valsopodar v koncentraci 10 µM. Po inkubaci

byly buňky vystaveny působení PBS/0,5% SDS, po čemž následovalo měření absorbance. Vzorky byly na destičku nanášeny v duplikátech a výsledné hodnoty absorbance byly zprůměrovány.

Vedle transportní eseje byla pro normalizaci stanovena koncentrace bílkoviny v transfekovaných buňkách. Vzorky pro BCA metodu byly odebrány po transportní eseji a do zpracování uchovány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V den zpracování byly připravené standardní roztoky a odebrané vzorky proteinů smíchány s pracovním roztokem C a po proběhlé inkubaci byla změřena jejich absorbance. Naměřené hodnoty standardních roztoků byly zprůměrovány a byla z nich sestavena kalibrační křivka (graf 1), která znázorňuje závislost naměřené absorbance na koncentraci proteinu. Pomocí rovnice lineární regrese byly poté spočítány koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích.

Graf 1 Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci BSA



Výše zmíněné získané hodnoty byly využity k výpočtu procentuální akumulace fluorescenčního substrátu v HEK293 buňkách. Výsledky jednotlivých transportních esejí jsou shrnuty přiložených tabulkách.

5.3.1 Rhodaminová esej

První rhodaminová esej

Akumulace rhodaminu 123 v buňkách exprimujících Pgp-9.2 byla $120,5 \pm 14,32$ %. V porovnání s kontrolními buňkami bylo v transfekovaných buňkách akumulováno zhruba o 20 % více fluorescenčního substrátu, takže je patrné, že nedošlo k jeho efluxu ven z buněk. Výsledky první rhodaminové transportní eseje jsou vidět v tabulce 6.

Tabulka 6 Výsledky první rhodaminové eseje

	Koncentrace bílkoviny [µg/ml]	Míra absorpance vztažená na bílkovinu	Přepočet na 100 %	Průměr hodnot [%]	Směrodatná odchylka
GFP	246,42	38,29	80,97	80,97	---
Pozadí	456,65	27,75	58,69	100,0	30,08
	382,74	61,21	129,44		
	332,15	52,90	111,87		
Pgp-9.2	298,25	47,52	100,50	120,5	14,32
	363,15	60,27	127,45		
	333,27	63,09	133,42		

Druhá rhodaminová esej

Při druhém pokusu o rhodaminovou esej vykazovaly transfekované buňky akumulaci $89,4 \pm 20,3$ % fluorescenčního substrátu. V porovnání s kontrolními buňkami byla míra fluorescence v transfekovaných buňkách zhruba o 11 % nižší, což naznačuje, že byl rhodamin 123 úspěšně translokován ven z buněk. Nicméně vzhledem k hodnotě směrodatné odchylky nebyla tato změna vyhodnocena jako statisticky významná a není tedy možné s jistotou tvrdit, že tato transportní esej byla úspěšná. Výsledky druhé rhodaminové eseje jsou vidět v tabulce 7.

Tabulka 7 Výsledky druhé rhodaminové eseje

	Koncentrace bílkoviny [µg/ml]	Míra absorpance vztažená na bílkovinu	Přepoččet na 100 %	Průměr hodnot [%]	Směrodatná odchylka
GFP	99,57	296,56	123,47	89,1	34,4
	144,11	131,50	54,75		
Pozadí	167,62	257,48	107,20	100,0	12,3
	88,78	278,88	116,10		
	149,55	204,46	85,12		
	75,55	219,96	91,57		
Pgp-9.2	88,73	207,10	86,22	89,4	20,3
	65,41	159,28	66,31		
	109,76	278,0	115,74		

Třetí rhodaminová esej

Třetí rhodaminová esej byla doplněna o inkubaci buněk v přítomnosti 10 μ M valsopodaru, jež měl inhibovat transportní aktivitu Pgp-9.2. V buňkách exprimujících P-glykoprotein bylo akumulováno průměrně 247,4 \pm 54,6 % rhodaminu 123. Inhibované buňky vykazovaly akumulaci 263,6 \pm 42,8 %. Akumulace substrátu v transfekovaných buňkách byla, stejně jako v případě první rhodaminové esej, vyšší v porovnání s buňkami kontrolními. Buňky vystavené působení inhibitoru akumulovaly o 16,4 % více fluorescenčního substrátu než buňky transfekované Pgp-9.2. Z naměřených hodnot je patrné, že tento experiment se nepovedl, v buňkách transfekovaných plazmidem došlo k větší akumulaci rhodaminu 123, než u buněk kontrolních (pozadí) a nelze tedy tento experiment považovat za povedený. Proto ani porovnání působení inhibitoru nelze provést. Výsledky této esej jsou vidět v tabulce 8.

Tabulka 8 Výsledky třetí rhodaminové esej

	Koncentrace bílkoviny [μ g/ml]	Míra absorbance vztažená na bílkovinu	Přepočet na 100 %	Průměr hodnot [%]	Směrodatná odchylka
GFP	25,24	1572,52	200,82	200,82	---
Pozadí	58,51	756,05	96,55	100,0	3,4
	57,05	810,01	103,45		
Pgp-9.2	14,92	2494,66	318,59	247,4	54,6
	19,58	1862,14	237,81		
	29,22	1454,53	185,76		
Pgp-9.2 s inhibitorem	17,00	2531,55	323,30	263,8	42,8
	21,19	1909,27	243,83		
	17,75	1755,57	224,20		

5.3.2 Calceinová esej

Poslední provedenou transportní esejí byla esej calceinová. Stejně jako v případě třetí rhodaminové esejí byly transfekované buňky vystaveny působení valsopodaru v koncentraci 10 μM . U buněk exprimujících Pgp-9.2 došlo k akumulaci $131,4 \pm 35,1$ % calceinu. Zatímco buňky inkubované v přítomnosti inhibitoru vykazovaly akumulaci $148,4 \pm 22,7$ % tohoto substrátu. Ve srovnání s buňkami kontrolními bylo množství substrátu v transfekovaných buňkách opět vyšší, konkrétně o 31,4 %. Výsledky calceinové esejí jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9 Výsledky calceinové esejí

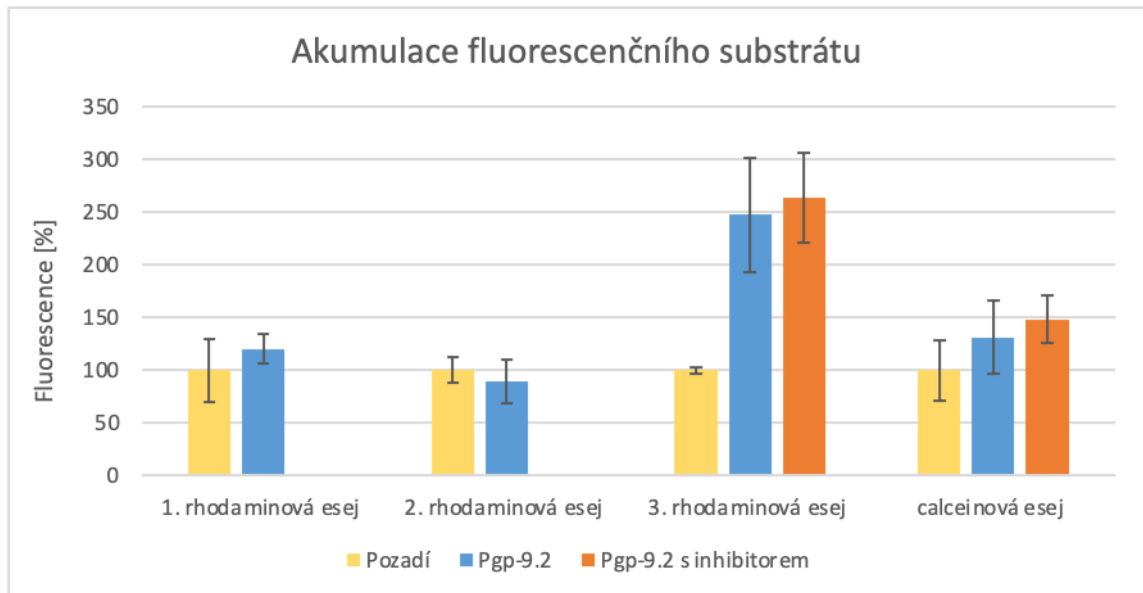
	Koncentrace bílkoviny [$\mu\text{g/ml}$]	Míra absorpance vztažená na bílkovinu	Přepočet na 100 %	Průměr hodnot [%]	Směrodatná odchylka
Pozadí	138,89	160,33	64,24	100,0	28,5
	124,03	254,27	101,88		
	124,45	334,17	133,89		
Pgp-9.2	86,32	439,50	176,09	131,4	35,1
	191,37	225,30	90,27		
	97,73	319,11	127,85		
Pgp-9.2 s inhibitorem	78,49	421,32	168,80	148,4	22,7
	126,35	291,44	116,77		
	108,38	398,37	159,61		

5.3.3 Porovnání výsledků jednotlivých transportních esejí

Porovnání jednotlivých transportních esejí je shrnuto v grafu 2. Pouze u jedné z provedených esejí byla akumulace substrátu v transfekovaných buňkách nižší v porovnání s buňkami kontrolními. U zbývajících tří esejí vykazovaly transfekované buňky akumulaci vyšší. V případě třetí rhodaminové esejí byl dokonce rozdíl akumulací více než dvojnásobný. U inhibovaných buněk byla v obou případech pozorovaná

akumulace substrátu vyšší než v buňkách neovlivněných inhibitorem, což naznačuje, že aktivita P-glykoproteinu byla valspodarem alespoň částečně inhibována, nicméně ani jeden rozdíl nebyl statisticky významný.

Graf 2 Porovnání výsledků jednotlivých transportních esejí



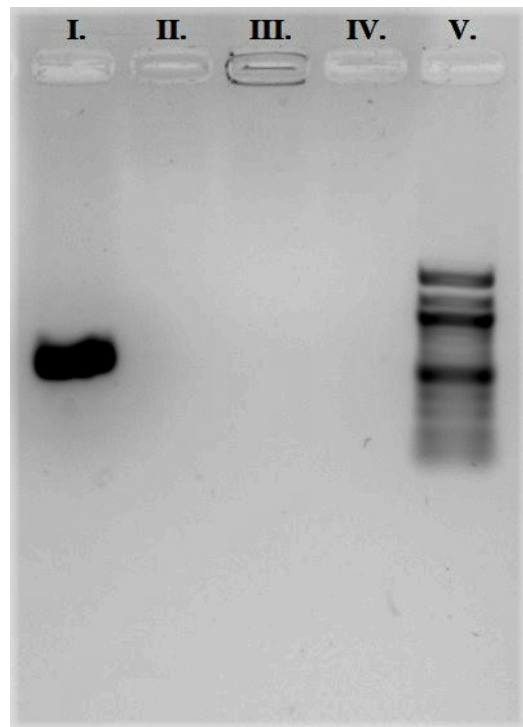
5.4 Detekce mykoplazmat

Metodou PCR detekce bylo testováno, zda kultivovaná buněčná kultura není kontaminovaná přítomností *Mycoplasma spp.* Testování kontaminace je důležitým krokem, jelikož mykoplazmata přítomná v buněčné kultuře mohou značně ovlivnit metabolismus a růst buněk při kultivaci. Dále mohou mít vliv také na syntézu proteinů, sekreci cytokinů nebo dokonce způsobit poškození DNA a RNA. Při provádění experimentů na těchto buňkách poté hrozí, že získané výsledky budou zkreslené.

K amplifikaci fragmentů kontaminující DNA byly použity primery přímo navržené pro detekci mykoplazmat. Pro PCR byly připraveny čtyři mikrozkušavky s master mixem. Do dvou byl přidán vzorek média, který byl odebrán v průběhu práce s buňkami, do třetí mikrozkušavky byla přidána pozitivní kontrola a poslední mikrozkušavka se samotným master mixem sloužila jako negativní kontrola. Po amplifikaci v cykleru byly fragmenty separovány v 1% agarózovém gelu. Vedle

vzorků byl do gelu vnesen také DNA ladder, který sloužil k odhadu velikosti amplifikovaných fragmentů.

Obrázek 12 popisuje výstup agaróзовé elektroforézy, kde je vidět, že došlo k amplifikaci pouze pozitivní kontroly (vzorek I.). Pomocí PCR detekce bylo prokázáno, že používané buněčné kultury nejsou kontaminovány *Mycoplasma spp.* a prezentované výsledky nebyly kontaminací ovlivněny.



Obrázek 12 Výstup agarosové elektroforézy

Výstup agarosové elektroforézy: I. pozitivní kontrola, II. negativní kontrola, III. vzorek 1, IV. vzorek 2, V. DNA ladder

6. DISKUSE

Evoluční tlak na přežití je hnací silou lékové rezistence, která je v současné době velkou výzvou pro moderní medicínu. Rezistence ohrožuje životnost léků a omezuje možnosti léčby pacientů. Její výskyt je vysoký ve všech oblastech onkologie a infekčních chorob. Jakákoliv biologická entita schopná evoluce může pod selekčním tlakem vyvinout schopnost rezistence. Patogeny jsou pak schopny odolávat antimikrobiálními látkami jako jsou antibiotika, antivirotika, antimykotika, antiprotozoika a v neposlední řadě také anthelmintika (Yilmaz *et Schiff* 2021).

Kontrola infekcí způsobených hlísticemi u lidí i zvířat závisí téměř výhradně na použití anthelmintik. Rychlý vývoj rezistence u řady parazitů hospodářských a domácích zvířat je reakcí na široké používání anthelmintik a ohrožuje úspěšnost kontroly parazitů, kteří infikují člověka. V průmyslově vyspělých zemích jsou těmito léčivými každoročně ošetřeny stovky milionů koz, ovcí a skotu. Genetický základ rezistence není doposud zcela vysvětlen, nicméně díky pokrokům v molekulární biologii jsou postupně sekvenovány genomy nejrozšířenějších parazitů. Znalost genomu daného parazita může být použita k pochopení a charakterizaci rozvoje anthelmintické rezistence (Doyle *et Cotton* 2019).

Vlasovka slezová je často používána jako modelový organismus při studiu anthelmintické rezistence u hlístic. Kompletní sekvenace jejího genomu proběhla v rámci velkého projektu mezi lety 2004 až 2013 (Laing *et al.* 2013, Schwarz *et al.* 2013). Od té doby je genom a transkriptom vlasovky dále studován a upřesňován. Jeho výzkumem za použití nových technologií se zabývají např. Doyle a kolektiv (2020). Vedle studia genomu je zkoumán také proteom tohoto parazita. Wang a kolektiv (2019) vypracovali studii v rámci které identifikovali a kvantifikovali proteiny u různých vývojových stádií *H. contortus* (Wang *et al.* 2019, Doyle *et al.* 2020).

Problematikou anthelmintické rezistence se zabývá také výzkumná skupina na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, která se soustředí na studium biotransformačních enzymů vlasovky slezové a jejich roli v rozvoji lékové rezistence. Kromě indukce biotransformačních enzymů disponuje vlasovka i jinými nescifickými mechanismy, které ji chrání před působením

anthelmintik. Tyto mechanismy jsou zprostředkovány efluxními membránovými proteiny, tzv. ABC transportéry. V souvislosti s rezistencí jsou nejvíce studovány Pgp-2 a Pgp-9, jejichž zvýšená exprese vede ke snížení koncentrace anthelmintika v organismu červa.

Transportními proteiny hlístic se zabývali Godoy a kolektiv (2015, 2016), kteří v rámci experimentálních studií lokalizovali P-glykoproteiny vlasovky slezové a studovali také jejich transportní aktivitu. Konkrétně se jednalo o homology Pgp-2, Pgp-9.1 a Pgp-16. Během experimentu byly LLC-PK1 (epithelial-like pig kidney cells) buňky transfekovány vektorem obsahujícím gen pro Pgp. Pomocí rhodaminové či calceinové transportní eseje byla následně zhodnocena transportní aktivita transfekovaného proteinu. Součástí studie bylo také hodnocení aktivity transportérů v přítomnosti makrocyclických laktonů. Výstupem eseje byla inhibice transportu P-glykoproteinu. U Pgp-2 došlo k akumulaci pouze 25 % fluorescenčního substrátu v porovnání s kontrolními buňkami, v případě Pgp-9.1 bylo akumulováno 60 % rhodaminu 123 opět ve srovnání s kontrolními buňkami a buňky transfekované Pgp-16 akumulovaly v porovnání s kontrolními buňkami přibližně 50 % fluorescenčního substrátu (Godoy *et al.* 2015a, 2015b, 2016).

Další studie zabývající se aktivitou efluxních transportérů hlístic byla vypracována Chelladurai a kolektivem (2021). V rámci této výzkumné práce byla studována transportní aktivita P-glykoproteinu hlístice *Toxocara canis* (Tca-Pgp-11.1). Efluxní aktivita byla posuzována také v přítomnosti inhibitoru. Jako expresní systém byly použity LLC-PK1 buňky, jež byly transfekovány plazmidem exprimujícím Tca-Pgp-11.1. Úspěšnost transfekce byla potvrzena kvantitativní PCR metodou a imunoblottingem. Následně byla provedena transportní esej, kde jako modelové substráty byly použity fluorescenční barviva hoechst 33342 a rhodamin 123. Transfekované buňky vykazovaly významný ($p < 0,01$) pokles akumulace hoechst 33342, což svědčilo o funkční efluxní aktivitě Tca-Pgp-11.1. Kinetické studie měřící eflux rhodaminu 123 ukázaly, že efluxní aktivita transportéru se zastavila přibližně po 50 minutách. (Chelladurai *et al.* 2021).

Pro analýzu transportní aktivity P-glykoproteinu je možné použít také metodu průtokové cytometrie. Kerboeuf a Guégnard (2011) pomocí této metody sledovali, jak

přítomnost inhibitoru ovlivní eflux rhodaminu 123 z vajíček *H. contortus*. Jako inhibitory byly použity ortovanadičnan sodný a myší monoklonální protilátka proti lidskému MDR1. Eflux rhodaminu 123 byl posuzován na základě rozdílu intenzity fluorescence v inhibovaných a kontrolních buňkách. Kinetika efluxu byla analyzována pomocí průtokového cytometru v 1,5minutových intervalech po dobu 9 minut. Výsledkem inkubace s inhibitorem byla zvýšená akumulace rhodaminu 123 ve vajíčkách. V porovnání s vajíčky kontrolními byla akumulace substrátu ve vajíčkách inhibovaných 2,4-2,5x vyšší (Kerboeuf *et* Guégnard 2011).

Téma využití průtokové cytometrie pro posouzení vlivu inhibitorů na P-glykoprotein bylo zpracováno také na Farmaceutické fakultě UK. Hned dvě diplomové práce se zabývaly problematikou inhibice transportu lidských ABC transportérů ve snaze testovat nové nízkomolekulární látky, které by mohly být použity při modulaci MDR (Burianová 2020, Jurčáková 2021).

V rámci experimentální části této diplomové práce byla za použití modelových substrátů hodnocena transportní aktivita P-glykoproteinu vlasovky slezové. Jako expresní systém byly použity HEK293 buňky, jež byly v průběhu experimentu transfekovány plazmidem exprimujícím Pgp-9.2. Po úspěšné transfekci byla provedena transportní esej, během které jsme sledovali, jak bude efluxní aktivita P-glykoproteinu ovlivněna působením inhibitoru. Vyhodnocení transportní eseje bylo provedeno porovnáním rozdílů v akumulaci substrátu mezi buňkami inhibovanými, buňkami exprimujícími Pgp-9.2 a buňkami kontrolními. Kýženým výsledkem měla být inhibice P-glykoproteinu, a tudíž vyšší akumulace fluorescenčního substrátu v buňkách, které byly v kontaktu s inhibitorem. Nicméně rozdíly v akumulaci mezi buňkami transfekovanými a buňkami kontrolními poukazovaly na to, že ačkoliv byl Pgp-9.2 úspěšně transfekován, k translokaci substrátu ven z buňky nedošlo.

Je zcela možné, že HEK293 buňky nejsou vhodným expresním systémem pro studium aktivity P-glykoproteinu a pro budoucí experimenty by bylo lepší použít buňky jiné. V předchozích experimentech byla pro expresi Pgp-9.2 na katedře využita suspenzní buněčná linie Expi293, která je odvozená právě z buněčné linie HEK293, kde efluxní esej fungovala. Pgp-9.2 byl schopen transportovat rhodamin 123 ven z buněk. Bohužel použití suspenzní linie pro efluxní eseje se ukázalo jako experimentálně

náročné. Proto byla tato práce vypracována v adherentní linii HEK293, což se bohužel neosvědčilo. Vědečtí pracovníci na katedře biochemických věd se v současné době zabývají testováním buněčné linie LLC-PK1, jež se osvědčila a byla opakovaně použita během výše popsaných experimentů.

Dalším krokem při budoucím výzkumu by mohlo být doplnění tohoto experimentu o inkubaci buněk s různými koncentracemi vybraného anthelmintika, například ivermektinu, který je považován za substrát i inhibitor Pgp (v závislosti na koncentraci). V případě úspěchu pak mohou další experimenty zahrnovat také studium dalších potenciálních inhibitorů Pgp, které by mohly podpořit akumulaci ivermektinu a tím způsobit jeho lepší působení, především u rezistentních parazitů. Je téměř jisté, že rezistence bude představovat stále větší hrozbu pro hospodářská zvířata a také pro člověka. Proto je důležité pokračovat ve výzkumu a co nejdříve objasnit mechanismy jejího vzniku, abychom mohli léčit nakažené jedince a efektivně bojovat proti rezistentním parazitům.

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla zkoumána transportní aktivita P-glykoproteinu-9.2 gastrointestinální hlístice vlasovky slezové. Gen pro Pgp-9.2 byl vnesen v expresním plazmidu do buněčné linie HEK293. Úspěšná transfekce byla potvrzena metodou dot blot. Schopnost efluxu fluorescenčního substrátu byla ověřována provedením rhodaminové a calceinové transportní eseje. Získané hodnoty akumulace substrátu však poukazovaly na neschopnost Pgp-9.2 translokovat substrát ven z HEK293 buněk. Ani použití inhibitoru nemělo signifikantní vliv na zvýšení akumulace substrátu v buňce.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

AAD	aminoacetonitrilové deriváty
ABC	ATP-binding cassette
ADP	adenosin difosfát
AR	anthelmintická rezistence
ATP	adenosin trifosfát
BCA	bicinchonin acid assay, bicinchoninová metoda
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
BCRP	breast cancer resistance protein
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMEM	eagle's minimal essential medium
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
BZ	benzimidazoly
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CYPs	cytochromy P450
EHT	egg hatch test, test líhnutí vajíček
FAMACHA	faffa malan chart
FECRT	faecal egg count reduction test, test úbytku vajíček v trusu zvířete
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
GluCl _s	glutamátem řízené chloridové kanály
GSTs	glutathion-S-transferázy
HBSS	hank's balanced salt solution médium
HEK293	human embryonic kidney
IVM	ivermektin

LDT	larval development test, test vývoje larev
LLC-PK1	epithelial-like pig kidney cells
LMT	larval motility test, test motility larev
MATE	multidrug and toxic compound extrusion transporter
MDR1	multidrug resistance protein 1
MFS	major facilitator superfamily transporter
ML	makrocyclické laktony
MRP1	multidrug resistance-associated protein
nAChR	nikotinové receptory pro acetylcholin
NBD	nucleotide binding domain, nukleotid-vázající doména
PBS	phosphate buffer saline, fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
Pgp	P-glykoprotein
P _i	fosfát
RNA	ribonukleová kyselina
RND	resistance nodulation division transporter
SMR	small multidrug resistance transporter
SNPs	single nucleotid polymorfisms, jednonukleotidové polymorfismy
TMD	transmembrane domain, transmembránová doména
UGTs	UDP-glykosyltransferázy
WAAVP	world association for the advancement of veterinary parasitology, světová asociace pro pokrok ve veterinární paraziologii
XMEs	xenobiotic metabolising enzymes, enzymy metabolizující xenobiotika

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Mechanismus účinku vybraných anthelmintik	16
Tabulka 2 Příprava roztoků standardů.....	44
Tabulka 3 Složení reakční směsi (master mix)	45
Tabulka 4 Použité primery	45
Tabulka 5 Reakční podmínky	45
Tabulka 6 Výsledky první rhodaminové eseje	51
Tabulka 7 Výsledky druhé rhodaminové eseje	52
Tabulka 8 Výsledky třetí rhodaminové eseje.....	53
Tabulka 9 Výsledky calceinové eseje	54

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Životní cyklus <i>H. contortus</i>	12
Obrázek 2 Vývojová stádia a morfologické znaky <i>H. contortus</i>	13
Obrázek 3 Exportní mechanismus ABC transportéru.....	27
Obrázek 4 Topologický model lidského P-glykoproteinu.....	29
Obrázek 5 Porovnání exprese vybraných P-glykoproteinů u samců a samic <i>H. contortus</i>	32
Obrázek 6 Mikroskopický pohled na buněčnou linii HEK293.....	38
Obrázek 7 Rozložení vzorků na nitrocelulóзовé membráně.....	41
Obrázek 8 Schéma stanovení proteinů metodou BCA.....	43
Obrázek 9 Plazmid pCI.....	47
Obrázek 10 Mikroskopický pohled na HEK293 buňky transfekované plazmidem nesoucím GFP.....	48
Obrázek 11 Nitrocelulóзовá membrána po chemiluminiscenční detekci.....	49
Obrázek 12 Výstup agarosové elektroforézy.....	56

11. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci BSA.....	50
Graf 2 Porovnání výsledků jednotlivých transportních esejí	55

12. POUŽITÁ LITERATURA

ADDUCI, I., SAJOVITZ, F., HINNEY, B. *et al.* **Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus***. *Animals*. 2022, 12(18). doi:10.3390/ani12182339

ARDELLI, B.F., **Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes**. *Parasitology International*. 2013; 62 (6): 639-646. doi:10.1016/j.parint.2013.02.008

ARSENOPOULOS, K.V., FTHENAKIS, G.C., KATSAROU, E.I., PAPADOPOULOS, E. **Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats**. *Animals*. 2021; 11(2), 363. doi:10.3390/ani11020363

BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGISON, N.D., WYK, J.A. **Chapter Four - The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants**. *Advances in parasitology*. 2016a; 93: 95-143 . doi:10.1016/bs.apar.2016.02.022

BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGISON, N.D., WYK, J.A. **Chapter six – Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants**. *Advances in Parasitology*. 2016b; 93: 181-248. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024

BEEK, J., GUSKOV A., SLOTBOOM, D.J., **Structural diversity of ABC transporters**. *Journal of general physiology*. 2014; 143(4):419-35. doi:10.1085/jgp.201411164.

BURIANOVÁ, G. **Flow-cytometrická analýza inhibičního vlivu nových cílených léčiv na aktivitu ABC lékových efluxních transportérů**. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta.

DAVID, M., LEBRUN, C., DUGUET, T. *at el.* **Structural model, functional modulation by ivermectin and tissue localization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-13**. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018; 8 (1): 145-157. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.02.001

DEAN, M., MOITRA, K., ALLIKMETS, R. **The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily**. *Human mutation*. 2022; 43(9): 1162-1182. doi:10.1002/humu.24418.

- DOYLE, S.R., COTTON, J.A. **Genome-wide Approaches to Investigate Anthelmintic Resistance.** Trends in Parasitology. 2019; 35 (4): 289-301. doi:10.1016/j.pt.2019.01.004
- DOYLE, S.R., TRACEY, A., LAING, R. *et al.* **Genomic and transcriptomic variation defines the chromosome-scale assembly of *Haemonchus contortus*, a model gastrointestinal worm.** Communications Biology. 2020; 3 (656). doi:10.1038/s42003-020-01377-3
- ELMELIEGY, M., VOURVAHIS, M., GUO, C., WANG, D.D. **Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug-Drug Interaction Studies.** Clinical pharmacokinetics. 2020; 59(6): 699–714. doi:10.1007/s40262-020-00867-1.
- FISSIHA, W., KINDE, M.Z. **Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review.** Infection and Drug Resistance. 2021; 14: 5403-5410. doi:10.2147/IDR.S332378
- FLAY, K.J., HILL, F.I., HERNANDEZ MUGUIRO, D. **A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters.** Animals. 2022; 12(10): 1238. doi:10.3390/ani12101238
- FUNIOKOVÁ, V. **Klonování a příprava sond pro detekci P-glykoproteinů z vlasovky slezové.** Hradec Králové, 2022. Diplomová práce. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta.
- GENOVESE, I., ILARI, A., ASSARAF, Y.G., FAZI, F., COLOTTI, G. **Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins.** Drug resistance updates. 2017, 23-46. doi:10.1016/j.drug.2017.10.003.
- GODOY, P., LIAN, J., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. ***Haemonchus contortus* P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport.** International Journal for Parasitology. 2015a; 45: 85-93. doi:10.1016/j.ijpara.2014.09.008

- GODOY, P., CHE, H., BEECH, R.N., PRICHARD, R.K. **Characterization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics.** Molecular & Biochemical Parasitology. 2015b; 204: 11-15. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.12.001
- GODOY, P., CHE, H., BEECH, R.N., PRICHARD R.K. **Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*.** Parasit Vectors. 2016; 9 (52). doi:10.1186/s13071-016-1317-8
- GWOZDZ, T., DOREY, K. **Chapter 6 - Western Blot.** Basic Science Methods for Clinical Researchers. 2017; 99-117. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00006-0
- HOPFNER, K.P., **Invited review: Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins.** National library of medicine. 2016; 105 (8): 492-504. doi:10.1002/bip.22843.
- CHELLADURAI, J.R.J.J., JONES, D.E., BREWER, M.T. **Characterization of a P-glycoprotein drug transporter from *Toxocara canis* with a novel pharmacological profile.** International Journal for Parasitology: Drug and Drug Resistance. 2021; 17: 191-203. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.10.002
- CHEN, Z., TIANLU S., LEI Z. *et al.* **Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade.** Cancer letters. 2016; 370 (1): 153-64. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- CHOI, Y.H. a YU, A.M., **ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development** [online]. National library of medicine. 2014; 20 (5): 793–807. doi:10.2174/138161282005140214165212.
- CHONG, Z.X., YEAP, S.K., HO, W.Y. **Transfection types, methods and strategies: a technical review.** PeerJ. 2021; 9. doi:10.7717/peerj.11165
- CHUNG, S., NGUYEN, V., LIN, Y.L. **Thaw-and-use target cells pre-labeled with calcein AM for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods. 2017; 447: 37-46. doi:10.1016/j.jim.2017.04.005

- ISSOUF, M., GUÉGNARD, F., KOCH, CH. *et al.* **Haemonchus contortus P-Glycoproteins Interact with Host Eosinophil Granules: A Novel Insight into the Role of ABC Transporters in Host-Parasite Interaction.** PLoS ONE. 2014; 9 (2). doi:10.1371/journal.pone.0087802
- JABBAR, A., IQBAL, Z., KERBOEUF, D. *et al.* **Anthelmintic resistance: the state of play revisited.** Life Sciences. 2016; 79 (26): 2413-2431. doi:10.1016/j.lfs.2006.08.010
- JAEGER, L.H., COSTA, F.A.C. **Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: a systematic review.** BMC Veterinary research. 2017; 13 (358). doi:10.1186/s12917-017-1282-2
- JOHNSON, M. **Protein Quantitation.** Materials and Methods. 2012. ISSN 2329-5139. doi:10.13070/mm.en.2.115
- JOSHI a DESHPANDE. **Polymerase chain reaction: methods, principles and application.** International Journal of Biomedical Research. 2011; 2 (1): 81-97
- JOUAN, E.J., VEE, M.L., DENIZOT, C. **The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2.** Fundamental and Clinical Pharmacology. 2012. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01071.x
- JURČÁKOVÁ, J. **Stanovenie inhibičného vplyvu vybraných cielených protinádorových liečiv na aktivitu ABC liekových efluxných transportérov.** Hradec Králové, 2021. Diplomová práca. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta.
- KAMINSKY, R., DUCRAY, P., JUNG, M. *et al.* **A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes.** Nature. 2008; 452 (7184): 176-180. doi:10.1038/nature06722.
- KELLEROVÁ, P., MATOUŠKOVÁ, P., LAMKA, J. *et al.* **Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in Haemonchus contortus female and male adults.** Veterinary Parasitology. 2019; 273: 24-31. doi:10.1016/j.vetpar.2019.07.006
- KELLEROVÁ, P., NAVRÁTILOVÁ, M., NGUYEN, L. *et al.* **UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of Haemonchus contortus.** Frontiers in Physiology. 2020; 11. doi:10.3389/fphys.2020.594116

- KÖHLER, P. **The biochemical basis of anthelmintic action and resistance.** International Journal for Parasitology. 2001; 31(4): 336-345. doi:10.1016/s0020-7519(01)00131-x
- KERBOEUF, D., GUÉGNARD, F. **Anthelmintics Are Substrates and Activators of Nematode P Glycoprotein.** ASM Journals. 2011; 55 (5). doi:10.1128/AAC.01477-10
- KOTZE, A.C., PRICHARD, R.K. **Chapter Nine - Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis.** Advances in Parasitology. 2016; 93: 397-428. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.012.
- LAB Guide. **Elektroforetická separace nukleových kyselin.** 2022 [online]
<https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- LANGELAND, A., JETTER, H., O'HALLORAN, D.M. **The diversity of ABC transporter genes across the Phylum Nematoda.** Parasitology International. 2021; 83. doi:10.1016/j.parint.2021.102357
- LANUSSE, C.E., ALVAREZ, L.I., LIFSCHITZ, A.L. **Chapter Eleven - Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode.** Advances in Parasitology. 2016; 93: 465-518. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.014
- LESPINE, A., MÉNEZ, C., BOURGUINAT, C., PRICHARD, R.K. **P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance.** Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2012; 2: 58-75. doi:10.1016/j.ijpddr.2011.10.001
- LAINING, R., KIKUCHI, T., MARTINELLI, A. *et al.* **The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery.** Genome biology. 2013; 14 (8). doi:10.1186/gb-2013-14-8-r88
- MA, S., HU, Y., WANG, F. *et al.* **Lapatinib Antagonizes Multidrug Resistance–Associated Protein 1–Mediated Multidrug Resistance by Inhibiting Its Transport Function.** Molecular medicine. 2014; 20(1): 390-399. doi:10.2119/molmed.2014.00059
- MACHEN, R., CRADDOCK, F., CRAIG, T., FUCHS, T. **A *Haemonchus contortus* Management Plan for Sheep and Goats in Texas.** Texas Agrilife Extension. 1998

- MALM, M., SAGHALEYNI, R., LUNDQVIST, M. et al. **Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development.** Scientific reports. 2020; 10. doi:10.1038/s41598-020-76137-8
- MAO, Q., UNADKAT, J.D. **Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update.** The AAPS journal. 2015; 17: 65-82. doi:10.1208/s12248-014-9668-6
- MATE, L., BALLENT, M., CANTÓN, C. et al. **ABC-transporter gene expression in ivermectin-susceptible and resistant *Haemonchus contortus* isolates.** Veterinary Parasitology. 2022; 302. doi:10.1016/j.vetpar.2022.109647
- MATOUŠKOVÁ, P., VOKŘÁL, I., LAMKA, J., SKÁLOVÁ, L. **The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths.** Trends in Parasitology. 2016; 36(6): 481-491. doi:10.1016/j.pt.2016.02.004.
- MUCHIUT, S.M., FERNÁNDEZ, A.S., STEFFAN, P.E. et al. **Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations.** Veterinary Parasitology. 2018; 254: 43-48. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.004.
- NAEEM, M., IQBAL, Z., ROOHI, N. **Ovine haemonchosis: a review.** Tropical Animal Health and Production. 2021; 53 (19). doi:10.1007/s11250-020-02439-8
- NIKOLAOU, S., GASSER, R.B. **Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*.** International journal for parasitology. 2006; 36(8): 859-868. doi:doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.04.007
- NIXON, S.A., WELZ, C., WOODS, D.J. et al. **Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics.** Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2020; 14: 8-16. doi:10.1016/j.ijpddr.2020.07.001
- PACHECO, P.A., LOUVANDINI, H., GIGLIOTI, R. et al. **Phytochemical modulation of P-Glycoprotein and its gene expression in an ivermectin-resistant *Haemonchus contortus* isolate in vitro.** Veterinary Parasitology. 2022; 305. doi:10.1016/j.vetpar.2022.109713

PROMEGA: pCI Mammalian Expression Vector [online].

<https://worldwide.promega.com/products/vectors/protein-expression-vectors/pci-mammalian-expression-vector/?catNum=E1731>

REYES-GUERRERO, D.E., CEDILLO-BORDA, M., ALONSO-MORALES, R.A. *et al.* **Comparative study of transcription profiles of the P-glycoprotein transporters of two *Haemonchus contortus* isolates: Susceptible and resistant to ivermectin.** *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2020; 238. doi:10.1016/j.molbiopara.2020.111281

ROBEY, R.W., PLUCHINO, K.M., HALL, M.D. *et al.* **Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer.** *National library of medicine*. 2018; 18(7): 452–464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8.

ROEBER, F., JEX, A.R., GASSER, R.B. **Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective.** *Parasits vectors*. 2013; 6:153. doi:10.1186/1756-3305-6-153

SANGSTER, N.C., COWLING, A., WOODGATE, R.G. **Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research.** *Trends in Parasitology*. 2018; 34(7): 553-563. doi:10.1016/j.pt.2018.05.001.

SHALABY, H.A. **Anthelmintics Resistance; How to Overcome it?** *Iranian Journal of Parasitology*. 2013; 8(1): 18-32

SCHWARZ, E.M., KORHONEN, P.K., CAMPBELL, B.E. *et al.* **The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*.** *Genome biology*. 2013; 14 (8). doi:10.1186/gb-2013-14-8-r89

SILVA, R., VILAS-BOAS, V., CARMO, H. *et al.* **Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy.** *Pharmacology and therapeutics*. 2015; 1-123. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.013.

SON, D.S., LEE, E.S., ADUNYAH, S.E. **The Antitumor Potentials of Benzimidazole Anthelmintics as Repurposing Drugs.** *Immune network*. 2020; 20(4). doi:10.4110/in.2020.20.e29

- STAUD, F., PAVEK, P. **Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)**. The international journal of biochemistry and cell biology. 2005; 37(4), 720-725. doi:10.1016/j.biocel.2004.11.004
- TAK, I.R., DAR, S.A., DAR, J.S. *et al.* **A Brief Study of Morphology of *Haemonchus contortus* and its Hematophagous Behaviour**. Global veterinaria. 2014;13(6): 960-965. doi:10.5829/idosi.gv.2014.13.06.9118
- TAMAN, A., AZAB, M. **Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets**. Parasitology Research. 2014; 113: 2425–2433. doi:10.1007/s00436-014-3969-7
- TAYLOR, M.A., HUNT, K.R., GOODYEAR, K.L. **Anthelmintic resistance detection methods**. Veterinary Parasitology. 2002; 103 (3): 183-194. doi:10.1016/S0304-4017(01)00604-5
- WANG, T., MA, G., ANG, C.S. *et al.* **Somatic proteome of *Haemonchus contortus***. International Journal for Parasitology. 2019; 49 (3-4): 311-320. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.12.003
- WILKENS, S., **Structure and mechanism of ABC transporters**. F1000Prime Rep. 2015; 7(14). doi: 10.12703/P7-14.
- YILMAZ, N.K., SCHIFFER, C.A. **Introduction: Drug Resistance**. Chem Rev. 2021; 121 (6): 3235-3237. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00118
- YIN, J., ZHANG, J. **Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application**. HHS Author Manuscripts. 2011; 36(10): 927–938. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.10.002.