

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**BIOTRANSFORMACE A TRANSPORT
XENOBIOTIK U HELMINTŮ**

Disertační práce

Mgr. Hana Bártíková

Vedoucí disertační práce:

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Poděkování

Největší dík patří mé školitelce **Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D.** za odborné vedení v průběhu mého doktorského studia, za cenné rady a podnětné návrhy při řešení výzkumných úkolů. Rovněž děkuji za milý a přátelský přístup.

Děkuji spolupracovníkům, zejména **Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D.** za pomoc při řešení projektu a všestrannou podporu plnou optimismu, dále kolegům **Mgr. Ivanovi Vokřálovi** a **Ing. Vladimíru Kubičkovi, CSc.** za provádění analytické části experimentů a **Prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc.** za zajišťování biologického materiálu.

Děkuji **pracovnímu kolektivu Katedry biochemických věd**, hlavně **paní Pakostové** a ostatním postgraduálním studentům za ochotu, všestranné rady a vytváření příjemné a přátelské atmosféry po celou dobu studia.

Za finanční podporu děkuji **Grantové agentuře České republiky a Univerzitě Karlově: GA ČR 524/07/0611; GA ČR P502/10/0217; SVV 265 004.**

Dík patří i **rodině a přátelům** za celkovou podporu v průběhu studia.

Prohlášení

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

Hana Bártíková

ABSTRAKT

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

Kandidát: Mgr. Hana BÁRTÍKOVÁ
Školitel: Doc. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Název disertační práce:

BIOTRANSFORMACE A TRANSPORT XENOBIOTIK U HELMINTŮ

Infekční nemoci způsobené parazitickými helminty představují závažný problém ohrožující zdraví domácích i volně žijících zvířat a ovlivňující zemědělský průmysl. Léčba helmintóz je založena na podání anthelmintik, z nichž jsou nejdůležitější benzimidazoly. Neracionální používání podobných anthelmintik však vedlo k závažnému problému - ke vzniku rezistence helmintů vůči těmto léčivům. K možným mechanismům vzniku rezistence patří změny ve farmakokinetických procesech (změny v transportu léčiva a zvýšená deaktivace léčiv), ke kterým může přispívat zvýšená aktivita biotransformačních enzymů a transportérů u helmintů. Poznání mechanismů rezistence a obranných strategií parazitů vůči léčivům je nezbytné pro zachování účinnosti současných anthelmintik a vývoj nových přístupů ke kontrole helmintóz.

Ačkoli biotransformační enzymy a transportéry helmintů slouží jako obrana před negativním působením xenobiotik, doposud byly poměrně málo studovány. V mé disertační práci jsem se proto v rámci studia obranných strategií helmintů věnovala biotransformačním enzymům, přeměně a transportu vybraných anthelmintických léčiv u zástupců nejdůležitějších skupin parazitických helmintů. Z třídy motolic byla testována motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*), ze skupiny hlístic jsme se zabývali vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*) a tasemnicí potkaní (*Hymenolepis diminuta*) sloužila jako modelový organismus pro studium tasemnic.

K dosažení stanovených cílů jsme prováděli *in vitro* (subcelulární frakce z homogenátu těl parazitů) a *ex vivo* (živí paraziti kultivovaní s živným médiem) experimenty. Aktivity redukčních enzymů, které u parazitů hrají důležitou roli, byly

stanoveny pomocí modelových substrátů. K anthelmintickým léčivům, která jsou u helmintů metabolizována cestou redukce, patří mebendazol (MBZ) a flubendazol (FLU). Ačkoli oxidační enzymy nebyly u helmintů považovány za důležité, získané výsledky potvrzují existenci metabolismu léčiv cestou oxidace i u těchto organismů. Z testovaných anthelmintik podléhá oxidaci albendazol (ABZ), a to u *D. dendriticum* a *H. contortus*, nikoli však u *H. diminuta*. Na biotransformaci anthelmintik se mohou podílet i enzymy, které hrají roli především v obraně parazitů před oxidačním stresem způsobeným některými léčivy či imunitním systémem hostitele. Z této skupiny enzymů byla u všech třech parazitů nalezena aktivita superoxiddismutasy, katalasy a peroxidasy. Schopnost methylace (*D. dendriticum*, *H. diminuta*) a konjugace s glukózou (*H. contortus*) přináší první důkazy o tom, že i helminti využívají konjugaci léčiv s endogenními substráty k jejich deaktivaci. Srovnání citlivých a rezistentních kmenů *H. contortus* odhalilo větší tvorbu metabolitů léčiva FLU u rezistentních jedinců. To naznačuje, že zvýšená aktivita biotransformačních enzymů se u tohoto parazita může podílet na vzniku rezistence. Transportní studie potvrdily důležitost pasivní difúze při transportu léčiv do těla i z těla parazitů a v případě *D. dendriticum* poukázaly rovněž na účast aktivního transportu ABZ a jeho sulfoxidu.

Získané výsledky přispěly k poznání obranných strategií helmintů a dokazují, že všichni testovaní parazité mají schopnost aktivně přeměňovat strukturu anthelmintik a dalších xenobiotik. Tyto způsoby ochrany před toxickým působením cizorodých látek mohou přispívat ke vzniku rezistence parazitů. Znalost biotransformace a transportu léčiv u helmintů tedy může vést ke zlepšení farmakoterapie helmintóz.

ABSTRACT

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

Candidate: Mgr. Hana BÁRTÍKOVÁ
Supervisor: Doc. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

BIOTRANSFORMATION AND TRANSPORT OF XENOBIOTICS IN HELMINTHS

Infectious diseases caused by parasitic helminths are a major problem threatening health of domestic and wild animals and affecting agricultural industry worldwide. Treatment of helminthoses is based on administration of anthelmintic drugs, with benzimidazoles being the most important group. Unfortunately, the irrational use of similar anthelmintics has led to the development of drug resistance in helminths, thus causing a serious problem in the veterinary practice. Possible mechanisms of drug resistance development include changes of pharmacokinetic processes (changes in drug transport or increased drug deactivation), which are based on an increased activity of biotransformation enzymes and transporters in helminths. Understanding the mechanisms of drug resistance and defence strategies of parasites against drugs can prolong the efficacy of current anthelmintics and help to find new strategies for the control of helminthoses.

Although drug metabolizing enzymes and transporters of helminths serve as an efficient defence against the negative action of xenobiotics, they have been relatively little investigated so far. Therefore, the aim of my doctoral thesis was to study the defence strategies of helminths, namely biotransformation enzymes, metabolic fate and transport of selected anthelmintic drugs, in the representatives of the main groups of parasitic helminths. From the class of flukes, we tested *Dicrocoelium dendriticum*. *Haemonchus contortus* was studied as a representative of group Nematoda and *Hymenolepis diminuta* served as a model organism of tapeworms.

To achieve our goals, we performed *in vitro* (subcellular fractions of homogenate from parasites' bodies) and *ex vivo* (living parasites cultivated with medium) experiments.

Activities of reduction enzymes, which play important role in parasites, were assayed towards model substrates. Anthelmintic drugs metabolized via carbonyl reduction in all examined species are represented by mebendazole (MBZ) and flubendazole (FLU). Although drug oxidation enzymes have not been considered to be important in helminths, obtained results in our experiments have confirmed the existence of an oxidative drug metabolism in these organisms. From the anthelmintics tested, albendazole (ABZ) undergoes sulphoxidation in *D. dendriticum* and *H. contortus*, but not in *H. diminuta*. Some helminths' oxidation enzymes, which play the significant role in defence against oxidative stress induced by redox-cycling drugs or host immune system, may contribute to the biotransformation of the drugs. From these enzymes, superoxide dismutase, catalase and peroxidase showed activity in all parasites. The ability to form methyl derivatives (*D. dendriticum*, *H. diminuta*) and glucose conjugates (*H. contortus*) have brought the first evidence that even helminths conjugate drugs with endogenous substrate in order to deactivate them. Comparison of sensitive and resistant isolates of *H. contortus* revealed higher formation of FLU metabolites in resistant individuals. It suggests that higher activity of biotransformation enzymes can contribute to the drug resistance development in this helminth species. Transport studies have confirmed a key role of passive diffusion in the transport of drugs in helminths. In the case of *D. dendriticum* the results indicated also the participation of active transport of ABZ and its sulphoxide.

The obtained results expand the knowledge of defence strategies in helminths and prove that all tested helminths are able to effectively transform the structure of the drugs and other xenobiotics. By this way, parasites may be protected against toxic effects of drugs and it can contribute to the drug resistance in parasites. Therefore, the knowledge of drug biotransformation and transport in parasitic helminths may improve the pharmacotherapy of helminthoses in target species.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ PARAZITY	2
2.2 PŮVODCI PARAZITICKÝCH ONEMOCNĚNÍ ZE SKUPINY HELMINTŮ	3
2.2.1 Nematoda	4
2.2.2 Trematoda	8
2.2.3 Cestoda	12
2.3 VZTAH HOSTITEL – PARAZIT	14
2.3.1 Interakce na úrovni imunity	15
2.3.2 Negativní důsledky imunomodulace	16
2.3.3 Přínosy imunomodulace	16
2.4 LÉČBA HELMINTÓZ	17
2.4.1 Anthelmintika	17
2.4.2 Nefarmakologické způsoby léčby	21
2.5 REZISTENCE VŮČI ANTHELMINTIKŮM	23
2.5.1 Mechanismus vzniku rezistence	24
2.6 OBRANNÉ MECHANISMY PARAZITŮ VŮČI ANTHELMINTIKŮM	26
2.6.1 Biotransformace xenobiotik	26
2.6.2 Biotransformační enzymy parazita	27
2.6.3 Transport xenobiotik	37
2.6.4 Transportní proteiny helmintů	37
3 CÍLE PRÁCE	40
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	41
4.1 DICROCOELIUM DENDRITICUM	41
4.1.1 Identifikace metabolitů benzimidazolových anthelmintik	41
4.1.2 Oxidativní metabolismus xenobiotik a jeho ovlivnění působením albendazolu a albendazolsulfoxidu	43
4.1.3 Transport albendazolu a albendazolsulfoxidu	46
4.2 HAEMONCHUS CONTORTUS	48
4.2.1 Účinek flubendazolu a jeho metabolitů na vývoj larev	48

4.2.2	Aktivita biotransformačních enzymů a metabolismus flubendazolu u citlivých a rezistentních kmenů	50
4.2.3	Transport flubendazolu u citlivých a rezistentních kmenů	52
4.3	HYMNOLEPIS DIMINUTA	55
4.3.1	Aktivita biotransformačních enzymů a metabolismus benzimidazolových anthelmintik	55
5	ZÁVĚR	58
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
7	PŘÍLOHY	70
7.1	PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE	70
7.1.1	Publikace I	72
7.1.2	Publikace II	79
7.1.3	Publikace III	89
7.1.4	Publikace IV	97
7.1.5	Publikace V	102
7.1.6	Publikace VI	133
7.1.7	Publikace VII	141
7.2	OSTATNÍ PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH	152
7.3	ABSTRAKTA Z KONFERENCÍ	152
7.4	SEZNAM ZKRATEK	154

1 ÚVOD

Parazitózy vyvolané mnohobuněčnými parazity neboli helminty představují závažný zdravotní problém zejména v zemích třetího světa, kde postihující značnou část populace. Helminti nepoškozují pouze zdraví lidí, ale mají ohromný dopad i na hospodářská a volně žijící zvířata. Infekce vyvolané helminty jsou považovány za nejdůležitější onemocnění hospodářských zvířat nejen v rozvojových, ale i vyspělých zemích. Helminti zodpovídají za poruchy zdraví zvířat, které mají za následek sníženou produktivitu zvířat nebo mohou dokonce vést až k rozsáhlým úhynům stád. Důsledkem jsou výrazné ekonomické ztráty, jež v rozvojových zemích dále prohlubují chudobu.

Eliminaci parazitóz je tedy ve veterinární praxi věnována značná pozornost. Zatím stále nejefektivnějším způsobem kontroly a léčby parazitóz je použití léčiv s anthelmintickým účinkem. Jejich časté a nesprávné podání však vedlo k vývoji lékové rezistence parazitů a k selekci parazitárních kmenů neodpovídajících na léčbu hlavními skupinami anthelmintik. Tato skutečnost výrazně komplikuje léčbu parazitóz.

Mechanismy vzniku rezistence obecně zahrnují řadu procesů, z nichž některé se podařilo objasnit, ale další zůstávají stále nejasné. Důležitými pochody uplatňujícími se při vzniku rezistence je změna cílové struktury, snížený příjem nebo urychlený eflux léčiv, zvýšené odbourávání léčiva. Před několika lety bylo poukázáno na souvislost lékové rezistence s biotransformačními enzymy a transportéry parazitů. Tyto struktury zodpovídají za zvýšenou metabolizaci a pozměněný transport léčiv, a tím ochraňují helminty před negativním působením anthelmintik a dalších xenobiotik.

Znalost mechanismů rezistence je nezbytná pro zachování účinnosti stávajících anthelmintik a pro vývoj nových léčiv a alternativních léčebných postupů. Ačkoli byly u různých helmintů popsány některé biotransformační enzymy a transportéry, nebyla problematice biotransformace a transportu xenobiotik u helmintů věnována velká pozornost. Náplní této disertační práce je proto rozšířit dosavadní poznatky a přinést nové informace o obranných strategiích helmintů, jimiž se brání účinkům cizorodých látek a které mohou přispívat ke vzniku rezistence. Cílem prováděných experimentů bylo stanovit specifické aktivity biotransformačních enzymů, zhodnotit biotransformaci vybraných anthelmintik a jejich transport u zástupců nejvýznamnějších skupin parazitických helmintů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Onemocnění vyvolaná parazity

Parazitózy jsou onemocnění způsobená jednobuněčnými organismy ze skupiny prvoků (Protozoa) a mnohobuněčnými helminty neboli parazitickými červy, patřícími do kmenů ploštěnci (Platyhelminthes), hlístice (Nematoda) a vrtejši (Acanthocephala) (Volf a Horák, 2007). Parazitické infekce představují hlavní příčinu onemocnění a úmrtí lidí ve většině zemí tropického a subtropického regionu. Ročně zemře v důsledku parazitického onemocnění několik milionů obyvatel (Paris et al. 2007).

Parazitózy vyvolané helminty se označují speciálním termínem helmintózy. Jejich světové rozšíření potvrzuje i odhad Světové zdravotnické organizace (WHO), podle které je jedna osoba ze čtyř nositelem alespoň jednoho parazitického červa (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index.html). Celkový počet zasažených lidí se pohybuje okolo dvou miliard. Infekce helminty je příčinou výrazné nemocnosti a úmrtí u člověka. Těžké infekce mají za následek řadu zdravotních problémů zahrnujících poruchy růstu, psychických funkcí, anémii, alergické reakce, potlačení imunitního systému, deficit vitamínu A a podvýživu. Například vysilující onemocnění vyvolané druhy *Schistosoma mansoni* či *Echinococcus granulosus* může být smrtelné a infekce měchovci (*Ancylostoma duodenale* a *Necator americanus*) zpomaluje růst dětí a může narušit jejich kognitivní funkce (Johnston et al. 2008; Harris, 2011). Helmintózy jsou rovněž podezřelé ze změny citlivosti hostitele k malárii, HIV, tuberkulóze a ze snížení úspěšnosti očkovacích programů, např. proti tuberkulóze, která stále patří ke třem nejvíce devastujícím chorobám (Hotez et al. 2006).

Jako měřítko pro zhodnocení dopadů onemocnění na kvalitu života může sloužit jednotka DALY („disability-adjusted life years“), která se rovná ztrátě jednoho zdravého roku života. Označuje rizika, která mohou smrtí ovlivnit délku života, nebo rizika, která jsou příčinou kratší nebo delší nemoci, kdy lidé zůstávají na živu, ale nejsou plně zdraví. Nedávné odhady tvrdí, že hodnota DALY pro helmintózy (39 miliónů) je vyšší než pro malárii a tuberkulózu. V důsledku výrazných poruch zdraví vedou helmintózy k velkým socioekonomickým ztrátám (Harris, 2011).

Helmintózy nepoškozují pouze zdraví lidí, ale výrazně ovlivňují i hospodářská a volně žijící zvířata. Právě na oblast helmintů významných ve veterinární praxi jsme se

soustředili v rámci našeho výzkumu. K nejpočetnějším a ekonomicky nejdůležitějším hospodářským zvířatům s celosvětovým rozšířením se řadí ovce, kozy a skot. Celkový odhad počtu hospodářských zvířat (1,33 miliardy kusů hovězího dobytka a 1,04 miliardy ovcí) názorně ukazuje důležitost těchto živočišných druhů pro světovou ekonomiku. Úmrtí a snížená produkce zvířat v důsledku helmintóz mají tudíž za následek výrazné ekonomické dopady. Parazitické infekce ovlivňují příjem krmiva, jeho trávení a další procesy, které se mohou projevit mnoha způsoby. Zahrnují předčasnou smrt, nižší živou váhu zvířete, menší výtěžek a kvalitu produktů jako je maso, mléko a vlna, redukovanou plodnost a tažnou kapacitu zvířat, která zároveň vede ke sníženým výnosům zemědělských plodin. Do ekonomických ztrát se počítají i náklady na léčbu helmintóz a přidružených infekcí (Perry a Randolph, 1999; Piedrafita et al. 2010). Například fasciolóza, jedna z nejdůležitějších infekcí pasoucích se zvířat způsobená motolicí *Fasciola hepatica*, každoročně vede ke škodám v hodnotě přes dvě miliardy USD (Ai et al. 2011). Ve stejné výši se pohybuje odhad ztrát v souvislosti s infekcí vyvolanou druhem *Echinococcus granulosus* (Budke et al. 2006). V rozvojových zemích, kde hospodářská zvířata často představují pro malé farmáře jediný zdroj obživy, jsou ztráty vyvolané helmintózami hlavním faktorem prohlubujícím chudobu místních obyvatel. Ve vyspělých státech helmintózy ohrožují produkci potravin (Piedrafita et al. 2010).

2.2 Původci parazitických onemocnění ze skupiny helmintů

Helminti, stejně jako ostatní paraziti, jsou organismy získávající živiny z jednoho či několika dalších organismů, kterým škodí, ale nemusí je zabít. Jedná se o vztah mezi jedinci, kdy jeden z partnerů má ze soužití prospěch a druhý škodu.

Termín helminti označuje velmi různorodou skupinu mnohobuněčných živočichů. Zahrnuje nepříbuzné organismy, které se ale pro praktické účely některých vědních disciplín sdružují dohromady. Mezi helminty se tradičně řadí kmen Nematoda (hlístice), Acantocephala (vrtejši) a zástupci kmene Platyhelminthes (ploštěnci), tj. třídy Trematoda, Cestoda, Monogenea. Přehled organismů patřících k helmintům uvádí Tab. 1. Pro člověka a hospodářská zvířata jsou z kmene platyhelmintů významné pouze třídy Cestoda a Trematoda. Zástupci třídy Monogenea parazitují především na rybách a způsobují významné ztráty v chovech ryb. Acanthocephala se vyskytují u savců, ryb a ptáků (Northrop-Clewes a Shaw, 2000; Volf a Horák, 2007).

Z hlediska ontogenetického vývoje jsou helminti velmi variabilní. Kromě dospělců a vajíček mohou mít i poměrně velký počet morfologicky odlišných larválních stádií, která ke svému vývoji využívají i několik typů hostitelů. Organismus, v němž dochází k pohlavnímu dospívání a sexuální reprodukci, se označuje jako definitivní hostitel. K larválnímu vývoji helmintů dochází v tzv. mezihostiteli. Na základě počtu hostitelů se rozlišuje několik vývojových cyklů. Kromě přímého cyklu s jedním, definitivním hostitelem (např. roup *Enterobius vermicularis*) existují dvouhostitelské (př. motolice *Schistosoma spp.*, tasemnice *Taenia spp.*), tříhostitelské (př. motolice rodu *Paragonimus* či tasemnice rodu *Diphyllobothrium*) a zřídka i čtyřhostitelské cykly se třemi mezihostiteli (Volf a Horák, 2007).

Tab. 1: Stručný přehled klasifikace parazitických helmintů. V závorkách jsou uvedeny názvy důležitých druhů, které infikují člověka a hospodářská zvířata.

Kmen: Platyhelminthes
Třída Trematoda (<i>Fasciola, Schistosoma, Dicrocoelium, Paraphistomum, Fasciolopsis</i>)
Třída Cestoda (<i>Taenia, Echinococcus, Diphylobothrium, Moniezia, Hymenolepis</i>)
Třída Monogenea (paraziti ryb)
Kmen: Nematoda
Řád Enoplida (<i>Trichinella, Trichuris</i>)
Řád Rhabditida (<i>Strongyloides</i>)
Řád Tylenchida (paraziti rostlin)
Řád Strongylida (<i>Necator, Ancylostoma, Haemonchus Oesophagostomum, Trichostrongylus,</i>)
Řád Oxyurida (<i>Enterobius</i>)
Řád Ascaridida (<i>Ascaris, Toxocara</i>)
Řád Spirurida (<i>Onchocerca, Dracunculus, Thelazia, Gongylonema, Wuchereria, Loa</i>)
Kmen: Acantocephala

V naší práci jsme se zabývali zástupci z kmene Nematoda a ze tříd Trematoda a Cestoda, významnými pro hospodářská a volně žijící zvířata.

2.2.1 Nematoda

Nematoda neboli hlístice jsou jednou z nejrozšířenějších, nejpočetnějších a nejrozmanitějších skupin živočichů. Doposud je popsáno téměř 20 000 druhů parazitujících v obratlovcích. Mnoho dalších žije volným způsobem života (v půdě, sladké i mořské vodě) či parazituje v bezobratlých a v rostlinách. Jsou nejčastější

příčinou nákazy u člověka, u hospodářských zvířat zodpovídají za výrazné ztráty v důsledku snížené produkce, neprospívání a smrti zvířat. Parazitující nematoda se dle lokalizace rozdělují na intestinální a extraintestinální. Dospělci žijící v obratlovcích jsou lokalizováni nejčastěji v trávicím traktu, ale i dalších soustavách – krevním a lymfatickém oběhu, nervové soustavě, urogenitálním traktu, dýchací soustavě, kůži (Campbell et al. 2011; Volf a Horák, 2007). Hlístice byly nalezeny od Antarktidy po tropy.

Ve struktuře těla vykazují nematoda konzervatismus. Tělo má kruhový průřez, bývá protáhlé, většinou nitřovitého či válcovitého tvaru. Velikost nematod je různorodá, od 250 μm po jedince dosahující délky až 9 metrů (*Placentonema gigantissima* ve vorvaních). Tělo se skládá ze dvou koncentrických trubic. Vnější je tvořena kutikulou, dále hypodermis, jejíž buňky produkují kutikulu, a longitudinální svalovinou. Kutikula je struktura s opornou funkcí, umožňuje pohyb, tvoří ochrannou bariéru, přes níž probíhá výměna látek s prostředím a která se účastní interakcí s hostitelem. Vnitřní trubice zahrnuje střeva. Prostor mezi oběma trubicemi se nazývá pseudocoelom. Je vyplněn tekutinou, jejíž tlak udržuje tělní turgor a funguje jako hydrostatický skelet. Tím, že působí jako síla proti kontrakci podélných svalů, umožňuje pohyb bez potřeby antagonistické příčné svaloviny. Na rozdíl od platyhelmintů mají nematoda trávicí trubici jak s ústním, tak s análním otvorem. U některých druhů tvoří ústní dutina mohutnou kapsulu, na jejímž dně se mohou nacházet zuby nebo lišty, kterými nematoda narušují tkáň hostitele. U parazitů rostlin je ústní dutina přeměna v bodcovou strukturu, tzv. stylet, sloužící k penetraci buněčné stěny hostitele (Matthews, 1998).

Hlístice jsou odděleného pohlaví, častý je i pohlavní dimorfismus, kdy samička dorůstá větších rozměrů. Vajíčka jsou různorodá co do tvaru i velikosti, většinou oválná či kulovitá s různě strukturovaným povrchem. Vývoj dospělců probíhá přes čtyři larvální stadia (L1 – L4), která jsou oddělena svlékáním staré a nové kutikuly. Vývoj může být buď přímý - monoxenní bez mezihostitele (geohelminți), nebo nepřímý - heteroxenní, který zahrnuje mezihostitele (biohelminți). K přenosu monoxenních hlístic dochází perorální cestou pozřením infekční larvy nebo perkutánně, kdy larva proniká kůži hostitele a migruje jeho tělem do místa definitivní lokalizace (např. měchovci rodu *Ancylostoma*). Někdy larvy prodělávají dlouhou a složitou migraci vnitřními orgány hostitele (např. škrkavky). V případě některých hlístic může docházet i k autoinfekci hostitele (např. *Strongyloides stercoralis*). U heteroxenních hlístic dochází v mezihostiteli k vývoji parazita až po časnou L3 larvu, která je infekční pro

definitivního hostitele. Jako mezihostitelé slouží většinou bezobratlí živočichové. K přenosu dochází nejčastěji perorální cestou pozřením infikovaného mezihostitele. Ale např. u filárií dochází k průniku infekčních stadií do obratlovce při sání vektora (krevsající členovec) (Volf a Horák, 2007).

2.2.1.1 Zástupci nematod významní pro hospodářská zvířata

Hlavními nematody ohrožujícími produkci hospodářských zvířat jsou *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus spp.*, *Cooperia spp.*, *Thelazia gulosa*, *Oesophagostomum spp.*, *Chabertia ovina*, *Protostrongylus rufescens* a *Gongylonema pulchrum* (Miller a Horohov, 2006; Sargison, 2011; Volf a Horák, 2007). Gastrointestinální nematodózy patří k nejvíce destruktivním onemocněním malých přežvýkavců s vysokou prevalencí. Akutní infekce vedou ke smrti zvířat, častější je chronická forma vedoucí ke snížené produktivitě zvířat (Angulo-Cubillán et al. 2007).

Ze skupiny nematod jsme se v experimentální práci věnovali druhu *Haemonchus contortus* (vlasovka slézová), který patří k nejvíce patogenním nematodům a zodpovídá za velké ekonomické ztráty. Parazituje u přežvýkavců, hlavně ovcí, skotu a koz. Dospělci žijí ve slézu (žaludku přežvýkavců), kde se živí krví. *Haemonchus* je rozšířen ve všech geografických oblastech, od tropického pásu po studené, horské regiony (Angulo-Cubillán et al. 2007). Navzdory širokému rozsahu životních podmínek se více nachází v teplých a vlhkých regionech než v studených a suchých (Miller a Horohov 2006).

Samičky jsou delší (18-30 mm) než samečci (10-20 mm). Ústní kapsula se vyznačuje zubem, pomocí něhož vlasovky narušují cévy. Přijatá krev dává helmintům červené zbarvení. Samičky jsou dvoubarevné v důsledku bílých vaječníků stočených kolem rudého střeva. Životní cyklus je přímý, bez mezihostitele (Angulo-Cubillán et al. 2007). Dospělá samice klade ve slézu přežvýkavců denně kolem 5000 vajíček, která pronikají s výkaly na pastvu (Le Jambre, 1995). Ve vnějším prostředí probíhá 6-7 dní vývoj do stadia infekční L3 larvy. Přežvýkavci se infikují na pastvě pozřením trávy s larvami. L3 larvy migrují přes bachor do slézu, kde se živí mukózou a svlékají se na L4 larvy. Nepříznivé podmínky může L4 larva přežít v hypobióze, což je stav, kdy larva snižuje svůj metabolismus a zastavuje vývoj. Jakmile vývoj pokračuje, L4 larvy

dosahují závěrečným svlékáním dospělosti. Samice opět kladou vajíčka a celý cyklus se opakuje.

Závažnost hemonchózy vyplývá z poškození slézu a ze ztrát krve. Dospělci a L4 larvy denně přijímají až 0,05 ml krve, čímž způsobují významné ztráty krve. Důsledkem jsou anémie s redukovanými hodnotami hemoglobinu a plazmatických proteinů. Počet eozinofilů v periferní krvi je zvýšený. Objevují se bledé mukózní membrány, dásně a spojivky, častým projevem jsou edémy v tělních dutinách. Ovce ztrácí vytrvalost, typická je letargie a nekoordinovanost. Značně se snižují váhové přírůstky, kvalita vlny a reprodukční schopnosti. Závažné infekce vedou ke smrti zvířat (Angulo-Cubillán et al. 2007; Miller a Horohov 2006).



Obr. 1: *Haemonchus contortus* (vlasovka slézová). Foto I. Vokřál.

Podobně se projevují i onemocnění vyvolané druhem *Teladorsagia circumcincta*, žijícím ve slézu, a druhy *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus spp.* a *Cooperia spp.*, parazitujícími v tenkém střevě skotu a jiných přežvýkavců. Silné infekce způsobují záněty slézu či střeva, těžké trávicí poruchy, průjmy, dehydrataci a anemické stavy až úhyny zvířat (McNeilly et al. 2009; Stear et al. 2003; Brundson 1967, Li et al. 2009)

Thelazia gulosa způsobuje oční infekce převážně u hovězího dobytka. Žije na povrchu rohovky, ve spojivkovém vaku a slzných žlázách. Samičky produkují larvy, kterými se nakazí mouchy konzumující u hostitele sekrety slzných žláz. V těle mouchy prochází parazit dvěma svlékáními. Infekční L3 larvy se uvolňují do spojivkového vaku hostitele při opětovném sání much a v periorbitálním prostoru dospívají. Dospělá i larvální stadia způsobují zánět spojivek, slzných váček a keratitidu (Naem 2007).

Druhy rodu *Oesophagostomum* jsou parazity tlustého střeva prasat a hovězího dobytka. Vajíčka se ve výkalech vyvíjí v larvu L3, která je na pastvě pro hostitele zdrojem nákazy. V tlustém střevě se zavrtávají do sliznice střevní stěny a způsobují léze. V submukóze se vyvíjí larvy L4 a vyvolávají imunitní odpověď, která má za následek zapouzdření larvy v nodulárních lézích tvořených shluky neutrofilů a eozinofilů. Objevují se lokální záněty, krvácení a edémy s tvorbou granulomů, vedoucí k přítomnosti charakteristických nodulů a centrální nekróze. U zvířat dochází k poruchám trávení, průjmům, popř. úhynům (Gasser et al. 2007).

Chabertia ovina se vyskytuje u domácích i divokých sudokopytníků. Projevy infekce jsou podobné jako u rodu *Oesophagostomum*. Poškozuje povrch střev a způsobuje těžké průjmy a nekrózy sliznice.

Protostrongylus rufescens parazituje v bronchách ovcí a koz. Samičky kladou vajíčka, z nichž se v plicích líhnou larvy a přes ústní dutinu a trávicí trakt se dostávají do vnějšího prostředí, kde infikují mezihostitele (plži). Infekce vede k těžkým zánětům plic.

Gongylonema pulchrum je běžným cizopasníkem přežvýkavců, ale i koní a prasat. Dospělci se nacházejí ve sliznici dutiny ústní, jazyka a jícnu, zřídka i bachoru. L3 larva se vyvíjí v mezihostitelských broucích a švábech. Tito helminti působí záněty sliznic spojené s poruchami příjmu potravy (Volf a Horák, 2007).

2.2.2 Trematoda

Trematoda neboli motolice zahrnují početnou skupinu živočichů (asi 8000 známých druhů), výhradně parazitů obratlovců se složitými vývojovými cykly. Některé druhy vyvolávají závažné onemocnění hostitelů. Parazitují hlavně v trávicím systému, ale i v dýchacích cestách, krevním řečišti, nervové soustavě, urogenitálním traktu a tělních dutinách.

Trematoda se liší svou velikostí, která se pohybuje od jednoho milimetru do několika centimetrů. Největší lidský parazit *Fasciolopsis buski* měří 75 mm, zatímco nejmenší je *Heterophyes heterophyes* s méně než 3 mm na délku. Tělo je nesegmentované, zploštělé, oválného tvaru s orální a ventrální přísavkou. Přísavky vykonávají hlavně přichycovací funkci. U některých zástupců může jedna či obě přísavky chybět či jsou nahrazeny jinými strukturami.

Povrch těla je pokryt tegumentem neboli kutikulou. Z tegumentu často vystupují ostny či hroty. Tegument hraje důležitou roli v absorpci živin a slouží k exkreci hlenu a metabolitů (Ichhpujani a Bhatia, 2002; Volf a Horák, 2007). Zajišťuje rovněž ochranu před imunitním systémem hostitele a do určité míry před působením léčiv (McConville et al. 2009). Skládá se ze dvou vrstev - bezjaderného syncytia na povrchu a hlouběji uložené jaderné vrstvy - spojených cytoplazmatickými výběžky. Syncytium je ohraničené apikální a bazální plazmatickou membránou, která se vchlipuje dovnitř syncytia. Tyto výběžky jsou obklopeny početnými mitochondriemi. Další výraznou strukturou v syncytiu jsou sekreční tělíska. Bazální plazmatická membrána leží na tzv. lamina basalis, pod níž se nachází cirkulární a longitudinální svalovina a tegumentální buňky, jejichž cytoplazmatické výběžky prostupují laminou basalis. Tegumentální buňky, jejichž hlavní úlohou je sekrece proteinů, obsahují kromě jadra drsné endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a sekreční granule produkující sekreční tělíska (Chowdhury a Tada, 2001). Trávicí soustava slouží k aktivnímu příjmu a zpracování potravy. Začíná ústním otvorem, který je zároveň i otvorem vyvrhovacím. Střevo je jednoduché, či se větví. Část živin přijímají motolice povrchem těla.

Motolice jsou většinou hermafroditi se samčími a samičími orgány v jednom jedinci. Výjimku tvoří rod *Schistosoma*. U většiny trematod jsou vývojové cykly složité, zahrnující dva nebo víc mezihostitelů. Nepohlavním rozmnožováním vznikají larvální stadia, která infikují následné hostitele (Volf a Horák, 2007). Dospělí červi uvolňují vajíčka, která mohou mít různý tvar, často jsou oválná s víčkem. Z vajíčka se líhne pohyblivá larva označovaná jako miracidium. Miracidium se dostává do mezihostitele (ve většině případů měkkýši), v němž se vyvíjí v primární sporocystu. Následuje další larvální stadium – sekundární sporocysty či redie. Výsledkem asexuálního rozmnožování jsou cercárie, které infikují již definitivního hostitele či dalšího mezihostitele. Z jednoho miracidia se vyvine až několik tisíc cercárií, a dochází tak k velkému namnožení parazita (Ichhpujani a Bhatia, 2002).

2.2.2.1 Zástupci trematod významní pro hospodářská zvířata

K významným motolicím ohrožujícím produkci hospodářských zvířat patří *Dicrocoelium dendriticum*, *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Paraphistomum cervi* a *Eurytrema pancreaticum*.

Ze skupiny nematod jsme se v experimentální práci věnovali druhu *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá). Jedná se o běžného parazita hlavně domácích i divokých přežvýkavců, u nichž vede ke snížení produkce. Motolice kopinatá žije ve žlučovodech a žlučníku ovcí, koz, skotu, muflonů, srnců, buvolů a velbloudů. Navzdory výraznému rozšíření dikroceliózy je tato parazitóza podceňována.

Charakteristicky tvarované tělo dosahuje délky 8-14 mm a šířky 2-3 mm. Pouhým okem jsou vidět bílá vitelária (žlutkové žlázy, které produkují žlutkové buňky obklopující vaječné buňky) a černě zbarvená děloha. Oválná vajíčka obsahují miracidium. Životní cyklus je nepřímý a trvá zhruba 6 měsíců. Vyžaduje dva mezipostitele - suchozemského plže a mravence. Po pozření vajíčka plžem se vylíhne miracidium, které se přes stadium sporocyst vyvíjí v cercárie. Ty opouští plže a ve slizovém obalu čekají na pozření mravencem. V něm vznikají metacercárie, z nichž jedna či dvě migrují k podjícnovému gangliu mravence a ovládají jeho chování. Infikovaní jedinci vylézají na stébla trav, čímž zvyšují šanci pozření definitivním hostitelem. V něm migrují do žlučovodů, kde se vyvíjí v dospělce uvolňující vajíčka.

Klinické symptomy dikroceliózy se obvykle nemanifestují, u zvířat s těžkými infekcemi se objevuje anémie, edémy, vyhublost, žloutenka. Vyskytuje se cirhóza jater a poškození žlučovodů v důsledku mechanického poškození motolicemi. Ve vzácných případech může onemocnění skončit fatálně. Poškození jaterních funkcí vede k závažným ekonomickým ztrátám, zejména kvůli snížení přírůstků a produkce mléka a masa (Otranto a Traversa, 2002; 2003).



Obr. 2: *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá). Foto B. Szotáková.

Velice významným parazitem hospodářských zvířat je *Fasciola hepatica* neboli motolice jaterní. Tímto parazitem jsem se zabývala v průběhu mé zahraniční stáže. Motolice jaterní se vyskytuje v mírném klimatu celého světa, parazituje v játrech a

žlučovodech přežvýkavců i monogastričních savců. V posledních letech došlo k výraznému rozšíření fasciolózy v důsledku klimatických změn (zmírnění podnebí, větší vlhkost) a zvýšení pohybu stád. Celosvětově je nakaženo 300 milionů kusů dobytka a 250 milionů ovcí (Fairweather, 2005). Onemocnění zapříčiňuje velké ekonomické ztráty v důsledku zpomalení růstu, snížené produkce mléka a plodnosti zvířat (Keiser et al. 2007). Fasciolóza je rovněž rozšířenou zoonózou a představuje závažný zdravotní problém v mnoha zemích (jižní Amerika, Francie, Portugalsko, Egypt, Írán, Turecko, Vietnam). Odhady nakažených se pohybují od 2,4 do 17 miliónů lidí (Mas-Coma et al. 2005).

Životní cyklus zahrnuje mezihostitele, jimiž jsou plovatky žijící na podmáčených lokalitách. K nákaze dochází pozřením metacerkárií, které prodělávají v těle hostitele migraci přes střevo do jater a žlučovodů. Vývoj v definitivním hostiteli trvá až tři měsíce. V průběhu migrace se juvenilní jedinci živí jaterním parenchymem a krví, čímž vyvolávají destrukci jater, krvácení a obstrukci žlučovodů. Velký počet motolic způsobuje akutní fasciolózu, která může vést až ke smrti zvířat v důsledku rozsáhlé tkáňové destrukce, zvětšení jater a těžkého intrahepatálního a intraperitoneálního krvácení. U neakutní formy dochází k cirhóze a fibróze jater (Anderson a Fairweather, 1995).

Dalším parazitem jater a žlučovodů přežvýkavců je *Fascioloides magna*, dosahující délky 10 cm. V současnosti představuje velký problém pro chovy dančí zvěře. Již jedna motolice dokáže vážně poškodit játra. Napadená zvířata hubnou a při silnějších infekcích hynou.

Paraphistomum cervi je běžný parazit bacheru či jiných předžaludků přežvýkavců. Metacerkárie se po pozření hostitelem excystují a juvenilní jedinci se zdržují několik týdnů ve slézu a dvanáctníku, kde způsobují krvácení a nekrózy. Dospělé motolice se přesouvají do bacheru, kde vyvolávají lokální atrofii stěn. Časná fáze se projevuje průjmy, hubnutím až úhyny.

Eurytrema pancreaticum parazituje v pankreatickém vývodu přežvýkavců, popř. člověka. Vyskytuje se hlavně v Asii. Vývoj zahrnuje dva mezihostitele, suchozemské plže a rovnokřídly hmyz. Parazit způsobuje chronický zánět slinivky, manifestující se ztrátou hmotnosti a anémií v důsledku poruch trávení (Volf a Horák, 2007).

2.2.3 Cestoda

Třídu Cestoda, též označovanou jako tasemnice, tvoří asi 5000 známých druhů. Parazitují u všech skupin obratlovců, z převážné většiny u ryb a paryb. Až na výjimky mají vícehostitelské životní cykly. Dospělci se nacházejí v trávicí soustavě obratlovců. Patogenními agens jsou nejen ve stadiu dospělců, ale u některých druhů ve stadiu larev napadajících hostitele (Volf a Horák, 2007).

Segmentované tělo je zploštělé a dosahuje různé délky. Například zatímco *Hymenolepis nana* měří 1-4 cm, *Diphyllobotrium latum* je dlouhý až 15 m. Tělo se skládá z hlavičky (skolex), krku a vlastního těla (strobila). Na skolexu jsou umístěny přichycovací orgány – rýhy, kruhové přísavky či chobotek s háčky. Strobila je tvořena z různého počtu segmentů neboli proglotid. Pro srovnání, *Echinococcus granulosus* má 3-4 segmenty, *Diphyllobotrium latum* kolem 4000. Přítomny jsou tři typy segmentů: nezralé s nevyvinutými reprodukčními orgány; zralé s již vyvinutými reprodukčními orgány; třetím typem jsou články naplněné vajíčky s atrofovanými ostatními strukturami. Povrch těla je kryt tegumentem, jehož stavba je obdobná jako u motolic. Typickým znakem je přítomnost mikrotrichů vybíhajících z tegumentu a zvětšujících plochu absorpce. Tasemnice nemají vyvinuté střevo, živiny jsou přijímány od hostitele absorpcí přes tegument.

Tasemnice jsou až na výjimky hermafroditi, v každém článku se tedy nachází samčí i samičí reprodukční soustava. K oplození dochází buď mezi dvěma tasemnicemi nebo mezi dvěma články na stejné strobile. Tasemnice mají obvykle dva hostitele, existují i zástupci s tříhostitelskými cykly (rod *Diphyllobotrium*). Rod *Hymenolepis* může využívat jediného hostitele. Vajíčka, v nichž se vytváří první larva (onkosféra či lykofóra), se dostávají do vnějšího prostředí. V mezihostitelích se tvoří larvy druhého (popř. třetího) stadia, které mají dle morfologie různé názvy (např. cysticerkoid, plerocerkoid, cysticerkus, hydatida). Přenos infekce mezi hostiteli probíhá hlavně perorálně. Medicínsky významné tasemnice mohou být rozděleny na intestinální cestoda a tkáňová cestoda či larvální formy. Extraintestinální infekce jsou mnohem závažnější, obzvláště pokud se larvy vyskytují v mozku (Fernando et al. 2001).

2.2.3.1 Zástupci cestod významní pro hospodářská zvířata

Z třídy cestod jsme se experimentálně zabývali druhem *Hymenolepis diminuta*. Ačkoli tato tasemnice nepředstavuje z veterinárního ani lékařského hlediska závažnou

hrozbou, má význam jako laboratorní model pro studium fyziologie, biochemie a imunologie tasemnic a pro zhodnocení účinků léčiv (Muller et al. 2002).

Jedná se o celosvětově rozšířeného parazita krysy, potkanů a zřídka i člověka. Prevalence hymenolepiázy je vyšší v tropických a subtropických oblastech, jako je Thajsko, Malajsie, Indie. Několik případů bylo zaznamenáno i v Itálii, Španělsku a USA. Infekce je obvykle asymptomatická, mohou se vyskytnout gastrointestinální obtíže, podráždění, svědění a eozinofilie (Marangi et al. 2003, Tena et al. 1998, Wiwanitkit 2004).

Hymenolepis diminuta dosahuje délky 30-60 cm. Vajíčka se dostávají z těla hostitele a musí být pozřena mezihostitelem (nejčastěji brouci rodu *Tenebrio* či *Tribolium*). Definitivní hostitel se nakazí pozřením infikovaného hmyzu. Tasemnice ve střevě dospívá za 18-20 dní (Muller et al. 2002). Výrazně se uplatňuje tzv. „crowding“ efekt, což znamená, že se zvyšujícím počtem tasemnic ve střevě dochází k inhibici jejich růstu v důsledku kompetice o živiny a produkce látek snižujících růst tasemnic (Volf a Horák, 2007).



Obr. 3: *Hymenolepis diminuta* (tasemnice krysy). Foto H. Bártíková.

K významným tasemnicím ovlivňujícím produkci hospodářských zvířat patří rody *Echinococcus*, *Taenium* a *Moniezia*.

Rod *Echinococcus* zahrnuje tasemnice malých rozměrů (1-6 mm). Definitivním hostitelem druhu *E. granulosus* jsou psovité šelmy, mezihostitelem přežvýkavci, popř. člověk. V mezihostiteli se vyvíjí zvláštní forma cysticerku, tzv. hydatida či echinokok, v němž vznikají další larvy (protoskolexy). Hydatida působí cystickou echinokokózu. Nejčastěji napadaným orgánem mezihostitele jsou játra a plíce. V případě prasknutí

hydatidy se vylíje tekutina s množstvím parazitárního antigenu, který vyvolá anafylaktický šok, a uvolněné larvy způsobují diseminovanou cystickou echinokokózu (Volf a Horák, 2007).

Hospodářská zvířata jsou ohrožována larválními stadii rodu *Taenia*, která vyvolávají onemocnění zvané cysticerkóza. Symptomy cysticerkózy se odvíjí od umístění a počtu larev, k nejzávažnějším patří neurocysticerkóza. *T. saginata*, tasemnice bezbranná, je kosmopolitní parazit využívající jako mezihostitele skot (i buvolu) a jako definitivního hostitele člověka. Dorůstá délky 5-12 m. Na hlavičce bez háčků jsou výrazné 4 přísavky. Články s vajíčky se dostávají z definitivního hostitele stolicí. Na pastvě se pozřením vajíček nakazí mezihostitel, v jehož střevě se uvolňuje onkosféra, která penetruje přes střevní stěnu krevním oběhem do svalů (jazyk, krk, srdeční sval) a přeměňuje se na cysticerkus. Lidé se nakazí pozřením nedostatečně tepelně upravené potravy. Infekce se u dobytka obvykle neprojevuje, ale způsobuje výrazné hospodářské ztráty kvůli nemožnosti využít nakažená zvířata (Ichhpujani a Bhatia, 2002).

T. multiceps je tasemnice psů využívající jako mezihostitele hlavně ovce, ale i hovězí dobytek, hlodavce a zřídka člověka. Larvy v ovci napadají centrální nervový systém a vyvolávají různé klinické příznaky (kroužení, ataxii, nekoordinovanost, paralýzu zadních končetin, slepotu a kóma). Onemocnění je rozšířené zejména ve Středozeří a v oblasti Blízkého východu (El-On et al. 2008). Cysticerkózu hospodářských zvířat (hlavně ovce a kozy) způsobují také další dva druhy, *T. hydatigena* a *T. ovis* parazitující u psů a jiných šelem.

K celosvětově rozšířeným tasemnicím patří *Moniezia expansa* a *M. benedeni*. *M. expansa* se více vyskytuje u ovcí, *M. benedeni* u skotu. Životní cyklus zahrnuje mnoho druhů roztočů jako mezihostitele. Zvířata se nakazí pozřením roztočů s cysticerkoidy na pastvě. Infekce obvykle probíhá bez klinických symptomů, akutní moniezióza se projevuje průjmy či zácpou (Hansen et al. 1950).

2.3 Vztah hostitel – parazit

Parazitismus je jednou z nejvíce rozšířených životních strategií organismů a představuje významný fenomén v evoluci. Jedná se o vztah, kdy jeden organismus (parazit) získává živiny a žije na úkor jednoho či více dalších jedinců (hostitel). Parazit má z tohoto soužití prospěch, zatímco hostitel je ovlivňován negativně, přičemž ale není

snahou parazita svého hostitele zabít (Bush et al. 2001). Zahubením hostitelské populace se totiž paraziti sami odsoudí k zániku. Helminti ve většině případů osidlují velký počet hostitelů, z nichž každý je nositelem pouze několika parazitických jedinců. Silně infikovaných jedinců je obvykle méně (Gaba et al. 2005). Tato pozoruhodná rovnováha mezi většinou hostitelů a parazitů je důsledkem dlouhodobé koevoluce dvou organismů, zejména imunitní obrany hostitele a unikání parazita imunitnímu systému (Moreau a Chauvin, 2010). Negativní působení na hostitele zahrnuje mechanické poškození, ovlivnění hostitele exkrementně-sekrecními produkty helmintů, poruchu příjmu živin a ovlivnění růstu. Poškození hostitele často souvisí s imunitními reakcemi.

2.3.1 Interakce na úrovni imunity

Imunitní odpověď hostitele na infekci helminty představuje způsob obrany hostitele. Často ale odpovídá za patologické změny, které jsou u mnoha infekcí primární příčinou nemoci. Například imunitní odpověď vyvolaná antigenem (Ag) *Schistosoma mansoni* je příčinou vzniku granulomů v játrech, v patologii infekcí filariálními parazity (např. *Onchocerca volvulus*) hraje kromě motility parazitů výraznou roli též imunitní odpověď (MacDonald et al. 2002).

Helminti nemohou být pozřeni makrofágy ani jinými fagocyty, takže se pro boj s nimi vyvinuly jiné mechanismy, např. mobilizace a aktivace T a B lymfocytů, eozinofilů, žírných a NK buněk (přirození zabíječi, „nature killer“ buňky). Pokud infekce probíhá na slizničním povrchu, zapojují se pohárkové buňky produkující hlen. Po prezentaci Ag se rozvíjí odpověď T lymfocytů charakterizovaná vývojem Th2 buněk (pomocné T buňky typ 2), které produkují interleukiny (IL) 4, 5, 13 a stimulují tvorbu imunoglobulinů (Ig), zejména IgE, dále IgG a IgA. Tyto protilátky aktivují eozinofily, žírné buňky a další buňky, dochází k uvolnění látek (např. histaminu), které narušují povrch parazita a/nebo vytváří pro parazita méně příznivé prostředí (Johnston et al. 2008; McKay 2009). V důsledku indukce imunitní odpovědi typu Th2 někteří helminti snižují imunitní odpověď zprostředkovanou Th1 buňkami (pomocné T buňky typ 1). Například *F. hepatica* inhibuje u myši odpověď Th1 buněk vyvolanou bakterií *Bordetella pertusis*.

Helminti si zároveň vyvíjejí různé mechanismy, jak imunitní odpovědi hostitele uniknout. Někdy jsou helminti označováni jako mistři imunomodulace (Moreau a Chauvin, 2010). Jsou schopni začlenit hostitelské molekuly do svého povrchu, takže

parazit je imunitním systémem rozpoznán jako část hostitele, může docházet k rychlé obměně povrchových antigenů, k inhibici prezentace parazitárního Ag, blokování komplementové kaskády či využívání některých složek imunity ve prospěch helmintů (Volf a Horák, 2007). Tyto vlastnosti jim umožňují přežít v hostiteli a mohou vést k interakcím se zánětlivými a imunitními mechanismy u jiných infekcí, alergických či autoimunitních chorob. Imunomodulační účinky hrají dále roli při vakcinaci (Moreau a Chauvin, 2010).

2.3.2 Negativní důsledky imunomodulace

Infekce helminty může zvyšovat citlivost hostitelů k dalším infekcím, proti nimž se uplatňuje obrana vyvolaná Th1 buňkami. Příkladem mohou být myši infikované druhem *S. mansoni* se zvýšenou citlivostí vůči *Toxoplasma gondii* či snížení ochranné imunity proti rodu *Plasmodium*. Vliv helmintů na další infekci ale není jednoznačný, závisí na mnoha faktorech (ochranné a patologické imunitní mechanismy, druh helminta, hostitele a koinfikujícího patogenu).

Několik studií ukázalo, že helminti mohou prostřednictvím modulace imunitního systému hostitele ovlivnit účinnost vakcín, zvláště v případech vyžadujících odpověď Th1 imunity. Infekce druhem *Schistosoma spp.* a *O. volvulus* snižuje účinnost vakcín proti tuberkulóze či tetanu, *Ascaris suum* ovlivňuje efektivitu vakcín proti *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vliv helmintóz na účinnost očkování musí být brán v potaz při jejich používání a vývoji nových vakcín (Moreau a Chauvin, 2010).

2.3.3 Přínosy imunomodulace

Ačkoli manipulace parazitů s imunitním systémem hostitele může vést k jejich zvýšené citlivosti vůči dalším infekcím, není cílem parazitů hostitele zabít. Ovlivnění imunity má v některých případech přínos pro zdraví hostitelů v důsledku potlačení imunopatologických reakcí.

Primární infekce helminty vyvolává imunitní odpověď. I když není schopná zlikvidovat infekci, zabraňuje přítomnosti dalších parazitů, a tím superinfekci (infekce, která se rozvíjí v průběhu jiné, již probíhající nákazy). Helmintózy zvyšují rezistenci vůči dalším infekcím, proti nimž se uplatňuje imunita zprostředkovaná Th2, např. eliminace *Trichuris muris* u myši se schistosomózou. Kromě citlivosti hostitele vůči koinfekcím mohou helminti též snižovat jejich závažnost. Reinfekce (opětovná infekce

touž nemocí) a jejich imunologický podklad byly zkoumány u schistosomózy, u nichž s rezistencí hostitelů vůči infekci korelovaly hladiny IgE. Rovněž byl prokázán pozitivní vliv Th2 imunity na schopnost vyloučení intestinálních nematod z těla.

Další důležitou oblastí je výzkum vlivu helmintózy na autoimunitní a alergické reakce. Lidé v západním světě, kde je nízký výskyt helmintózy, často trpí alergiemi či autoimunitními chorobami. V rozvojových zemích je situace opačná. Epidemiologická i experimentální data dokazují, že chronické helmintózy chrání proti alergiím. Tyto výsledky jsou poměrně paradoxní, protože alergie souvisí s degranulací žírných buněk vlivem IgE, jehož produkce je stimulována právě helminty. Existuje několik možných vysvětlení, např. produkce IgG bránící kontaktu Ag s IgE či tvorba protizánětlivých cytokinů, které inhibují alergické reakce.

Stejným způsobem helminti u svých hostitelů snižují výskyt autoimunitních onemocnění či jejich projevy. Infekce *S. mansoni* u myši brání rozvoji diabetu typu 1 či experimentální autoimunitní encefalomyelitidě (MacDonald et al. 2002; Moreau a Chauvin, 2010).

Imunomodulační vlastnosti helmintů a jejich produktů představují slibnou oblast vývoje nových protizánětlivých léčiv. Souhrn protizánětlivých látek izolovaných z helmintů přináší přehledový článek od Johnstona a spolupracovníků (2009). Pro klinické zkoušení nemohou být použiti vysoce patogenní helminti, ale pouze jejich imunomodulační produkty, oslabení či slabě patogenní helminti. Ze studií na zvířatech vyplývá, že použití živých helmintů je účinnější než podání parazitárních antigenů. Ačkoli imunoterapie s pomocí helmintů v sobě skrývá velký potenciál, je třeba mít na paměti, že vliv na alergické, autoimunitní choroby a koinfekce není vždy jednoznačný (McKay 2009; Osada a Kanazawa, 2010).

2.4 Léčba helmintózy

2.4.1 Anthelmintika

Anthelmintika představují široké spektrum léčiv proti infekcím vyvolaným helminty. Jsou rozděleny do tříd na základě podobné chemické struktury a mechanismu účinku. Jednotlivé skupiny anthelmintik, hlavní léčiva používaná ve veterinární medicíně a cílové skupiny parazitů, na něž léčiva působí, jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Přehled veterinárních anthelmintik (upraveno dle McKellar a Jackson, 2004)

Skupina anthelmintik	Zástupci	Spektrum působení
Benzimidazoly	Thiabendazol, albendazol, mebendazol, flubendazol, triklabendazol, kambendazol, fenbendazol, oxfendazol	GI a plicní nematoda, tasemnice, jaterní motolice (albendazol, triklabendazol)
Probenzimidazoly	Febantel, netobimin, thiofanát	GI a plicní nematoda, tasemnice, jaterní motolice (jen netobimin)
Avermektiny	Ivermektin, abamektin, doramektin, selamektin, eprinomektin	GI a plicní nematoda, migrující měchovci koní, dirofilárie psů
Milbemyciny	Moxidektin	Podobné avermektinům
Imidazothiazoly	Levamisol, tetramizol	GI nematoda (přežvýkavci), plicní nematoda
Tetrahydropyrimidiny	Pyrantel Morantel	Tasemnice u koní GI nematoda (přežvýkavci, koně, psi, kočky)
Pyrazinoisochinoliny	Prazikvantel, epsiprantel	Tasemnice (vč. echinokoků), motolice (schistosomy)
Heterocyklická léčiva	Piperazin Diethylkarbamazin	GI nematoda (psi, kočky) Plicní nematoda (dobytek)
Salicylanilidy	Niklosamid, klosantel, rafxanid	Jaterní motolice (přežvýkavci), <i>Haemonchus contortus</i> (klosantel)
Organofosfáty	Haloxon, trichlorfon, Dichlorvos, naftalofos	GI nematoda
AAD	Monepantel	GI nematoda (přežvýkavci)

Pozn. GI, gastrointestinální; AAD, amino-acetonitrilové deriváty

2.4.1.1 Benzimidazoly

První zástupce této skupiny – thiabendazol - byl představen v roce 1961 a od té doby se do klinické praxe dostala řada dalších zástupců. Jedná se o široce používanou skupinu léčiv ve veterinární i humánní medicíně, jejímiž hlavními výhodami je široké spektrum účinku, působení i proti nezralým stádiím helmintů a bezpečnost pro hostitele. Mechanismus účinku vyplývá z interakce s β -tubulinem, základní stavební jednotkou mikrotubulů. Mikrotubuly jsou intracelulární struktury s rozmanitými funkcemi. Tvoří základ cytoskeletu buňky, zajišťují pohyb chromosomů při buněčném dělení a transport intracelulárních částic v souvislosti s energetickým metabolismem a exocytózou. Například mebendazol a flubendazol zodpovídají za ztrátu mikrotubulů v tegumentových a střevních buňkách cestod a nematod, což je spojeno s poruchami transportu sekrečních tělísek, sníženým příjmem glukózy a zvýšenou utilizací glykogenu. Zvláštní skupiny tvoří probenzimidazoly, proléčiva, která vykazují účinek až po metabolické aktivaci v hostiteli. Oproti benzimidazolům mají lepší rozpustnost (Holden-Dye a Walker, 2007; Martin 1997; Riviere a Papich, 2009).

2.4.1.2 Makrocyclické laktony a milbemyciny

Makrocyclické laktony (avermektiny) jsou fermentačním produktem *Streptomyces avermitilis*. Ivermektin, první léčivo této skupiny uvedené na trh, je polosyntetický derivát avermektinů. Léčiva působí svalovou paralýzu helmintů působením na chloridové kanály řízené glutamátem a zvýšením permeability chloridových iontů. Tyto iontové kanály se nacházejí u nematod, avšak ne u hostitelů, což zajišťuje selektivitu účinku (Husain a Scheibel, 2004).

2.4.1.3 Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Tyto dvě skupiny anthelmintik fungují jako agonisté nikotinových receptorů. Prodlouženou aktivací nikotinových receptorů pro acetylcholin (nAChR) vyvolávají spastickou kontrakci a následnou paralýzu svalů nematod. Farmakologická analýza prokázala u helmintů přítomnost několika subtypů nAChR, které se s pomocí těchto anthelmintik podařilo charakterizovat. Prvním používaným léčivem ze skupiny imidazothiazolů byl tetramizol, racemická směs dvou izomerů, z nichž aktivnější nese jméno levamizol. Umožnil snížit dávku na polovinu a v současné době je používán ve veterinární praxi. Strukturu tetrahydropyrimidinu mají pyrantel a morantel (Holden-Dye a Walker, 2007; Riviere a Papich, 2009).

2.4.1.4 Pyrazinoisochinolinové deriváty

Nejvýznamnějším léčivem této skupiny je prazikvantel, používaný v humánní i veterinární praxi od roku 1980 proti plochým červům (tasemnicím a motolicím). Mechanismus účinku není úplně objasněn. Způsobuje paralytické svalové kontrakce a poškození tegumentu parazitů. Následuje jejich smrt a vypuzení z těla. Účinek je dáván do souvislosti s působením na parazitární glutathion-S-transferasu a intracelulární hladiny vápníku se sekundárním vlivem na metabolismus (snížený příjem glukózy, obsah ATP, redukce ukládání glykogenu a uvolňování laktátu) (Dayan 2003).

2.4.1.5 Heterocyklické sloučeniny

Zástupcem je piperazin, který je používán jako anthelmintikum od 50. let 20. století a stále tvoří aktivní složku volně prodejných léčiv na parazitózy u dětí. Jeho nízká cena a bezpečnost předurčila jeho rozsáhlé využití ve veterinární oblasti (Holden-Dye a Walker, 2007; Riviere a Papich, 2009).

2.4.1.6 Salicylanilidy

Salicylanilidové léčivo niklosamid bylo po mnoho let široce používané k léčbě cestodóz. Interferuje s absorpcí glukózy a oxidativní fosforylací. K rozpojení oxidativní fosforylace může docházet i u savců, avšak za použití vyšších dávek, než je běžné pro léčbu parazitóz. Léčivo působí na hlavičku a proximální segmenty tasemnice, čímž dojde k uvolnění tasemnice od stěny střeva a k jejímu peristaltickému vyloučení ven z těla (Husain a Scheibel, 2004). Efektivní léčiva proti motolicím představují klosantel a rafoxanid (Riviere a Papich, 2009).

2.4.1.7 Organofosfáty

Organofosfátové sloučeniny, původně vyvinuté jako insekticidy, našly později uplatnění jako anthelmintika ve veterinární medicíně. Hlavním účinkem na nematoda je inhibice acetylcholinesterasy (AChE), vedoucí k poruše nervosvalového přenosu a následné paralýze. AChE hostitele i různých druhů parazitů se liší afinitou a citlivostí k organofosfátům (Riviere a Papich, 2009).

2.4.1.8 Amino-acetonitrilové deriváty (AAD)

Tato nová třída anthelmintik vykazuje účinnost proti nematodům ovcí a skotu, zahrnujícím populace rezistentní vůči klasickým širokospektrým anthelmintikům (benzimidazolům, makrocyklickým laktonům a imidazothiazolům) (Kaminsky et al. 2008a). AAD mají unikátní mechanismus účinku, působí jako agonisté na nikotinovém

acetylcholinovém receptoru přítomném pouze u nematod, čímž vyvolávají jejich paralýzu. První molekulou z této skupiny je monepantel. Působí proti gastrointestinálním nematodům u ovcí při dávce 2,5 mg/kg a skotu při dávce 5 mg/kg (Kaminsky et al. 2008b).

2.4.2 Nefarmakologické způsoby léčby

Anthelmintika představují základ pro léčbu helmintóz u hospodářských zvířat a v současnosti neexistuje účinná alternativa k chemoterapii helmintóz. Situaci však komplikuje rozvoj rezistence na dostupná léčiva, což ohrožuje zdraví zvířat a zemědělskou produkci (Wolstenholme et al. 2004). Ve snaze omezit a zefektivnit používání anthelmintik získávají v posledních letech větší pozornost alternativní přístupy ke kontrole parazitóz. Tyto metody lze rozdělit do 5 kategorií: řízení pastvy, biologická kontrola, suplementace živin, vakcinace a přístup založený na genetice. Každá strategie má své výhody a nevýhody. Ačkoli mohou snížit závažnost infekcí, samy o sobě k efektivní kontrole parazitóz nestačí. Pro udržení jakéhokoli nefarmakologického přístupu bude stále nutné uvážlivé a méně časté používání léčiv (Stear et al. 2006; Waller 1997).

2.4.2.1 Řízení pastvy

Cílem je maximální využití pastvin, které jsou k dispozici, a redukce počtu infekčních larev v dosahu hospodářských zvířat. Jednou z možností, jak na pastvě snížit množství infekčních stadií, je omezit počet zvířat pasoucích se v dané oblasti. Méně zvířat vylučujících vajíčka vede k menší kontaminaci pastvy. Další možností je střídavé využívání pastvin, např. střídat pěstování plodin a chov dobytka, či obměňovat druhy hospodářských zvířat, čímž se zabrání nárůstu počtu larev. Střídání druhů je ale nevhodné pro blízké příbuzné jedince, např. ovce a kozy, protože většina helmintů, která může nakazit jeden druh, je hrozbou i pro ten druhý. Jiným postupem je přesunutí citlivých jedinců na méně kontaminovanou pastvu či tzv. rotační pastva, kdy je pastva rozdělena na úseky, které jsou spásány postupně. Od rotace zvířat na jednotlivých úsecích si majitelé stád slibují, že v nepřítomnosti pasoucích se zvířat nenajdou infekční larvy hostitele a uhynou. Vzhledem k dlouhé životnosti a odolnosti larev však nebývá tato metoda příliš účinná (Stear et al. 2006). Zmíněné postupy obecně snižují nutnost anthelmintické terapie, či ji dokonce úplně eliminují, což je v přímém kontrastu s běžnou rutinou, kdy se pasoucí zvířata přeléčují každých několik týdnů. Snaha zlepšit

praktiky na pastvě ale často selhává, protože vyžaduje ve srovnání s neustálou aplikací léčiv větší pozornost farmářů (Waller 1997).

2.4.2.2 Biologická kontrola

Biologická kontrola využívá organismy, které různými mechanismy poškozují parazity. Například houba *Duddingtonia flagrans* snižuje intenzitu a závažnost nematodóz. Pro optimální účinek je nutné denní podávání houbových spor, což je hlavní stinná stránka využívání predátorské houby (Stear et al. 2006).

Kontrola červů může být podpořena užitím rostlin či rostlinných výtažků s anthelmintickými vlastnostmi. Příkladem rostlin s takovými účinky jsou luštěniny nebo rostliny s obsahem taninů (např. štirovník, čekanka, akácie, vičenec) (Hoste et al. 2006). Možné mechanismy zahrnují: zvýšené dodání proteinů či stopových prvků obsažených v těchto rostlinách, což může podpořit imunitu hostitele a tkáňovou regeneraci; omezení vývoje a přežití larválních stadií či přímý toxický účinek na helminty. Ačkoli rostliny mohou za určitých okolností omezit parazitózy, všechny dostupné důkazy svědčí o tom, že efekt je příliš specifický z hlediska druhů helmintů a v přírodě hodně nestálý.

U motolic, které ke svému vývoji potřebují hlemýždě, se uplatňuje nepřímá biologická kontrola mezihostitelů. V jihovýchodní Asii kachny pozřením hlemýžďů snižují infekce přežvýkavců druhem *Fasciola gigantica* (Waller 1997).

2.4.2.3 Supplementace živin

Klinické příznaky nemocí mohou být zmírněny dodáním proteinů před či v průběhu infekce parazity *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Nematodirus battus*. Odolnost vůči *T. colubriformis* může být zvýšena i podáním močoviny, která je v bacheru přežvýkavců přeměňována bakteriemi na aminokyseliny a proteiny. Močovina tedy může být využita jako levný zdroj nebílkovinného dusíku namísto drahých proteinů. Proteiny podporují imunitní odpověď a pomáhají regenerovat poškození mukózy u gastrointestinálních parazitů. Kromě močoviny a proteinů má také význam dodávání stopových prvků, železa, zinku, mědi a molybdenu. Supplementace živin se jeví jako úspěšná, většímu rozšíření ale brání především finanční stránka (Stear et al. 2006).

2.4.2.4 Vakcíny

Účelem vakcín je zvýšení imunity hostitele proti helmintům, čímž se hostitel stává vůči parazitům rezistentní. Vývoj vakcín se opírá o 3 strategie: oslabené vakcíny, vakcíny založené na přirozené imunitě a vakcíny využívající tzv. skrytý antigen. Komerčně jsou dostupné vakcíny z ozářených larev proti plicním červům ovcí a skotu. Potenciálním kandidátem jsou také parazitární molekuly, které jsou rozpoznávány hostitelem. Zejména ty, které jsou preferenčně rozpoznávány spíše rezistentním než citlivým hostitelem. Ačkoli některé přípravky vyvolaly u hostitelů vysokou úroveň rezistence vůči nákaze, doposud nebyla objevena žádná konkrétní molekula, která by byla za tento jev zodpovědná. Zdá se tedy, že pro získání rezistence hostitelů je nutné rozpoznání velkého množství parazitárních molekul. Třetí zmíněnou možností je hledání skrytého antigenu. To jsou molekuly exprimované parazitem a schopné vyvolávat imunitní odpověď. Normálně ji ale nevyvolávají, protože nejsou vystaveny hostitelským buňkám. Jedná se především o látky z trávicího traktu parazita. Dva preparáty založené na skrytém antigenu se ukázaly jako účinné. Avšak izolace dostatečného množství látek z trávicího ústrojí parazitů je nepraktická. Možností, jak překonat tento problém, je využití rekombinantních molekul. Tato strategie však vyžaduje další výzkum (Stear et al. 2006).

2.4.2.5 Využití genetické variability

V zásadě existují tři způsoby, jak využít genetickou variabilitu: výběr plemene, křížení a selekce v rámci plemene. Srovnání různých plemen ukázalo, že některá plemena ovcí jsou více rezistentní vůči druhu *Haemonchus contortus* či *Teladorsagia circumcincta*. Výběr plemene je nejjednodušší cestou, jak zajistit větší rezistenci k parazitům. Další možností je křížení plemen. Křížení plemen ale není výhodné tehdy, pokud má určité plemeno větší produktivitu než ostatní plemena. V tomto případě se dá využít genetické variability v rámci plemene. Kromě snahy zvýšit rezistenci lze selekci ovlivňovat i produkci masa, mléka a vlny (Stear et al. 2006).

2.5 Rezistence vůči anthelmintikům

Jak již bylo zmíněno, rezistence helmintů k anthelmintikům představuje závažný problém, který ohrožuje produktivitu hospodářských zvířat a snižuje úspěšnost léčby u lidí. Za vznik rezistence odpovídá řada faktorů, z nichž nejvýznamnější je využití

dlouhodobě působících léků několikrát do roka, časté střídání léčiv, ošetření v krátkých intervalech, poddávkování léčiva. Tato schémata léčby sice potlačují celkovou populaci parazitů, ale tím, že snižují přežití pouze u citlivých jedinců, dochází k nárůstu rezistentní populace a vzniku rezistentních kmenů (Molento 2011).

Rezistence nematod byla popsána již u všech tříd širokospektrých anthelmintik: benzimidazolů, makrocyclických laktonů, levamizolu a dalších nikotinových agonistů. Objevuje se ale i rezistence nematod k úzkospektrým léčivům (klosantel). Velmi závažná je situace u malých přežvýkavců, hlášení rezistence u skotu zatím není tak běžné. I když v posledních letech vzrůstá výskyt rezistence i u hovězího dobytka a koní, např. na Novém Zélandě a v Jižní Americe. Ačkoli rezistence motolic zatím nedosáhla takových rozměrů jako u nematod, jedinci odolní vůči salicylanilidům, rafoxanidu a klosantelu nejsou ničím výjimečným. Větší znepokojení přináší rozšíření rezistence proti triklabendazolu, působícímu i proti migrujícím larválním stadiím motolic. Rezistence na triklabendazol byla popsána poprvé v roce 1995 v Austrálii, o něco později následovaly Nizozemí, UK a Irsko. Spolu s rozšířením motolic rodu *Fasciola* v důsledku klimatických změn (mírnější a teplejší podnebí) vede rezistence k výraznému nárůstu počtu zvířat infikovaných fasciolózou (Kaplan 2004; Wolstenholme et al. 2004).

2.5.1 Mechanismus vzniku rezistence

Na vzniku rezistence se podílí různé mechanismy, viz Tab. 3 (Wolstenholme et al. 2004; Brennan et al. 2007):

- změna molekulárního cíle, takže léčivo již není schopné rozpoznat cílovou strukturu a je neefektivní
- amplifikace genů pro cílovou strukturu, čímž je překonán účinek léčiva
- změna v metabolismu léčiva, která má za následek jeho inaktivaci či naopak zabraňuje aktivaci v případě proléčiv
- změna transportu léčiva, která brání přístupu léčiva na místo účinku

Většina snah objasnit mechanismy rezistence se soustředila na **změny cílové struktury pro léčivo**, identifikované změnami v genomové sekvenci. Se vznikem rezistence je spojována existence jednonukleotidového polymorfismu (SNP, „single nucleotide polymorphism“), respektive několik typů SNP. SNP jsou jedinečné genetické rozdíly mezi jedinci a jsou základem genetických odlišností v populaci. Mohou vznikat

také genovou mutací v důsledku léčby. Změna jednoho nukleotidu může vést k záměně aminokyseliny v cílovém proteinu, a tudíž k změně afinity léčiva k cílové struktuře a potenciálně nižší účinnosti léčiva. Ačkoli mnoho SNP souvisí s rezistencí, SNP přispívající k rezistenci u jednoho helminta nemusí způsobit rezistenci jiného druhu. Identifikovat relevantní SNP je u helmintů problematické, neboť k rezistentnímu fenotypu přispívají mnohočetné genetické změny na různých místech genomu, a rezistence se tak může vyskytovat i v nepřítomnosti SNP.

Stěžejní role SNP pro vznik rezistence byla prokázána u *H. contortus* a benzimidazolových anthelmintik. Nejběžnější mutace se nachází v kodonu 200 genu pro β -tubulin izotyp 1, cílovou strukturu benzimidazolů, která vede k záměně fenylalaninu za tyrosin (Phe200Tyr). Další SNP, který může přispívat ke vzniku rezistence, je mutace v kodonu 167 (Phe167Tyr). Pro vznik rezistence je ale stěžejní mutace v kodonu 200. Stejně polymorfismy se vyskytují i u β -tubulinu izotypu 2. Výše zmíněné mutace mohou být nalezeny u rezistentních populací *Teladorsagia circumcincta* a *Cooperia oncophora*, avšak pro vznik rezistence je v těchto případech důležitá účast dalších mechanismů.

Rezistence vůči makrocyclickým laktonům a milbemycinům není doposud plně objasněna. Byla spojována s mutacemi v extracelulární doméně chloridových kanálů řízených glutamátem u *H. contortus* a *C. oncophora*. Ale ukazuje se, že jediný SNP pro vznik rezistence nestačí a jsou nezbytné vícečetné mutace cílových struktur, popř. se uplatňují jiné mechanismy (mutace genu pro P-glykoprotein). Rezistence k levamisolu pravděpodobně souvisí s nepřítomností jednoho podtypu nAChR. Snahy odhalit polymorfismus, který by s rezistencí v tomto případě souvisel, však selhaly. Mechanismy rezistence k hlavním třídám anthelmintik jsou shrnuty v Tab. 3.

Kromě změn cílové struktury jsou pro vývoj rezistence důležité **detoxikační procesy** u helminta, založené na jeho **biotransformačních enzymech** a **transportních proteinech**. Jejichž změna též vede k modifikované odpovědi parazitů na léčiva (James et al. 2009; Wolstenholme et al. 2004). O těchto mechanismech obrany parazitů vůči působení anthelmintika, které mohou zapříčinit vznik rezistence, je detailněji pojednáno v následující kapitole.

Tab. 3: Možné mechanismy rezistence k hlavním skupinám anthelmintik (upraveno dle Wolstenholme et al. 2004)

Skupina anthelmintik	Mechanismus rezistence
Benzimidazoly	Mutace genu pro β -tubulin izotyp 1 a 2: Phe200Tyr; Phe167Tyr Změněný metabolismus a/nebo příjem léčiva
Makrocyclické laktony	Mutace genů pro GluCl a GABA _{Cl} Zvýšená exprese P-glykoproteinu
Imidazothiazoly (levamisol)	Změny v nAChR

Pozn. GluCl; chloridový kanál řízený glutamát, GABA_{Cl}; chloridový kanál řízený kyselinou γ -aminomáselnou, nAChR; nikotinové acetylcholinové receptory

2.6 Obranné mechanismy parazitů vůči anthelmintikům

Stejně jako ostatní organismy, i paraziti se mohou prostřednictvím svých biotransformačních enzymů bránit negativním účinkům cizorodých látek (xenobiotik), včetně léčiv. Kromě modifikace struktury léčiva může být škodlivé působení léčiv na parazita sníženo díky jejich transportním proteinům, které ovlivňují koncentraci léčiva v místě účinku (Cvilink et al. 2009; James et al. 2009). Metabolizace léčiv pomocí enzymů a následný transport metabolitů reprezentují tři fáze eliminace léčiv a představují důležitý obranný mechanismus parazitů.

2.6.1 Biotransformace xenobiotik

Jestliže je xenobiotikum dostatečně polární, je z organismu eliminováno beze změny, případně reaguje s endogenními sloučeninami za vzniku konjugátu, který je následně z organismu vyloučen. Většinou však xenobiotika vykazují vyšší lipofilitu. V tomto případě musí být nejprve pomocí enzymů tzv. 1. fáze přeměněny na produkt, který může být eliminován přímo, nebo po reakci s endogenními sloučeninami (tzv. 2. fáze) za vzniku konjugátu, který je vyloučen. Transport metabolitů přes cytoplazmatickou membránu pomocí různých přenašečů je někdy označován jako 3. fáze detoxikace a eliminace léčiv.

V **1. fázi** je xenobiotikum přeměněno příslušnými enzymy na polárnější produkt zavedením nebo odkrytím substituentů, které jsou schopny reagovat s konjugačními enzymy 1. fáze. K nejdůležitějším reakcím patří oxidace, redukce a hydrolýza.

V **2. fázi** reaguje xenobiotikum či produkt 1. fáze s endogenní sloučeninou. Konjugace vyžaduje dodání energie, protože endogenní látka sloužící jako konjugační činidlo musí být aktivována vazbou s makroergním kofaktorem. Hlavními konjugačními reakcemi jsou sulfonace, metylace, acetylace, konjugace s kyselinou UDP-glukuronovou, glutathionem, aminokyselinami či glukózou (Skálová a Boušová, 2011).

2.6.2 Biotransformační enzymy parazita

2.6.2.1 Oxidační enzymy

Cytochromy a flavinové monooxygenasy

Ačkoli oxidační enzymy hrají důležitou roli u celé řady organismů, helminti byli dlouhou dobu považováni za jedince, u nichž oxidační enzymy nemají velký význam a kteří postrádají **cytochromy P450 (CYP)**. CYP představují širokou nadrodinu hemoproteinů a jsou nejdůležitějšími enzymy 1. fáze biotransformace. Pokroky v genetické analýze ale přinesly důkazy o existenci genů pro CYP i u helmintů. Genom *Caenorhabditis elegans*, modelové hlístice, obsahuje přes 80 CYP genů zařazených do *CYP35* rodiny. Po expozici *C. elegans* známým CYP induktorům (β -naftoflavon, klofibrát, fluoranten, těžké kovy) byla exprese některých genů této rodiny zvýšena (Barret 1998).

Kromě hledání genů pro CYP jsou výzkumné snahy soustředěny i na zjišťování enzymové aktivity CYP. U *C. elegans* enzymová aktivita prokázána nebyla. Nízká monooxygenasová aktivita CYP byla zaznamenána u larev *Heligmosomoides polygyrus* a *Trichostrongylus colubriformis* (Barret 1998). Typická CYP monooxygenasová aktivita, epoxidace aldrinu a deethylace ethoxykumarinu, byla nalezena v mikrosomech izolovaných z L1 a L3 larev druhu *H. contortus*. Bylo zjištěno, že tyto aktivity jsou NADPH dependentní, inhibované oxidem uhelnatým a piperonylbutoxidem (CYP inhibitory) a indukované fenobarbitalem (CYP2B induktor). Mikrosomy z dospělců ukázaly pouze nízkou aktivitu epoxidace aldrinu. Oxidativní metabolismus aldrinu a ethoxykumarinu byl zkoumán rovněž u dospělců v *ex vivo* experimentech, které potvrdily nízkou úroveň epoxidace aldrinu. Předpokládá se, že vzhledem k nižší koncentraci kyslíku v trávicím traktu je u dospělých parazitů oxidativní metabolismus méně důležitý než u volně žijících larev.

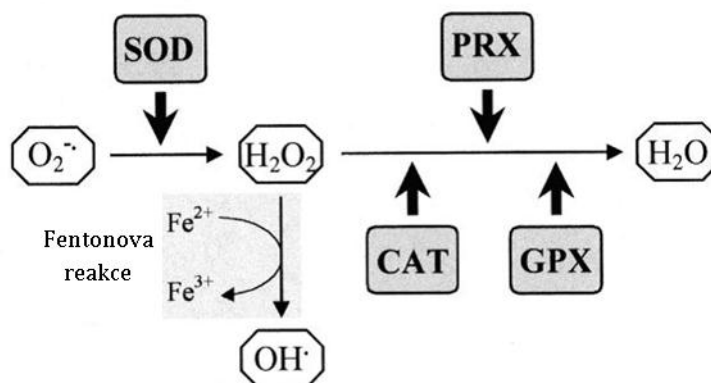
Naproti tomu u dospělců *S. mansoni* byla pozorována vysoká aktivita CYP. Ze substrátů CYP byly oxidovány aminopyrin, ethylmorfin, benzfetamin, N-nitrosyldimethylamin a pentoxyresorufin.

Ačkoli CYP fungují zejména jako monooxygenasy (přenos jednoho kyslíkového atomu z molekulárního kyslíku na substrát), mohou vystupovat jako oxytransferasy či reduktasy. Oxytransferasová aktivita (přenos kyslíku z jednoho substrátu na druhý) byla nalezena u larev i dospělců *H. contortus*.

Oxidace xenobiotik může být u helmintů rovněž zprostředkována **flavinovými monooxygenasami (FMO)**. Genom *C. elegans* obsahuje 5 genů kódujících domnělé homology savčích FMO. Jeden z nich byl klasifikován jako *FMO15*, avšak role odpovídajícího proteinu zůstává zatím nejasná (Cvilink et al. 2009).

Antioxidační enzymy

Helminti, stejně jako všechny eukaryotní organismy, mají enzymy sloužící k ochraně před oxidačním stresem. Antioxidační enzymy (Obr. 4) jsou nezbytným nástrojem k obraně parazitů před reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) produkovanými hostitelskými makrofágy, neutrofily a eozinofily. Dalším zdrojem ROS ohrožujícím helminty mohou být některá léčiva. Kromě primární úlohy odstraňování ROS se mohou antioxidační enzymy účastnit detoxikace xenobiotik, včetně anthelmintik. K nejdůležitějším antioxidačním enzymům patří glutathionperoxidasa, superoxididismutasa a katalasa. Nověji objevenou skupinou antioxidačních enzymů jsou peroxiredoxiny a pro parazity unikátní thioredoxin-glutathionreduktasa (Bonilla et al. 2008; Henkle-Dührsen a Kampkötter, 2001).



Obr. 4: Antioxidační enzymy účastnící se ochrany proti reaktivním kyslíkovým radikálům (SOD, superoxididismutasa; CAT, katalasa; PRX, peroxiredoxiny; GPx, glutathionperoxidasa) (Henkle-Dührsen a Kampkötter, 2001).

GLUTATHIONPEROXIDASY (GPX) zahrnují tři typy, cytosolickou GPx (C-GPx), fosfolipid-hydroperoxid GPx (PH-GPx) a plazmatickou (extracelulární) GPx (P-GPx). Všechny obsahují selen a zprostředkovávají stejný typ reakcí, liší se především strukturou, lokalizací a substrátovou specifitou. Katalyzují redukci H_2O_2 , organických a lipidických hydroperoxidů s využitím glutathionu jako redukčního činidla. C-GPx lokalizované v plazmě nemohou působit přímo na hydroperoxydy mastných kyselin, které jsou esterifikovány ve fosfolipidech. Nejdříve vyžadují aktivitu fosfolipázy A2, která uvolní hydroperoxydy mastných kyselin. Naopak PH-GPx dokáže s fosfolipidy integrovanými v membránách reagovat přímo, ale H_2O_2 odbourává v menším rozsahu. Třetí typ, P-GPx, je syntetizována v játrech a nachází se v plazmě. Substrátem jsou fosfolipidové hydroperoxydy, H_2O_2 a alkylové hydroperoxydy. Vzhledem k tomu, že koncentrace redukovaného glutathionu je v plazmě nízká, jako alternativní donor elektronů může sloužit thioredoxinový či glutaredoxinový systém.

C-GPx a P-GPx jsou tetramery složené ze čtyř identických podjednotek, z nichž každá obsahuje atom selenu kovalentně vázaný k cysteinovému zbytku v aktivním místě. Odlišnou strukturu má PH-GPx, což je monomer s jedním atomem selenu na celý enzym. Kromě GPx se selenem existují také enzymy nezávislé na selenu, které jsou nejvíce příbuzné P-GPx. Místo selenocysteinu mají v aktivním místě cysteinový zbytek. Tato skupina enzymů může představovat záložní systém GPx se selenem, který může chránit organismy před oxidačním stresem i při nízkých koncentracích selenu.

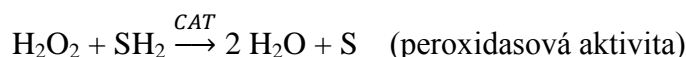
GPx homologní k savčím proteinům byly nalezeny a charakterizovány u filárií *Brugia pahangi*, *Dirofilaria immitis* a *Wuchereria bancrofti* a u motolic *Schistosoma mansoni* a *Clonorchis sinensis*. U motolice *Paragonimus westermani* byly nalezeny a charakterizovány dva geny pro GPx (Henkle-Dührsen a Kampkötter, 2001; Kim et al. 2009).

SUPEROXIDDISMUTASY (SOD) jsou rodinou metaloenzymů, které katalyzují dismutaci superoxidových radikálů na H_2O_2 a kyslík (Obr. 4). V eukaryotních organismech se nachází čtyři typy SOD podle kovu přítomného v katalytickém místě: CuZn SOD (s mědí a zinkem), Mn SOD (s manganem), Fe SOD (s železem) a Ni SOD (s niklem). U helmintů se vyskytuje mitochondriální Mn SOD (M-SOD) a 2 enzymy CuZn SOD – celulární (C-SOD) a extracelulární (EC-SOD) (Vaca-Paniagua et al. 2008). Liší se strukturou a lokalizací. C-SOD je distribuována v cytosolu a jádře, avšak chybí v mitochondriích a sekrečních kompartmentech. EC-SOD je především v plazmě, lymfě a mozkomíšním moku.

C-SOD je dimer dvou identických jednotek, s jedním atomem mědi a zinku na každé jednotce, zatímco EC-SOD je tetramerní glykoprotein. EC-SOD obsahuje hydrofobní signální sekvenci pro transport do extracelulárního prostoru a hydrofilní C-koncovou doménu zodpovědnou za vazbu enzymu k proteoglykanům na buněčném povrchu. Celulární i extracelulární enzym mají konzervativní struktury nutné pro enzymovou aktivitu a vazbu kovů. U obou těchto forem SOD podléhá oxidačně-redukčním změnám při dismutaci $O_2^{\cdot -}$ pouze atom mědi. Atomy zinku se redoxního cyklu nezúčastňují, ale udržují konfiguraci aktivního místa a usnadňují oxidaci. M-SOD je tetramerní protein, posttranslačně transportovaný z cytosolu do mitochondrií.

Aktivita SOD byla detekována ve všech testovaných nematodech. Rozsáhlejší molekulární charakterizace byla provedena u *O. volvulus*, *B. malayi*, *H. contortus*, *D. immitis*. Studie potvrdily, že SOD v parazitických nematodech jsou analogy příslušných SOD v ostatních eukaryotech. Nachází se v různých parazitických tkáních, např. hypodermis, střevě, děloze, afibrilární části svaloviny. Předpokládá se, že C-SOD a M-SOD hrají nezbytnou antioxidační roli, která je nutná pro přežití, ale neúčastní se interakcí hostitel-parazit. Naproti tomu EC-SOD je obzvláště důležitá v obraně proti ROS pocházejícím z hostitele (Henkle-Dührsen a Kampkötter, 2001). U trematod byly rovněž nalezeny C-SOD a EC-SOD a detailně charakterizovány u *S. mansoni* a *F. hepatica*. Lidská a schistosomální C-SOD se liší ve dvou aminokyselinách. U cestod byla CuZn SOD popsána u *Taenia taeniaeformis* a *T. solium*, v nichž se ale dle provedených studií strukturně odlišuje. Mn SOD byla u trematod nalezena v jednom případě, u cestod zatím vůbec. Aktivita SOD může být ovlivňována anthelmitiky, jejich efekt závisí na druhu parazita a použitém léčivu (Vaca-Paniagua et al. 2008).

KATALASY (CAT) rozkládají H_2O_2 na molekulární kyslík a vodu bez produkce volných radikálů. Nacházejí se v peroxisomech a v cytosolu. CAT je poměrně unikátním enzymem v rámci rodiny peroxidas, protože kromě katalasové aktivity vykazuje i peroxidasovou aktivitu. Typickými substráty peroxidasové aktivity jsou ethanol, methanol, fenol a další (Wu et al. 2003).



Trojrozměrná struktura CAT byla dobře charakterizována. Jedná se o tetramer, jehož každá podjednotka obsahuje hematin. Některé katalasy jsou schopné vázat NADPH.

Ačkoli katalasová aktivita byla popsána u velkého počtu nematod, identifikováno bylo pouze několik málo nukleotidových sekvencí kódujících tento enzym. Typická aminokyselinová sekvence byla objevena u několika druhů nematod, např. *H. contortus*, *Ascaris suum* a *B. malayi*, v nichž byla zároveň nalezena vysoká enzymová aktivita (Chiumiento a Brushi, 2009).

PEROXIREDOXINY (Prx) jsou poměrně nedávno objevenou skupinou antioxidantních enzymů, které se nacházejí u řady organismů zahrnujících bakterie, prvoky, rostliny, savce i helminty. Hrají roli nejen při udržování redoxní rovnováhy, ale i v signalizaci, regulaci transkripce a apoptózy, dále ovlivňují fosforylaci proteinů. Tyto enzymy z rodiny peroxidas katalyzují redukci 1) H_2O_2 na vodu, 2) hydroperoxidů (ROOH) na odpovídající alkoholy a vodu a 3) peroxynitritu na nitrit a vodu. Jako donor elektronů využívají thioredoxin (Trx). Prx pro svou katalytickou aktivitu nepotřebují prostetické skupiny, kovy či koenzymy. Strukturní klasifikace je založena na tom, zda pro katalýzu využívají jeden (1-Cys Prx) či dva (2-Cys Prx) cysteiny. Skupina 2-Cys Prx ještě může být rozdělena na typické a atypické 2-Cys Prx (Sayed a Williams, 2004; Vaca-Paniagua et al. 2008).

Vzhledem k poměrně nízké aktivitě GPx a CAT u helmintů se předpokládá, že Prx hrají velice důležitou roli v jejich obraně vůči oxidačnímu stresu vyvolanému hostitelským imunitním systémem a že jsou u helmintů hojně rozšířené. Prx byly charakterizovány u řady parazitů, např. u *E. granulosus* a *E. multilocularis*, *O. volvulus*, *B. malayi*, *D. immitis*. U rodu *Taenia* jsou exprimovány 2-Cys Prx. Enzymy u *S. mansoni* a *F. hepatica* vykazují podobnou strukturu jako jejich savčí homology. Prx se u parazitů vyskytují v průběhu celého životního cyklu s lokalizací v různých tkáních (kutikula, hypodermis, děloha, střevo) (Henkle-Dührsen a Kampkötter, 2001; Vaca-Paniagua et al. 2008).

THIOREDOXIN-GLUTATHIONREDUKTASA (TGR) je selenoenzym, který je specifický pro platyhelmintry, tj. motolice a tasemnice. Ve většině ostatních organismů existují dva nezávislé systémy, jeden založený na glutathionu (GSH), druhý na thioredoxinu (Txr). Oba systémy v čele s dvěma enzymy – Txr reduktasou (TxrR) a GSH reduktasou (GR) se účastní přenosu redukčních ekvivalentů z NADPH na cílové struktury prostřednictvím dithiol-disulfidových reakcí. GR redukuje oxidovaný glutathion (GSSG), TxrR udržuje v redukovaném stavu Txr, nutný pro funkci peroxiredoxinů (viz výše). GSH a redukovaný Txr pak slouží jako donory elektronů pro další substráty. U platyhelmintů zajišťuje redukční ekvivalenty pro oba zmíněné

systemy místo GR a TxrR jediný enzym, a to TGR. Tento homodimerní enzym obsahuje TxrR a glutaredoxinovou doménu.

Jelikož TGR u hostitelů chybí, je slibným cílem pro vývoj nových léčiv. TGR je důležitým enzymem pro udržení redoxní homeostázy, obranu proti oxidačnímu stresu a dodávání elektronů pro syntézu deoxyribonukleotidů. TGR byla popsána u echinokoků, schistosom, motolice jaterní. Analýza genomů a transkriptomů však naznačuje přítomnost TGR u všech parazitických plochých červů. (Otero L. et al. 2010). Thioredoxinový systém se může podílet na vzniku rezistence u helmintů. U *H. contortus* rezistentního na ivermektin byla zjištěna zvýšená exprese Txr. Kromě této přímé spojitosti hraje thioredoxinový antioxidační systém roli v regulaci exprese ABC transportních proteinů, čímž rovněž může přispívat k rezistenci (James et al. 2009).

2.6.2.2 Biotransformace anthelmintik cestou oxidace

Helminti mohou metabolizovat svými oxidačními enzymy několik anthelmintik. Doposud byla prokázána oxidace albendazolu (ABZ), triklabendazolu (TCBZ) a moxidektinu.

Oxidace albendazolu (ABZ) byla detekována u *F. hepatica*, *M. expansa*, *A. suum*, *H. contortus* a *D. dendriticum*. Metabolická aktivita se však liší mezi jednotlivými druhy helmintů. První fáze oxidace ABZ, sulfoxidace ABZ za vzniku albendazolsulfoxidu (ABZ.SO), byla pozorována *in vitro* u *D. dendriticum* (mikrosomální a mitochondriální frakce), dále u *F. hepatica*, *M. expansa*, *A. suum* (mikrosomální a cytosolická frakce). *Ex vivo* byl sulfoxid tvořen u *D. dendriticum* a *H. contortus*. Druhý krok metabolismu ABZ, oxidace ABZ.SO na odpovídající sulfon (ABZ.SO₂), byl zaznamenán u *D. dendriticum* (mitochondrie) a *F. hepatica* (mikrosomy a cytosol). Tento fakt představuje první informaci o schopnosti helmintů přeměnit ABZ na neúčinný metabolit. V *ex vivo* experimentech však sulfonace nebyla prokázána (Cvilink et al. 2009).

Schopnost oxidovat TCBZ na triklabendazolsulfoxid (TCBZ.SO) byla popsána u *F. hepatica*. U tohoto druhu dochází rovněž k intenzivní sulfonaci za vzniku triklabendazolsulfonu (TCBZ. SO₂). Tento obranný mechanismus proti účinku TCBZ je považován za jeden z mechanismů vzniku rezistence *F. hepatica* vůči TCBZ. Metabolizace TCBZ na sulfoxid i sulfon je značně vyšší u rezistentních kmenů. Použití metabolických inhibitorů odhalilo, že FMO jsou důležitějšími enzymy v konverzi TCBZ než CYP. Metimazol, specifický inhibitor FMO, snižoval sulfoxidaci TCBZ

výrazněji u rezistentních kmenů, zatímco inhibitor CYP (piperonylbutoxid) měl menší efekt a inhibice byla stejná u obou kmenů (Brennan et al. 2007).

H. contortus metabolizuje léčivo moxidektin, jehož oxidace se účastní CYP (Cvilink et al. 2009).

2.6.2.3 Redukční a hydrolytické enzymy

Reduktasy a hydrolasy byly po mnoho let považovány za nejdůležitější biotransformační enzymy u helmintů.

Redukce je hlavní metabolickou cestou pro sloučeniny nesoucí karbonylovou skupinu. Reduktasy a dehydrogenasy karbonylu jsou řazeny do tří nadrodin:

- Dehydrogenasy/ reductasy s krátkým řetězcem
- Dehydrogenasy/ reductasy se středně dlouhým řetězcem
- Aldo-ketoreduktasy (AKR)

Homogenát tasemnice *H. diminuta* redukuje řadu aldehydů (acetaldehyd, glyceraldehyd, p-nitrobenzaldehyd) za účasti NADPH. Avšak redukce ketonů nebyla prokázána (Munir a Barret 1985). Metabolizace látek, které slouží jako modelové substráty enzymů redukujících karbonyl, byla zkoumána u *H. contortus*. V subcelulárních frakcích byla prokázána biotransformace acenaftenolu (substrát pro AKR1C), 4-pyridinkarboxaldehydu (substrát pro AKR1C, 1A1 a 3 α -hydroxysteroiddehydrogenasu - 3 α -HSD), daunorubicinu (substrát pro AKR1A), naloxonu (substrát pro AKR1C1, 1C2, 1C4), metyraponu (substrát pro AKR 1C, 1A, CBR a 11 β -HSD), D,L-glyceraldehydu (substrát pro AKR1A a CBR) a oracinu (AKR1C, 1B10 a 11 β -HSD) (Cvilink et al. 2008b). Specifické aktivity u *H. contortus* byly podobné aktivitám nalezeným u hospodářských zvířat. Protože redukce karbonylové skupiny převážně sloučeninu deaktivuje, mohou redukční enzymy parazita bránit proti působení xenobiotik (Szotáková et al. 2004).

Redukce je také významnou cestou biotransformace pro azo a nitrosloučeniny. Tento typ reakcí byl detekován u několika parazitických druhů. *A. lumbricoides* a *M. expansa* redukují aromatické nitrosloučeniny, azobenzen, azobarviva a sulfoxidy. Homogenát *H. diminuta* byl schopný redukovat azo sloučeniny, ale ne nitrosloučeniny.

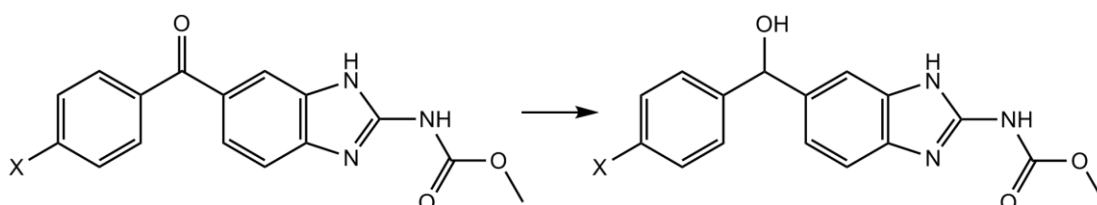
Hydrolyza, jako jedna z reakcí 1. fáze biotransformace, probíhá u esterů, amidů a cyklických sloučenin. U helmintů bylo nalezeno široké spektrum hydrolas a esteras.

Homogenát *H. diminuta* hydrolyzuje organické fosfáty, sulfáty a estery. *A. lumbricoides* a *M. expansa* jsou dobře vybaveni esterasami schopnými katalyzovat hydrolýzu řady sloučenin. Hydrolasy mohou štěpit rovněž konjugáty vytvořené v 2. fázi biotransformace. *H. diminuta* může k tomuto účelu využívat glukosidasy, mannosidasy a galaktosidasy. Stejně jako *M. expansa* a *A. lumbricoides* vykazuje také N-deacetylasovou aktivitu (Cvilink et al. 2009).

2.6.2.4 Biotransformace anthelmintik cestou redukce

Vzhledem k tomu, že benzimidazolová léčiva FLU a MBZ obsahují ve své struktuře karbonylovou skupinu, jsou ideálními substráty pro enzymy redukující karbonyl. Redukce těchto struktur je znázorněna na Obr. 5.

Biotransformace MBZ cestou karbonylové redukce a karmabátové hydrolýzy probíhá *in vitro* u *A. suum* (Cvilink et al. 2009). FLU podléhá redukci u *H. contortus* a *M. benedeni*. V případě ABZ, respektive jeho sulfoxidu ABZ.SO, může docházet ke zpětné konvezi sulfoxidu na ABZ. Tato redukční reakce se objevuje u *M. expansa*, avšak ne u dalších zkoumaných druhů (*D. dendriticum*, *F. hepatica*) (Cvilink et al. 2009). Rozšíření znalostí o redukci anthelmintik u dalších druhů helmintů přináší tato disertační práce.



Obr. 5: Redukce FLU (X = F) a MBZ (X = H).

2.6.2.5 Konjugační enzymy

Konjugační enzymy zodpovídají za 2. fázi biotransformace xenobiotik. Jedná se o různé transferasy nacházející se hlavně v cytosolu či mikrosomech. Vzniklé konjugáty jsou většinou hydrofilnější a snadněji eliminovatelné z organismu. Konjugací téměř vždy dochází ke snížení biologické aktivity a toxicity. Typ konjugace závisí hlavně na struktuře sloučeniny. Mezi jednotlivými organismy existují velké rozdíly v zastoupení i aktivitě konjugačních enzymů, proto se u různých species mohou nacházet různé konjugáty téhož xenobiotika (Skálová a Boušová, 2011).

Ačkoli druhá fáze biotransformace zahrnuje celou řadu reakcí (glukuronidace, sulfonace, methylace, acetylace, glukosidace, konjugace s glutathionem a aminokyselinami), u helmintů byla doposud pozornost věnována převážně jen **glutathion-S-transferasám (GST)**. Tato nadrodina katalyzuje konjugaci endogenních a xenobiotických substrátů s glutathionem (GSH). GST kromě konjugace ochraňují tkáň před oxidačním poškozením reaktivními peroxidy (peroxidasová aktivita), navazují potenciálně toxické látky a účastní se nekatalytického intracelulárního transportu hydrofobních látek (Cvilink et al. 2009). Zvýšené odstraňování volných radikálů prostřednictvím zvýšených hladin glutathionu může snížit cytotoxickou aktivitu látek, včetně léčiv. Byla zkoumána role systému založeného na GSH v lékové rezistenci červů. Například *H. contortus* rezistentní vůči kambendazolu vykazoval vyšší aktivitu GST než senzitivní kmen. V jiné studii byla zvýšena citlivost rezistentních červů k thiabendazolu podáním inhibitoru syntézy GSH, což dokazuje souvislost GSH s rezistencí k benzimidazolům (James et al. 2009).

GST byly nalezeny u mnoha druhů helmintů. Mezi jednotlivými druhy se GST liší substrátovou specifitou, katalytickou aktivitou a vykazují nízkou sekvenční podobnost mezi sebou i se savčími enzymy. Enzymová aktivita se liší mezi jednotlivými skupinami helmintů, s nejvyššími aktivitami u tasemnic a relativně nízkými aktivitami u hlístic. Rovněž lokalizace GST je u různých druhů variabilní. Aktivita GST může být indukována působením chemických látek, včetně léčiv a metabolitů vzniklých oxidačním stresem. Inhibice aktivity některých parazitických GST byla pozorována při použití anthelmintik bithionolu, hexachlorofenu, ABZ, MBZ. Ačkoli existuje řada GST inhibitorů, zatím nebyl nalezen žádný inhibitor selektivní pouze pro parazity.

GST byly detailně charakterizovány např. u *F. hepatica*, *Schistosoma spp.*, *A. lumbricoides* a *A. suum*, *O. volvulus*. U *H. diminuta*, stejně jako u *M. expansa*, byly izolovány 4 formy GST. K dalším parazitům, u nichž byly GST prostudovány, patří *Paragonimus westermani*, *B. malayi*, *W. bancrofti*, *Echinococcus spp.*, *Clonorchis sinensis* a *H. contortus*.

Výrazná antioxidační aktivita GST byla nalezena u *M. expansa* s účinkem proti produktům lipidické peroxidace. Řada GST helmintů se účastní syntézy prostaglandinů, a tím zajišťuje nástroj pro boj s imunitním systémem hostitele. Prostaglandin synthetasová/ isomerasová aktivita GST s lokalizací na rozhraní hostitel-parazit jako součást sekrečně exkrečních produktů pomáhá přežít parazitovi v hostiteli.

Ačkoli je přítomnost ostatních konjugačních enzymů u helmintů předpovězena na základě sekvenace genomu *C. elegans*, na úrovni mRNA a fenotypu byly tyto enzymy zaznamenány sporadicky. Většina objevených konjugačních reakcí se navíc týká převážně metabolismu fyziologických sloučenin a ne xenobiotik. U nematoda *Brugia pahangi* byla popsána **N-acetylace** biogenních aminů. Tato reakce vyžaduje dodání acetylkoenzymu A (AcCoA). Cytosolický enzym, který v přítomnosti AcCoA katalyzuje acetylaci diaminů, byl izolován z *A. suum*. N-acetylační reakce byly popsány i u *F. hepatica* a *O. volvulus*. *S. mansoni* využívá **sulfotransferasovou aktivitu**, která hraje roli v aktivaci oxamnichinu. Naopak *H. diminuta* není sulfonace schopná.

V poslední době narůstají důkazy o důležitosti **UDP-glukosyltransferasy**. Konjugace s glukózou jako detoxikační mechanismus u helmintů byl poprvé popsán u *A. suum* a *Parascaris equorum*, kteří vytvářeli glukózové konjugáty ekdysteroidů (Cvilink et al. 2009). Význam konjugace s glukózou byl potvrzen i u *H. contortus* (Cvilink et al. 2008a), a to v souvislosti s metabolismem anthelmintik.

2.6.2.6 Konjugace anthelmintik

Ačkoli znalosti o GST helmintů jsou poměrně bohaté, jejich účast na metabolismu léčiv u helmintů stále prokázána nebyla. Ale předpokládá se, že GST mají potenciál podílet se na snižování toxicity anthelmintik prostřednictvím vazby na léčivo či konjugace s GSH. Navázání GST proteinů na léčivo může vést k inaktivaci farmakologicky aktivních látek. Navzdory údajům o vazbě GST na anthelmintika a evidenci o konjugaci řady xenobiotik s glutathionem se zdá, že běžná anthelmintika nejsou vhodnými substráty pro GST helmintů (Cvilink et al. 2009).

Dostupné údaje ukazují, že z konjugačních reakcí má pro biotransformaci léčiv u helmintů význam konjugace s glukózou. *H. contortus* konjuguje s glukózou anthelmintika ABZ, FLU a redukovaný FLU. Jiné metabolity druhé fáze nebyly u vlasovky nalezeny. Konjugace s glukózou byla popsána u řady živočichů a rostlin, ale ve srovnání s ostatními konjugačními reakcemi není považována za hlavní cestu metabolizace xenobiotik. Výsledky získané u *H. contortus* jsou však prvním důkazem, že konjugace s glukózou představuje důležitou metabolickou dráhu benzimidazolových anthelmintik u helmintů (Cvilink et al. 2008a).

Jelikož více informací o konjugaci anthelmintik u parazitických červů není k dispozici, bylo naším cílem tyto nedostatečné údaje obohatit.

2.6.3 Transport xenobiotik

Transportéry jsou membránově vázané proteiny, které přenášejí látky přes lipidovou dvojvrstvu. Představují důležitý nástroj pro odstraňování xenobiotik z těla. Jsou rozlišovány dva hlavní typy transportérů: transportéry přenášející xenobiotika dovnitř buňek a transportéry exportující cizorodé látky či jejich metabolity ven z buňky. Druhý typ transportérů byl studován intenzivněji vzhledem k jejich roli v lékové rezistenci.

Nejdůležitější rodinou exportních transportérů jsou ABC transportéry („ATP-binding cassette transporters“), které po vazbě ATP mění svou konformaci, což vede k přenosu substrátu. Po hydrolyze ATP se obnovuje původní konformace transportéru. V eliminaci xenobiotik zprostředkovávají ABC transportéry aktivní eflux jak lipofilních látek, tak i hydrofilních metabolitů a konjugátů, vzniklých činností biotransformačních enzymů (Cvilink et al. 2009).

2.6.4 Transportní proteiny helmintů

Nejvíce zkoumaným ABC transportérem je **P-glykoprotein** (P-gp; ABCB1), známý též jako produkt jednoho z „multidrug resistance protein“ (MDR1) genů. Dalšími transportéry z ABC rodiny, které jsou důležité pro eflux anthelmintik a hrají roli v interakcích mezi léčivem a parazitem, jsou **BCRP** („breast cancer resistant protein“; ABCG2), **MRP1** („multidrug resistance associated protein 1“; ABCC1), **MRP2** (multispecifický transportér organických aniontů – cMOAT; ABCC2). V helmitech bylo nalezeno okolo 60 ABC transportérů (Alvarez et al. 2006).

První P-gp u helmintů byl popsán v modelové hlístici *C. elegans*. Genové databáze ukazují, že genom *C. elegans* obsahuje 14 P-gp homologů, z nichž jeden může být pseudogen. Velký počet P-gp genů ve srovnání s lidským genomem zřejmě odráží potřebu hlístice ochránit se před toxiny vnějšího prostředí. Avšak detailně charakterizovány byly pouze dva geny: *pgp1* a *pgp3*. P-gp se nachází v exkrečních a střevních buňkách a v jícnu. Elektronová mikroskopie, jíž byla studována subcelulární lokalizace, odhalila, že P-gp 3 je lokalizován na apikální membráně exkrečních a střevních buněk, zatímco P-gp 1 se nachází pouze ve střevních buňkách. V jícnu byly detekovány všechny formy P-gp.

Z parazitických helmintů byly ABC proteiny nalezeny nejdříve u plochých červů. U *S. mansoni* byly identifikovány dva P-gp geny. Jeden protein má 12

transmembránových domén a dvě domény vázající ATP. Druhý s pouze 6 transmembránovými doménami a jedinou doménou vázající ATP vykazuje silnou homologii se savčím P-gp, avšak strukturně se více podobá prokaryotním ABC proteinům. ABC transportér byl popsán i u *F. hepatica*, a s největší pravděpodobností se též jedná o P-gp. U *E. granulosus* byl identifikován další ABC transportér, jehož homologie s P-gp je ale nízká (Kerboeuf et al. 2003). Kumkate se spolupracovníky (2008) dokumentoval u *F. gigantica* přítomnost P-gp, MRP1 a BCRP a jejich možnou roli v exportu anthelmintik.

K nematodům, jimž byla věnována největší pozornost v souvislosti s P-gp a jeho rolí pro vznik rezistence, patří *H. contortus*. Analýza sekvencí genomu odhalila, že *H. contortus* vlastní přinejmenším 7 genů pro P-gp. P-gp A či jiné isoformy jsou u tohoto parazita lokalizovány podél trávicí trubice s nejintenzivnějším umístěním v oblasti jícnu a přední části střeva. *Z. O. volvulus* byly izolovány dva P-gp geny (či geny podobné P-gp). U nematod byly také na rozdíl od plochých červů identifikovány geny pro MRP. Ačkoli mohou tyto proteiny hrát významnou roli při vzniku rezistence, doposud jim bylo věnováno jen málo pozornosti (Kerboeuf et al. 2003).

2.6.4.1 Anthelmintika jako substráty ABC transportérů

Byla prokázána přímá a specifická interakce ABC transportérů s benzimidazolovými anthelmintiky, jejímž prostřednictvím buňky s mnohočetnou lékovou rezistencí akumulují ve srovnání s citlivými buňkami méně benzimidazolů. Navíc benzimidazoly byly vůči citlivým buňkám více toxické. Tato fakta naznačují, že benzimidazoly jsou substrátem pro P-gp. ABZ.SO a oxfendazol (OXF; sulfoxidový derivát fenbendazolu - FBZ) jsou efektivně transportovány myším Bcrp1, mírně lidským BCRP, avšak ne P-gp a MRP2. OXF je též schopný inhibovat Bcrp1/BCRP. U parentních léčiv ABZ a FBZ nebyl *in vitro* prokázán transport pomocí Bcrp1, MRP2 a P-gp. Skutečnost, že ABZ neinteraguje s P-gp a BCRP, ačkoli ABZ.SO je přenášen BCRP, vede k myšlence, že atom síry ve struktuře benzimidazolů a jeho oxidace hrají důležitou roli v interakcích transportérů s léčivem.

Další anthelmintikum, ivermektin, slouží jako substrát P-gp u myši a lidské rezistentní buněčné linie. Vedle ivermektinu byly u potkaních hepatocytů učiněny podobné závěry pro moxidektin, které však na základě dalších studií nejsou průkazné (Alvarez et al. 2006).

2.6.4.2 Transportéry a léková rezistence u helmintů

Ačkoli u helmintů není plně objasněna role transportních proteinů pro vznik lékové rezistence, existuje řada důkazů, že transportéry s rezistencí u helmintů souvisí. Nejčastějším mechanismem, kterým transportéry přispívají ke vzniku rezistence, je jejich zvýšená exprese, čímž dochází ke snižování koncentrace léčiv v buňce. Transport ale může být kromě změněné exprese ovlivněn i specifickým polymorfismem u těchto proteinů (James et al. 2009).

S P-gp souvisí rezistence *F. hepatica* vůči TCBZ. Koncentrace TCBZ a jeho hlavního metabolitu, TCBZSO, je výrazně nižší u TCBZ-rezistentních motolic než u TCBZ-senzitivních (Alvarez et al. 2005). Provedená inhibiční studie s ivermektinem potvrdila, že tento jev je způsoben zvýšenou aktivitou P-gp (Mottier et al. 2006). Na vzniku rezistence se kromě změny v transportu podílí též zvýšená metabolizace TCBZ (viz kap. 2.6.2.2). K rezistenci vůči benzimidazolům může P-gp přispívat i u dalších parazitů. Účast P-gp na benzimidazolové rezistenci byla nepřímo prokázána u *H. contortus* použitím verapamilu. Verapamil funguje jako specifický inhibitor P-gp a jeho účinkem byla zvýšena toxicita thiabendazolu a albendazolu, čímž došlo k částečnému zvrácení rezistence.

V souvislosti s dalšími anthelmintiky byla zvýšená exprese P-gp nalezena u ivermektin-rezistentních jedinců *H. contortus*, u nichž rezistence souvisela i se změnami ve frekvenci alel. Frekvence jedné alely byla zvýšena kromě ivermektin-rezistentních červů i u jedinců s rezistencí na moxidektin. Změněná frekvence alel a zvýšená exprese P-gp byla zaznamenána i u *O. volvulus*. U *S. mansoni* je v některých oblastech zaznamenána nižší účinnost léčby prazikvantelem. Tato rezistence je pravděpodobně spojena se zvýšením ABC transportních proteinů, včetně P-gp a MRP (Alvarez et al. 2006; James et al. 2009; Kerboeuf et al. 2003).

3 CÍLE PRÁCE

Náplní mého doktorského studia bylo zkoumat obranné strategie, jimiž se helminti brání negativnímu působení cizorodých látek, a zejména toxickým účinkům anthelmintických léčiv. V našem projektu jsme se věnovali studiu biotransformačních enzymů, metabolizaci vybraných anthelmintik a jejich transportu u zástupců nejdůležitějších skupin parazitických helmintů.

Jednotlivými cíli našeho projektu bylo:

- 1) U *Dicrocoelium dendriticum*, zástupce motolic,
 - identifikovat metabolity vybraných benzimidazolových anthelmintik
 - studovat oxidativní metabolismus xenobiotik a zhodnotit vliv anthelmintik albendazolu a jeho sulfoxidu na oxidativní metabolismus
 - testovat transport albendazolu a albendazolsulfoxidu do těla motolic i jejich export z těla motolic

- 2) U *Haemonchus contortus*, zástupce hlístic,
 - *in vitro* zhodnotit účinek anthelmintika flubendazolu a jeho metabolitů na vývoj larev
 - studovat aktivitu biotransformačních enzymů a schopnost metabolizovat flubendazol u citlivých a rezistentních kmenů
 - testovat transport flubendazolu do těla i z těla helmintů a zhodnotit rozdíly mezi citlivými a rezistentními kmeny

- 3) U *Hymenolepis diminuta*, zástupce tasemnic,
 - stanovit aktivitu biotransformačních enzymů
 - identifikovat metabolity vybraných benzimidazolových anthelmintik

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 *Dicrocoelium dendriticum*

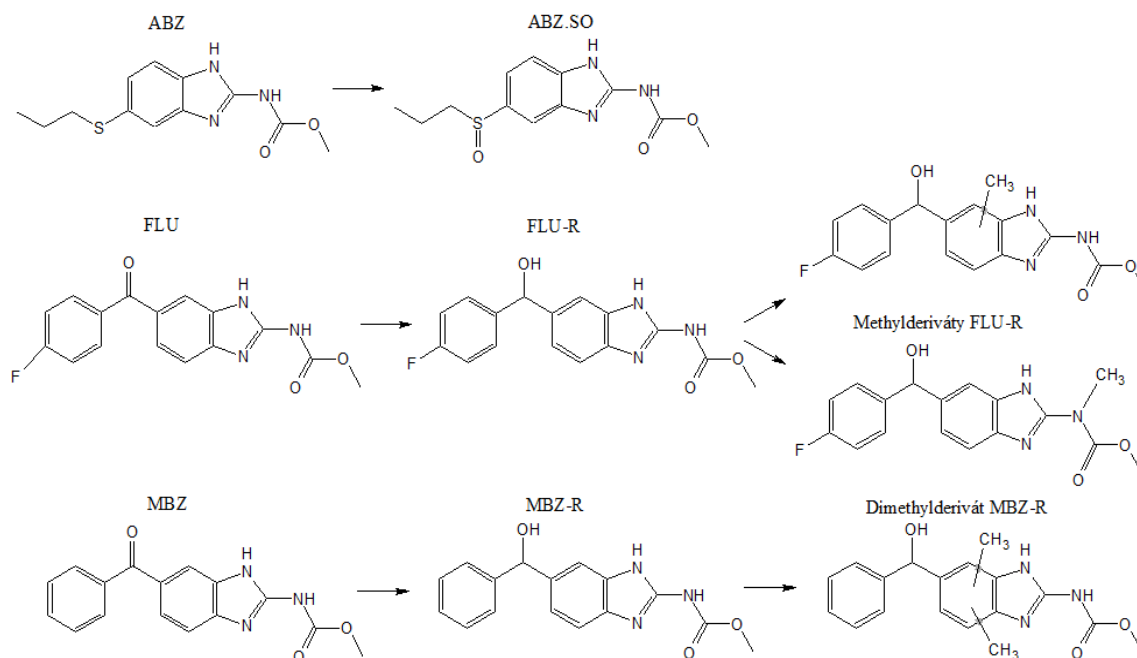
4.1.1 Identifikace metabolitů benzimidazolových anthelmintik

- I. Cvilink V., Szotáková B., Vokřál I., **Bártíková H.**, Lamka J., Skálová L. (2009): Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed *ex vivo* by *Dicrocoelium dendriticum*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 2679-2684

Účinnost anthelmintik používaných pro kontrolu parazitóz je ohrožována vzrůstající rezistencí parazitů k těmto látkám. Ke vzniku lékové rezistence u parazitů mohou přispívat enzymy zodpovědné za biotransformaci léčiv. Identifikace metabolitů umožňuje určit enzymy, které se biotransformace účastní a které mohou mít význam pro rozvoj rezistence. Cílem studie bylo identifikovat metabolity anthelmintických léčiv u *D. dendriticum*, a tím přispět k rozšíření doposud nedostatečných znalostí o metabolismu xenobiotik u parazitických helmintů.

Soustředili jsme se na enzymy, které se zapojují do biotransformace benzimidazolových anthelmintik. Konkrétně byla testována léčiva ABZ, FLU a MBZ. Experiment probíhal *ex vivo*, živé motolice byly inkubovány s anthelmintiky o koncentraci 10 μ M po dobu 24 h. Jejich metabolity 1. a 2. fáze biotransformace byly identifikovány pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).

LC/MSⁿ analýza odhalila jediný metabolit ABZ, a to ABZ.SO. Na rozdíl od experimentu provedeného s parazitem *H. contortus* nebyly detekovány konjugáty s glukózou ani jiné metabolity 2. fáze. FLU v 1. fázi podléhal redukci, redukovaný FLU (FLU-R) byl poté methylován za vzniku dvou derivátů lišících se pozicí methylové skupiny (na benzimidazolovém jádře či v postranním karbamoylovém řetězci). U MBZ, jehož struktura je až na nepřítomnost atomu fluoru identická s FLU, byla očekávána podobná fragmentace molekuly. Stejně jako u FLU i MBZ tvořil redukovaný metabolit (MBZ-R). V souvislosti s 2. fází metabolismu byly ale u MBZ pozorovány rozdíly v methylaci. Vzniklý metabolit byl určen jako dimethylderivát MBZ-R. Struktury identifikovaných metabolitů znázorňuje Obr. 6.



Obr. 6: Přehled biotransformačních cest vybraných anthelmintik u *D. dendriticum* (ABZ, albendazol; ABZ.SO, albendazolsulfoxid; FLU, flubendazol, FLU-R, redukovaný flubendazol; MBZ, mebendazol; MBZ-R, redukovaný mebendazol).

Experimenty této studie potvrdily, že *D. dendriticum* má vlastní enzymový systém, kterým aktivně pozměňuje strukturu a často zbavuje účinku podaná xenobiotika, včetně anthelmintik. Kromě sulfoxidace ABZ a ketoredukce FLU a MBZ byla detekována methylace redukovaných derivátů, která doposud nebyla u žádného helminta pozorována. Konjugace s methylem naznačuje, že enzymový systém motolice je schopný syntetizovat S-adenosylmethionin, nezbytný kofaktor methylace u savců. Methyltransferasy vykazují určitou selektivitu. FLU a MBZ byly methylovány ve velké míře, zatímco ABZ zůstal methyltransferasami nedotčený. Zároveň existují výrazné mezidruhové rozdíly v enzymové výbavě parazitů, protože např. u *H. contortus* je dominantní reakcí 2. fáze konjugace s glukózou (viz kap. 4.2.2).

4.1.2 Oxidativní metabolismus xenobiotik a jeho ovlivnění působením albendazolu a albendazolsulfoxidu

- II. **Bártíková H.**, Vokřál I., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2010): *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*, *Xenobiotica* **40** (9), 593-601

Enzymy metabolizující léčiva nebyly u parazitů příliš zkoumány. A obzvláště oxidačním enzymům nebyla u helmintů po dlouhou dobu přikládána důležitost. V posledních několika letech se však objevily důkazy o oxidativním metabolismu xenobiotik i u helmintů. Na základě našich předchozích experimentů bylo známo, že *D. dendriticum* oxiduje benzimidazolové léčivo ABZ na sulfoxid ABZ.SO a že tedy vlastní enzymovou výbavu umožňující oxidaci xenobiotik. Cílem tohoto projektu bylo nalézt enzymy, které jsou zodpovědné za sulfoxidaci ABZ, a stanovit aktivitu vybraných oxidačních enzymů včetně antioxidačních enzymů, které též mohou parazita ochraňovat před toxickým působením xenobiotik. Dalším dílčím úkolem v rámci této studie bylo zjistit vliv 24h *ex vivo* expozice motolic léčivům (ABZ či ABZ.SO) na oxidaci ABZ a aktivitu zmíněných enzymů, které se mohou účastnit oxidace ABZ či deaktivace reaktivních kyslíkových radikálů.

Aktivita oxidačních enzymů byly měřeny v subcelulárních frakcích odpovídajících mikrosomům, cytosolu a mitochondriím. Byla zjišťována aktivita FMO, ethoxykumarin-O-deethylasy (ECOD), která je připisována aktivitě CYP 1A2 a 2E1, a aktivita enzymů s primární úlohou v obraně proti oxidačnímu stresu (peroxidasa - Px, GPx, CAT, SOD, TxrR a GR). Aktivitu FMO, jejíž stanovení je založeno na oxidaci thiobenzamidu, se nám nepodařilo prokázat, stejně jako aktivitu ECOD. Kromě CAT, která byla nejaktivnější v mikrosomech, byly největší aktivity ostatních antioxidačních enzymů nalezeny v cytosolu.

Vliv ABZ či ABZ.SO na aktivitu biotransformačních enzymů byl zkoumán u motolic, které byly před přípravou subcelulárních frakcí inkubovány *ex vivo* v médiu s těmito léčivy po dobu 24 h. Rozsah změn se lišil v závislosti na subcelulární frakci a použitém léčivu. Px aktivita byla zvýšena po podání obou látek v mikrosomech a cytosolu. ABZ.SO měl podobný účinek na GPx v mitochondriích a mikrosomech.

Aktivita CAT byla lehce zvýšena ve všech frakcích po expozici ABZ. TxrR a SOD nebyly ovlivněny ani jednou látkou.

Biotransformace ABZ byla zjišťována pomocí *in vitro* inkubací subcelulárních frakcí s 10 μM ABZ v přítomnosti NADPH. Farmakologicky aktivní metabolit ABZ.SO byl detekován v mikrosomech a mitochondriích. Druhý metabolit, albendazolsulfon (ABZ.SO₂), byl nalezen pouze ve stopovém množství. Abychom mohli určit, které enzymy se na oxidaci ABZ podílí, prováděli jsme inkubace s relativně specifickými inhibitory oxidačních enzymů o koncentraci 100 μM . Z použitých inhibitorů snižovaly tvorbu ABZ.SO pouze α -naftylthiourea (ANTU) a metimazol (MTZ), inhibitory FMO. Ze stanovených hodnot IC₅₀ vyplývá (Tab. 4), že ANTU byla efektivnějším inhibitorem oxidace ABZ než MTZ. Stejně jako u stanovení enzymových aktivit byl i v případě oxidace ABZ zkoumán vliv předchozí *ex vivo* inkubace živých motolic s ABZ či ABZ.SO. Následné *in vitro* inkubace subcelulárních frakcí z ovlivněných motolic neprokázaly žádný vliv anthelmintik na tvorbu ABZ.SO.

Tab. 4: Hodnoty IC₅₀ pro inhibitory oxidace ABZ na ABZ.SO, α -naftylthioureu (ANTU) a metimazol (MTZ).

IC ₅₀ [μM]		
Inhibitor	Mikrosomy	Mitochondrie
ANTU	0,16	0,24
MTZ	7,54	2,59

Výsledky naší studie rozšířily ne příliš rozsáhlé znalosti o oxidačních enzimech a biotransformaci cizorodých látek cestou oxidace u helmintů. V části projektu, v níž jsme se snažili odhalit enzymy zodpovědné za oxidaci ABZ, byla kromě FMO a CYP, které oxidují ABZ u savců, zvažována i účast dalších oxidačních enzymů. Výsledky získané použitím specifických inhibitorů vedou k závěrům, že ABZ je i u *D. dendriticum* oxidován FMO. Fakt, že se nám nepodařilo stanovit aktivitu FMO vůči thiobenzamidu může souviset s tím, že parazitická FMO není schopna oxidovat tento substrát, či s nižší citlivostí spektrofotometrické detekce thiobenzamid-S-oxidu v porovnání s HPLC analýzou ABZ.SO. Studie s inhibitory přinesla nepřímý důkaz o účasti FMO v oxidaci ABZ. Toto tvrzení podporuje i fakt, že ani předchozí expozice motolic ABZ nebo ABZ.SO neměla na oxidaci ABZ vliv (dle dříve provedených experimentů ABZ ani u jiných species neovlivňuje aktivitu FMO). Zvýšení aktivity

některých dalších testovaných enzymů působením ABZ a hlavně ABZ.SO může souviset s ochranou parazitů proti oxidačnímu stresu způsobenému těmito látkami.

4.1.3 Transport albendazolu a albendazolsulfoxidu

- III. **Bártíková H.**, Vokřál I., Forstová-Křížová V., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2011): The transport of albendazole and albendazole sulfoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*), *Veterinary Parasitology* **176**, 27-33

ABZ je jedním z nejdůležitějších léčiv pro kontrolu dikroceliózy, onemocnění vyvolané *D. dendriticum*. Aby ale ABZ mohl uplatnit svou aktivitu proti motolicím, musí se nejprve do těla parazita dostat. Transport léčiva přes povrchové struktury helmintů je důležitým faktorem pro účinek léčiva, protože helminti obecně přijímají chemické látky svým povrchem. Molekuly léčiv se přes membrány pohybují pasivně nebo specializovaným transportním systémem vyžadujícím energii. Transport léčiv do těla parazitů byl zkoumán u několika druhů helmintů, ne však u *D. dendriticum*. Cílem našeho projektu bylo tedy charakterizovat transport u této motolice. Kromě importu léčiv do těla parazita jsme se zaměřili i na export látek ven z těla, k čemuž bylo nutné zavést novou metodu. Za zkoumaná léčiva jsme zvolili ABZ, používaný k léčbě zvířat nakažených *D. dendriticum*, a ABZ.SO, anthelminticky účinný metabolit, s nímž se motolice ve velké míře setkává v hostitelském organismu.

Motolice izolované z přirozeně nakažených muflonů obecných byly rozděleny do dvou skupin. K rozpoznání příspěvku aktivního transportu byla totiž část experimentu prováděna s mrtvými parazity, které jsme usmrtili působením mrazu. Při studiu transportu do těla motolic jsme živé i mrtvé jedince inkubovali s ABZ či ABZ.SO o koncentraci 1 μM nebo 5 μM . Inkubace probíhala v několika časových intervalech: 1, 15, 30, 45, 60 a 120 min. V experimentech zaměřených na export byly motolice inkubovány 2 h s 5 μM ABZ či ABZ.SO. Po inkubaci byly motolice opláchnuty a vloženy do čistého media bez léčiv. V časových intervalech 1, 60 a 120 min bylo odebíráno médium pro zhodnocení rozsahu exportu. Export léčiv z mrtvých motolic byl proveden stejným způsobem, pouze s usmrcením motolic po 2h inkubaci působením mrazu. Všechny vzorky (médium i homogenát) byly po extrakci analyzovány metodou HPLC.

Výsledky ukázaly, že ABZ byl do motolic transportován ve větším rozsahu než ABZ.SO. U živých motolic vykazovala akumulace léčiv koncentrační a časovou závislost, která spolu s lepším prostupem lipofilnějšího ABZ potvrzuje pasivní

transport. V porovnání s mrtvými jedinci byly ale u živých motolic pozorovány výrazně vyšší koncentrace ABZ, což vedle pasivní difúze naznačuje účast aktivního transportu. Nepřítomnost rozdílů mezi živými a mrtvými parazity u ABZ.SO vede k předpokladu, že transport sulfoxidu se odehrává výlučně pasivní difúzí.

Export léčiv z těl parazitů se zvyšoval s dobou, po kterou motolice setrvaly v médiu bez anthelmintik. U živých jedinců exportované množství ABZ převyšovalo 1,5x množství ABZ.SO. U mrtvých bylo množství obou léčiv srovnatelné, což může být vysvětleno účastí transportérů v exportu ABZ. Skutečnost, že živé motolice transportovaly do media více obou léčiv než mrtvé, potvrzuje aktivní export ABZ a naznačuje aktivní mechanismus exportu i u ABZ.SO.

Výsledky naší studie zabývající se transportem anthelmintik přispěly k rozšíření znalostí o této problematice. Získané informace objasnily mechanismus transportu u dalšího parazita, *D. dendriticum*. Kromě potvrzení důležitosti pasivní difúze v transportu testovaných anthelmintik jsme poukázali na účast aktivního transportu ABZ do těla motolic a aktivního exportu ABZ i ABZ.SO.

4.2 *Haemonchus contortus*

4.2.1 Účinek flubendazolu a jeho metabolitů na vývoj larev

- IV. **Bártíková H.**, Skálová L., Lamka J., Szotáková B., Várady M. (2010): The effects of flubendazole and its metabolites on the larval development of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae): an *in vitro* study, *Helminthologia* **47** (4), 269-272

Benzimidazolové anthelmintikum FLU vykazuje širokospektrou aktivitu vůči endoparazitům. Po podání je FLU rychle biotransformován v gastrointestinálním traktu a v játrech. Plasmatické koncentrace metabolitů u zvířat jsou vyšší než koncentrace parentní látky. Hlavní biotransformační cesty zahrnují redukci ketonové skupiny za vzniku FLU-R a hydrolýzu karbamátové skupiny, jejímž produktem je hydrolyzovaný FLU (FLU-H). Navíc na základě našich studií byla redukce FLU odhalena i u všech testovaných helmintů. Ačkoli je redukce karbonylové skupiny obecně považována za deaktivaci cestu, údaje o anthelmintickém účinku FLU-R nejsou dostupné. Vzhledem k těmto chybějícím informacím byla navržena *in vitro* studie, jejímž cílem bylo srovnání anthelmintického účinku FLU a jeho metabolitů na citlivý a rezistentní kmen *H. contortus* metodou testu vývoje larev (LDT).

Citlivý izolát *H. contortus* je citlivý ke všem třídám anthelmintik, zatímco rezistentní kmen se vyznačuje vícečetnou rezistencí. Infekční L3 larvy v počtu 5-6 tisíc byly použity k nákaze ovcí. Vajíčka pro LDT byla získána z trusu prosíváním třemi sítí s přesně definovanou velikostí ok. LDT je široce používanou metodou pro zjišťování rezistence parazitů vůči léčivům, jejím principem je kultivace vajíček do stadia infekční larvy v přítomnosti různých koncentrací léčiv (Várady et al. 2009). V této studii byl testován vliv FLU (koncentrace 0,0006 - 1,28 µg/ml), FLU-R a FLU-H (0,0065 – 13,31 µg/ml). Thiabendazol (TBZ) o stejných koncentracích jako FLU sloužil jako referenční anthelmintikum. Počet nevyklíhlých vajíček a vylíhlých L1-L3 larev v každé jamce mikrotitrační destičky byl zjišťován inverzním mikroskopem. Výsledky jsou prezentovány jako LC₅₀ a LC₉₉, které odpovídají takovým koncentracím anthelmintik, které inhibují vývoj vajíček na L3 larvy z 50 % či 99 %. Pro zhodnocení účinku anthelmintik jsme použili faktor účinnosti (EF), porovnávající LC hodnoty pro jednotlivá léčiva/metabolity vůči FLU. Stupeň rezistence parazitů je vyjadřován pomocí

faktoru rezistence (RF), který poměruje LC hodnoty rezistentního kmene vůči citlivému.

U citlivého kmene byly LC hodnoty pro FLU srovnatelné s TBZ. Srovnání LC hodnot pro FLU a jeho metabolity ukázalo výrazný rozdíl mezi FLU a FLU-H. Hodnoty EF potvrdily, že FLU-H vykazuje pouze nepatrnou účinnost, která byla několikasetkrát nižší než u FLU. V případě FLU-R byla u rezistentního kmene nalezena 6x nižší a u citlivého kmene 13x nižší aktivita v porovnání s FLU. Z těchto výsledků vyplývá, že FLU-H se chová jako inaktivní produkt biotransformace FLU. U FLU-R je deaktivace pouze částečná a zbytková aktivita tohoto metabolitu může přispívat k celkovému anthelmintickému účinku FLU po jeho podání hospodářským zvířatům. Účinek testovaných látek v závislosti na rezistenci parazita byl analyzován prostřednictvím RF. U rezistentního kmene potvrdily hodnoty RF výraznou rezistenci k TBZ, zatímco rezistence vůči FLU byla nízká a vůči FLU-R ještě nižší (viz Tab. 5). Výsledky této studie naznačují, že TBZ, FLU a FLU-R mají jiný mechanismus účinku či jiné chování (transport, metabolismus) v organismu parazitů.

Tab. 5: Hodnoty faktoru rezistence (RF) pro jednotlivá léčiva. RF vyjadřuje poměr koncentrací LC₅₀ či LC₉₉ pro rezistentní a citlivý kmen.

Léčivo	RF ₅₀	RF ₉₉
Thiabendazol	3,73	153,73
Flubendazol	2,79	2,51
Redukovaný flubendazol	1,40	1,09

Výsledky našeho experimentu rozšířily znalosti o anthelmintické účinnosti metabolitů FLU, kdy FLU-R si zachovává zbytkovou aktivitu a FLU-H je neaktivní. Testování těchto látek na rezistentním a citlivém kmenu poukázalo na to, že FLU může být pro kontrolu rezistentních kmenů *H. contortus* efektivnější než ostatní benzimidazoly. Avšak je třeba mít na paměti, že naše studie byla provedena na larvách, které nejsou hlavním cílem anthelmintické terapie a že získané výsledky je nutné ověřit *in vivo*.

4.2.2 Aktivita biotransformačních enzymů a metabolismus flubendazolu u citlivých a rezistentních kmenů

- V. Vokřál I., **Bártíková H.**, Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubíček V. (2012): The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Parasitology*, přijato k tisku

Rezistence parazita *H. contortus* vůči léčivům je velmi rozšířeným jevem, který značně komplikuje léčbu hemonchózy. Na vzniku rezistence se mohou podílet různé mechanismy. Jedním z nich je zvýšené odbourávání léčiva, za které odpovídají svou činností biotransformační enzymy. Přímá spojitost biotransformačních enzymů s lékovou rezistencí parazitů byla objevena na základě několika studií týkajících se *F. hepatica* a metabolizace TCBZ (Brennan et al. 2007). Tyto studie dokázaly důležitost oxidačních enzymů v lékové rezistenci. Avšak příspěvní dalších biotransformačních enzymů k rezistenci helmintů nebylo zkoumáno a jejich role zůstávala nejasná. Zároveň nebyly dostupné informace o rozdílech v aktivitě biotransformačních enzymů a metabolizaci anthelmintik mezi citlivými a rezistentními kmeny. Tyto skutečnosti nás vedly k navrhnutí studie, v níž jsme mezi jednotlivými kmeny porovnávali aktivitu vybraných biotransformačních enzymů a metabolizaci FLU. Důvod výběru FLU bylo to, že biotransformace FLU u *H. contortus* sestává z redukce karbonylové skupiny a konjugace s glukózou (Cvilink et al. 2008a). Ačkoli FLU není běžně používané léčivo proti hemonchóze, je proti *H. contortus* účinný (viz kap. 4.2.1).

Pro účely naší studie byl použit jeden citlivý kmen (ISE) a tři rezistentní kmeny: ISE-S (rezistentní k ivermektinu), BR (rezistentní k benzimidazolovým anthelmintikům) a WR (kmen vykazující vícečetnou rezistenci k benzimidazolům, ivermektinu, rafoxanidu a klosantelu). Aktivity biotransformačních enzymů byly stanovovány *in vitro* v subcelulárních frakcích z homogenátu těl parazitů pomocí spektrofotometrických metod. Pro detekci metabolitů FLU byly provedeny *ex vivo* i *in vitro* experimenty. Metabolity byly analyzovány metodou HPLC se spektrofluorimetrickou či hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS). V *ex vivo* pokusech byli inkubováni živí červi v médiu s 10 μ M FLU po dobu 24 h. *In vitro* hodnocení metabolitů FLU probíhalo v cytosolické frakci se stejnou koncentrací léčiva

po dobu 30 min. *In vitro* analýza byla doplněna studiem vlivu potenciálních inhibitorů z řad specifických substrátů redukčních enzymů na redukci FLU.

In vitro aktivita biotransformačních enzymů byla stanovena pomocí specifických substrátů. Z enzymů redukujících karbonyl vykazovaly v cytosolické frakci velkou aktivitu reductasy pyridinkarboxaldehydu. Nízké aktivity byly nalezeny pro reductasy naloxonu a metyraponu. Aktivita vůči menadionu nebyla detekována. V aktivitě vůči všem substrátům byly mezi kmeny patrné rozdíly, které však nesledovaly nějaký společný trend. V mikrosomální frakci byla hodnocena aktivita UDP-glukosyltransferasy (UGlcT) vůči modelovému substrátu p-nitrofenolu. Tvorba glukózových konjugátů nebyla prokázána u ISE kmenu, zatímco všechny rezistentní kmeny byly schopné p-nitrofenol konjugovat.

Studium biotransformace FLU v *ex vivo* experimentech odhalilo přítomnost čtyř metabolitů v médiu i homogenátu z červů. FLU-R a glukosid FLU-R představují hlavní metabolity, zatímco dva glukózové konjugáty parentního FLU byly tvořeny v menším rozsahu. Množství FLU-R i všech glukózových konjugátů bylo značně vyšší u rezistentních kmenů než u ISE kmenu. Nejaktivnějším kmenem byl WR kmen, který produkoval přibližně 5x více konjugátů než citlivý ISE kmen. *In vitro* experimenty potvrdily tvorbu FLU-R, ale neukázaly rozdíly mezi kmeny, což může být dáno odlišnými podmínkami *ex vivo* a *in vitro* pokusů (např. satureovaná koncentrace substrátu a NADPH, nepřítomnost regulačních systémů). Testování potenciálních inhibitorů bylo prováděno s cílem odhalit enzymy účastnící se redukce FLU. Menadion (substrát pro CBR) se ukázal jako silný inhibitor, pyridinkarboxaldehyd (substrát pro AKR1A) snižoval tvorbu FLU-R méně. Metyrapon (substrát po AKR1C a CBR) ovlivnil redukci nepatrně jen u WR kmenu a naloxon (substrát pro AKR1C) neměl žádný efekt. Ze získaných výsledků lze usuzovat, že redukce FLU se u *H. contortus* účastní analogy savčí CBR a AKR1A. U WR kmenu pravděpodobně přispívá i enzym podobný AKR1C. Konjugace s glukózou *in vitro* byla sledována jak vůči FLU, tak FLU-R v mikrosomální frakci. Jediným detekovaným metabolitem byl glukosid FLU-R, jehož množství bylo stejně jako v *ex vivo* pokusech vyšší u rezistentních kmenů.

Výsledky této studie ukázaly, že rezistentní kmeny *H. contortus* jsou schopné metabolizovat FLU cestou redukce a konjugace s glukózou ve větší míře než citliví jedinci. Zvýšená aktivita enzymů podílejících se na těchto detoxikačních procesech může parazity ochraňovat před negativním účinkem léčiv, a tak přispívat k lékové rezistenci *H. contortus*.

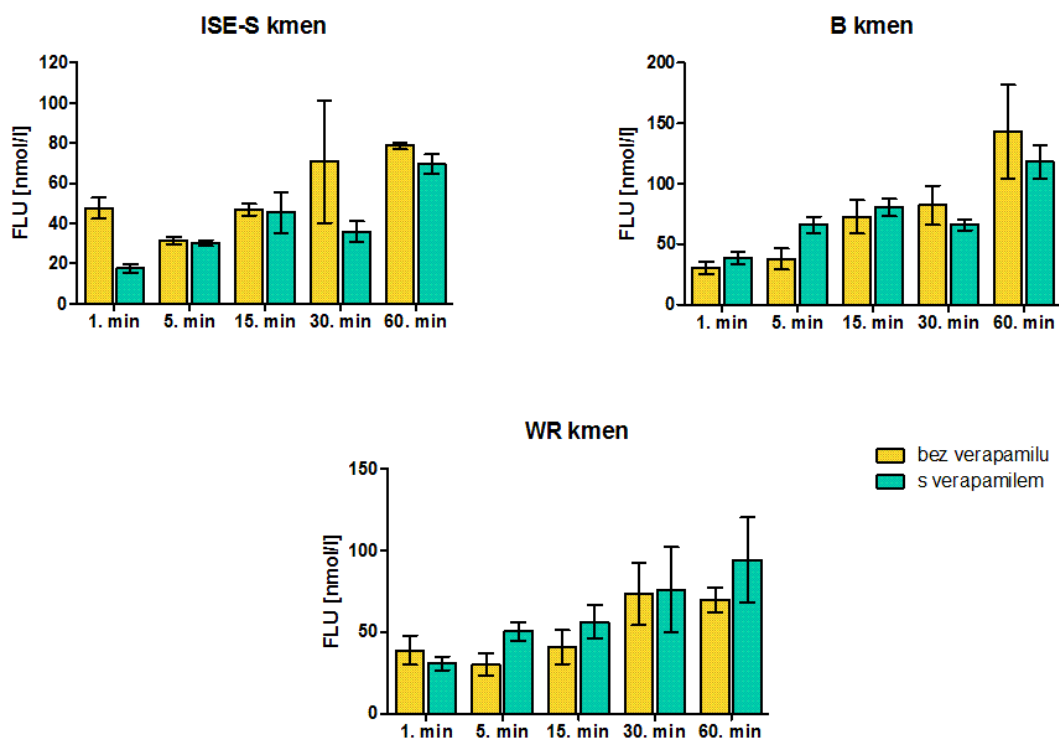
4.2.3 Transport flubendazolu u citlivých a rezistentních kmenů

- VI. **Bártíková H.**, Vokřál I., Kubiček V., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Várady M., Skálová L. (2012): Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Veterinary Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.008>, v tisku

Flubendazol je léčivo s širokým spektrem účinku proti hlísticím a tasemnicím a vysokým potenciálem pro léčbu systémových helmintóz. Aby léčivo mohlo uplatnit svou aktivitu, musí nejdříve dosáhnout místa účinku, v tomto případě tedy proniknout do těla helmintů. Jelikož hlavní cestou je transport povrchem těla helmintů, vlastnosti kutikuly nematod jsou pro terapeutický efekt anthelmintik rozhodující. Molekuly léčiv se přes membrány dostávají pasivním transportem, či je pohyb látek zprostředkován specializovanými proteiny - transportéry, které spotřebovávají při své činnosti energii. U helmintů je pozornost věnována hlavně P-gp patřícímu do rodiny ABC efluxních transportérů. Ačkoli byl již dříve u nematod zkoumán transport několika anthelmintik, informace o transportu FLU nebyly k dispozici. Cílem našeho projektu bylo studium *ex vivo* příjmu FLU do těla a jeho odstraňování ven z těla u *H. contortus* a porovnání výsledků mezi citlivým (ISE) a rezistentními kmeny (ISE-S, BR, WR). Do studie byly zahrnuty experimenty s živými a mrtvými jedinci a byl zkoumán vliv verapamilu (inhibitor P-gp) na akumulaci FLU v těle *H. contortus*.

H. contortus byl izolován z bachoru experimentálně infikovaných ovcí agarovou metodou. Experimenty byly paralelně prováděny u živých i mrtvých jedinců, získaných působením mrazu. Při studiu transportu do těla hemonchů jsme živé i mrtvé jedince rozdělili dále na dvě skupiny: jedna byla inkubována s 5 μ M FLU, druhá s 5 μ M FLU a 50 μ M verapamilem. Inkubace probíhala v několika časových intervalech: 1, 5, 15, 30 a 60 min. V experimentech zaměřených na export byly hlístice inkubovány 2 h s 5 μ M FLU. Po inkubaci byla část červů usmrcena působením mrazu a živí i mrtví jedinci byli dále rozděleni na dvě skupiny. Jedna byla vložena do čistého média bez FLU, druhá do média s 50 μ M verapamilem. V časových intervalech 1, 5, 15, 30 a 60 min bylo odebíráno médium pro zhodnocení exportu léčiva z těl parazitů do média. Všechny vzorky médií i homogenátů byly po extrakci analyzovány metodou HPLC.

Akumulace FLU v těle vlasovek vykazuje časovou závislost. Příjem léčiva se ve všech časových intervalech mezi kmeny nelišil. Rozdíly nebyly pozorovány ani při srovnání živých a mrtvých jedinců. Rovněž použití verapamilu ve snaze odhalit možnou účast P-gp neovlivnilo u žádného testovaného kmene akumulaci FLU. V experimentech zabývajících se exportem léčiva z těl parazitů se uvolňované množství FLU do média bez léčiva zvyšovalo s rostoucím časem. Po 60 min byla do média zpět transportována přibližně šestina akumulovaného množství. Nebyly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými kmeny, ani mezi živými a mrtvými jedinci. U žádného kmene také nebyl prokázán vliv verapamilu na akumulaci FLU. Vliv verapamilu na export FLU z rezistentních kmenů je znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7: Vliv verapamilu na export FLU z rezistentních kmenů *H. contortus* do čistého média po 2h inkubaci jedinců s FLU (5 μ M). Výsledky jsou vyjádřeny jako koncentrace FLU v médiu (nM).

Výsledky naší studie ukazují, že FLU má vysokou schopnost pronikat do těl nematod. Důvodem je pravděpodobně vysoká lipofilita FLU, která je vyjádřena rozdělovacím koeficientem ($\log P$ 3,05) rovněž stanoveným v rámci tohoto projektu. Vysoká lipofilita FLU spolu s nepřítomností rozdílů mezi mrtvými a živými parazity naznačuje, že FLU je transportován pasivní difúzí. Na základě prokázané souvislosti zvýšené exprese P-gp se vznikem rezistence u některých helmintů jsme předpokládali

tento mechanismus i u *H. contortus*. Množství transportovaného FLU se však mezi citlivými a rezistentními jedinci nelišilo a zároveň použití verapamilu účast P-gp v importu ani exportu u žádného kmene nepotvrdilo.

Výsledky této studie potvrzují slibný potenciál FLU pro léčbu hemonchóz, protože *H. contortus* neodstraňuje toto anthelmintikum aktivně ze svého těla, a to ani v případě rezistentních kmenů.

4.3 Hymenolepis diminuta

4.3.1 Aktivita biotransformačních enzymů a metabolismus benzimidazolových anthelmintik

- VII. **Bártíková H.**, Vokřál I., Skálová L., Kubíček V., Fírbasová J., Briestenský D., Lamka J., Szotáková B. (2012): The activity of drug metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011002265>, v tisku

Tasemnice vyvolávají onemocnění, která ohrožují zdraví lidí a hospodářských zvířat. Kontrola cestodóz pomocí anthelmintik ale není účinná ve všech případech. Tasemnice, stejně jako ostatní helminti, se mohou bránit proti toxickým účinkům léčiv a dalších xenobiotik prostřednictvím svých biotransformačních enzymů, které jsou schopné léčivo inaktivovat. Protože informace o enzymech podílejících se na metabolizaci léčiv a o osudu anthelmintik v těle tasemnic nejsou příliš detailní či chybí, rozhodli jsme se znalosti o této problematice rozšířit. Cílem našeho projektu bylo stanovit aktivity biotransformačních enzymů a vysledovat cesty, jakými se metabolizují vybraná anthelmintika, u modelové tasemnice *H. diminuta*. Ve snaze odhalit mezidruhové rozdíly v metabolismu léčiv byly výsledky porovnány s dostupnými údaji pro jiné tasemnice.

V rámci této studie bylo nejprve nutné zavést laboratorní chov tasemnic. Jako mezipřehoditelé, v nichž probíhá vývoj larev, byli zvoleni brouci druhu *Tenebrio molitor*. Dospělé tasemnice, získané ze střev potkanů, byly po opláchnutí buď přímo použity v *ex vivo* experimentech, či byly zpracovány na subcelulární frakce pro *in vitro* pokusy. *In vitro* byla zjišťována aktivita enzymů, jejichž hlavní úlohou je obrana proti reaktivním kyslíkovým radikálům a které se mohou účastnit oxidace xenobiotik (Px, SOD, CAT), enzymů redukcujících karbonyl a konjugačních enzymů (GST, UGT, UglcT). Pro odhalení biotransformačních cest vybraných benzimidazolových anthelmintik (ABZ, ABZ.SO, FLU a MBZ) byly tasemnice inkubovány *ex vivo* i *in vitro*. Metabolity byly poté analyzovány metodou HPLC se spektrofluorimetrickou či hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS). V *ex vivo* pokusech trvajících 24 h byly použity 1 μM a 10 μM koncentrace anthelmintik. *In vitro* byly metabolity detekovány

po inkubaci subcelulárních frakcí se stejnými koncentracemi léčiva po dobu 30 min. Součástí *in vitro* analýz bylo studium kinetiky redukce FLU a MBZ.

Výsledky ukázaly, že *H. diminuta* efektivně redukuje aldehydy a ketony. Byla prokázána aktivita karbonylredukujících enzymů odpovídajících savčí CBR, AKR1A, AKR1C, AKR1B10, 3 α -HSD a 11 β -HSD typu 1. Z anthelmintik podléhají redukci FLU a MBZ. Hodnocení kinetických parametrů ukázalo, že maximální rychlost redukce MBZ je asi 18x větší než u FLU, ale afinita k FLU je vyšší než k MBZ. V porovnání s *H. contortus* probíhá redukce FLU u *H. diminuta* pomaleji a s nižší afinitou enzymů k substrátu (Cvilink et al. 2008b) (Tab. 6).

Tab. 6: Kinetické parametry tvorby FLU-R a MBZ-R po inkubaci cytosolu s různými koncentracemi FLU a MBZ u *Hymenolepis diminuta* a *Haemonchus contortus* (V'_{\max} , zdánlivá maximální rychlost reakce; K'_m , zdánlivá Michaelisova konstanta).

Helmint	Metabolit	V'_{\max} (nM·min ⁻¹)	K'_m (μM)
<i>H. diminuta</i>	FLU-R	1,9 ± 0,2	10,3 ± 2,1
	MBZ-R	34,1 ± 6,7	61,3 ± 14,9
<i>H. contortus</i>	FLU-R	39,8 ± 2,1	1,5 ± 0,3

Ačkoli byla u *H. diminuta* nalezena aktivita několika oxidačních enzymů, anthelmintika ABZ, ABZ.SO podléhající oxidaci u jiných helmintů metabolizována nebyla. Biotransformační cesty pro ABZ se tedy liší mezi helminty, a to i v rámci tasemnic, protože u *M. expansa* byl v *in vitro* pokusech ABZ oxidován (Solana et al. 2001).

Z enzymů 2. fáze biotransformace byla detekována aktivita GST a UGlcT, ne však UGT. Navzdory těmto výsledkům nebylo žádné z testovaných anthelmintik konjugováno s glutathionem či glukózou, což naznačuje, že zkoumaná anthelmintika nejsou vhodným substrátem pro tyto enzymy tasemnice. Další konjugační reakcí je methylace, které u *H. diminuta* podléhal FLU-R. Konkrétně byly nalezeny dva monomethylové deriváty, jeden s methylem na aromatickém kruhu, druhý obsahuje methyl v postranním řetězci. Díky nepřítomnosti methylderivátů ostatních anthelmintik lze usuzovat na vysokou substrátovou selektivitu methyltransferas tasemnice.

H. diminuta, stejně jako ostatní studovaní helminti, vlastní enzymový aparát, který jí pomáhá snižovat negativní působení cizorodých látek, včetně léčiv. *H. diminuta* metabolizuje anthelmintika cestou redukce (FLU, MBZ) a methylace (FLU), ne však

oxidací (ABZ, ABZ.SO) či hydrolyzou (FLU, MBZ). Nalezené biotransformační cesty uplatňující se v přeměně xenobiotik u *H. diminuta* se však liší od metabolismu helmintů z jiných tříd i další tasemnice, *M. expansa*. Výsledky tudíž naznačují, že v metabolismu léčiv existují mezidruhové rozdíly nejen mezi třídami helmintů, ale i mezi příbuznými druhy. Tasemnici *H. diminuta* tedy nelze považovat za ideální modelový organismus pro studium biotransformace léčiv u tasemnic.

5 ZÁVĚR

Studium biotransformace a transportu xenobiotik u helmintů, kterému jsme se věnovali v našich experimentech, rozšířilo stávající znalosti a přineslo nové informace o obraně helmintů proti účinku cizorodých látek, včetně léčiv.

1) *Dicrocoelium dendriticum*

- Prostřednictvím svých biotransformačních enzymů metabolizuje léčiva ze skupiny benzimidazolů (ABZ, FLU, MBZ). FLU a MBZ jsou biotransformovány cestou redukce a následně konjugovány s methylem. Nalezení methylderivátů u *D. dendriticum* je unikátní, protože tento typ reakce nebyl doposud u žádného helminta pozorován.
- Oxidace ABZ potvrdila, že oxidační reakce hrají důležitou roli i u helmintů, ačkoli se původně předpokládal opak. Pokusy navržené k odhalení enzymů, které jsou za oxidaci ABZ zodpovědné, nepřímo dokázaly účast FMO. Dále byl u tohoto parazita zkoumán modulační vliv ABZ a ABZ.SO na aktivitu oxidačních enzymů a oxidaci ABZ. Zatímco oxidace ABZ ovlivněna nebyla, zvýšení aktivity některých oxidačních enzymů může souviset s ochranou parazitů proti oxidačnímu stresu způsobenému těmito látkami.
- Kromě biotransformace léčiv je dalším faktorem ovlivňujícím účinnost léčiva jeho transport do/z těla parazitů. Studium mechanismu transportu ABZ a ABZ.SO potvrdilo důležitost pasivní difúze a poukázalo na účast aktivního transportu ABZ do těla motolic a aktivního exportu ABZ i ABZ.SO.

2) *Haemonchus contortus*

- Má schopnost redukovat FLU a následně konjugovat parentní léčivo i redukovanou formu FLU s glukózou. Redukce FLU může být snížena použitím inhibitorů z řad specifických substrátů redukčních enzymů (menadion, pyridinkarboxaldehyd, u rezistentního WR kmene i metyrapon). Jedinci z rezistentních kmenů vytvářeli prokazatelně větší množství metabolitů FLU než citliví jedinci. Zvýšená aktivita enzymů podílejících se na těchto detoxikačních procesech může parazity ochraňovat před negativním účinkem léčiv, a tudíž přispívat k lékové rezistenci *H. contortus*.

- Naopak výsledky *in vitro* testu vývoje larev naznačují, že FLU může být pro kontrolu rezistentních kmenů *H. contortus* efektivnější než ostatní benzimidazoly. Je však třeba mít na paměti, že účinek FLU byl zkoumán pouze na larvách, ne na dospělcích. Vysoká účinnost FLU na larvy rezistentního kmene může souviset s nižší aktivitou biotransformačních enzymů, podílejících se na metabolismu FLU, u larev než u dospělců.
- Transportní studie neprokázaly přítomnost aktivního transportu FLU do těla parazitů ani aktivního exportu ven z těla nejen u citlivých, ale i rezistentních kmenů. Z toho vyplývá, že změny transportních procesů se u *H. contortus* nepodílí na vzniku lékové rezistence.

3) *Hymenolepis diminuta*

- Je stejně jako ostatní zkoumaní helminti schopná snižovat negativní působení cizorodých látek, včetně léčiv, prostřednictvím vlastního enzymového aparátu. Byla prokázána aktivita oxidačních, karbonylredukujících i konjugačních enzymů.
- Metabolizuje anthelmintika cestou redukce (FLU, MBZ) a methylace (FLU). Ačkoli byla stanovena aktivita některých oxidačních enzymů, oxidace anthelmintik pozorována nebyla. Je tedy zřejmé, že i u helmintů existují mezidruhové rozdíly v biotransformaci anthelmintik, a to nejen mezi třídami helmintů, ale i mezi blízkce příbuznými druhy v rámci jedné skupiny.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ai L., Chen M-X., Alasaad S., Elsheikha H. M., Li J., Li H-L, Lin R-Q, Zou F-C., Zhu X-Q., Chen J-X. (2011): Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola spp.* by molecular approaches, *Parasites & Vectors* **4**, 101-106

Alvarez A. I., Merino G., Molina A. J., Pulido M. M., McKellar Q. A., Prieto J. G. (2006): Role of ABC Transporters in veterinary drug research and parasite resistance, *Current Drug Delivery* **3**, 199-206

Alvarez L. I., Solana H. D., Mottier M. L., Virkel G. L., Fairweather I., Lanusse C. E. (2005): Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes, *Parasitology* **131**, 501–510

Anderson H. R. a Fairweather I. (1995): *Fasciola hepatica*: Ultrastructural changes to the tegument of juvenile flukes following incubation *in vitro* with the deacetylated (amine) metabolite of diamphenethide, *International Journal of Parasitology* **25** (3), 319-333

Angulo-Cubillán F. J., Garcia-Coiradas L., Cuquerella M., de la Fuente C., Alunda J. M. (2007): *Haemonchus contortus* – Sheep relationship: a review. *Revista Científica FCV-LUZ* **17**, 577–587

Barret J. (1998): Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **121** (3), 181-183

Bonilla M., Denicola A. Novoselov S. V., Turanov A. A.m Protasio A., Izmendi D., Gladyshev N., Salinas G. (2008): Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione, *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 17898-17907

Brennan G. P., Fairweather I., Trudgett A., Hoey E., McCoy M., McConville M., Meaney M., Robinson M., McFerran N., Ryan L., Lanusse C., Mottier L., Alvarez L. I.,

- Solana H. D., Virkel G. L., Brophy P. M. (2007): Understanding triclabendazole resistance, *Experimental and Molecular Pathology* **82** (2), 104-109
- Brundson R. V. (1967): The significance of *Nematodirus* in New Zealand, *New Zealand Veterinary Journal* **15** (6), 105-108
- Budke Ch. M., Deplazes P., Torgerson P. R. (1996): Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis, *Emerging infectious diseases* **12** (2), 296-303
- Bush A. O., Fernández J. C., Esch G., Seed R. (2001): *Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal Parasites*, Cambridge: Cambridge University Press, 566
- Campbell B. E., Hofmann A., McCluskey A., Gasser R. B. (2011): Serine/threonine phosphatases in socioeconomically important parasitic nematodes - Prospects as novel drug targets?, *Biotechnology Advances* **29**, 28-39
- Cvilink V., Lamka J., Skálová L. (2009): Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths, *Drug Metabolism Reviews* **41** (1), 8-26
- Cvilink V., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Kostianen R. A. (2008a): LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 337-343
- Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběňová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L. (2008b): Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology* **151**, 242-248
- Dayan A. D. (2003): Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Tropica* **86**, 141-159
- De Silva N. R., Brooker S., Hotez P. J., Montresor A., Engels D., Savioli L. (2003): Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture, *Trends in Parasitology* **19** (12), 547-551

- El-On J., Shelef I., Cagnano E., Benifla M. (2008): *Taenia multiceps*: a rare human cestode infection in Israel, *Veterinaria Italiana* **44** (4), 621-631
- Fairweather I. (2005): Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma, *Journal of Helminthology* **79**, 227-234
- Fernando R. J., Fernando S. S. E, Leong A. S.-Y. (2001): *Tropical infectious diseases: Epidemiology, investigation, diagnosis and management*, London: Greenwich Medical Media, 384
- Ferrari T. C. A. a Moreira P. R. R. (2011): Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis, *The Lancet Neurology* **10**, 853-864
- Gaba S., Ginot V., Cabaret J. (2005): Modelling macroparasite aggregation using a nematode-sheep system: the Weibull distribution as an alternative to the negative binomial distribution?, *Parasitology* **131**, 393-401
- Gasser R. B., Cottee P., Nisbet A. J., Ruttkowski B., Ranganathan S., Joachim A. (2007): *Oesophagostomum dentatum* - Potential as a model for genomic studies of strongylid nematodes, with biotechnological prospects, *Biotechnology Advances* **25**, 281-293
- Hall A., Hewitt G., Tuffrey V., de Silva N. (2008): A review and meta-analysis of intestinal worms on child growth and nutrition, *Maternal & Child Nutrition* **4**(1), 118-236
- Hansen M. F., Kelley G. W., Todd A. C. (1950): Observation on the effects of a pure infection of *Moniezia expansa* on lambs, *Transactions of the American Microscopical Society* **69**(2), 148-155
- Harris N. L. (2011): Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design?, *Trends in Parasitology* **27** (7), 288-293

Henkle-Dührsen K. a Kampkötter A. (2001): Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes, *Molecular & Biochemical Parasitology* **114**, 129–142

Holden-Dye L. a Walker R. J. (2007): Anthelmintic drugs, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>

Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S. M., Hoskin S. O. (2006): The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants, *Trends in Parasitology* **22** (6), 253-261

Hotez P. J., Molyneux D. H., Fenwick A., Ottesen E., Ehrlich Sachs S., Sachs J. D. (2006): Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria, *PLoS Med.* **3**, e102

Husain A. a Scheibel L. W. (2004): Anthelmintic drugs. In: Craig C. R. a Stitzel R. E. (ed.), *Modern pharmacology with clinical applications (Sixth edition)*, Lippincott Williams & Wilkins, 824

Chiumiento L. a Bruschi F. (2009): Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites, *Parasitology Research* **105**, 593-603

Cho S. C., Lee H. L., Lee O. Y., Yoon B. C., Choi H. S., Hahm J. S., Ryu J. S., Ahn M. H. (2009): *Hymenolepis nana* infection of the colon in an adult male, *Gastrointestinal Endoscopy* **70** (4), 784-785

Chowdhury N., Tada I. (2001): *Perspectives on helminthology*, Plymouth: Science Publishers, 531

Ichhpujani R. L., Bhatia R. (2002): *Medical Parasitology (Third Edition)*, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 305

Johnston M. J. G., MacDonald J. A., McKay D. M. (2009): Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules, *Parasitology* **136**, 125-147

Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Schorderet Weber S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A., Mäser P. (2008a): A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes, *Nature* **452**, 176–180

Kaminsky R., Gauvry N., Schorderet Weber S., Skripsky T., Bouvier J., Wenger A., Schroeder F., Desaulles Y., Hotz R., Goebel T., Hosking B. C., Pautrat F., Wieland-Berghausen S., Ducray P. (2008b): Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate, *Parasitology Research* **103** (4), 931-939

Kaplan R. M. (2004): Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report, *Trends in Parasitology* **20** (10), 477-481

Keiser J., Utzinger J., Vennerstrom J. L., Dong Y., Brennan G. P., Fairweather I. (2007): Activity of artemether and OZ78 against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **101**, 1219-1222

Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminsky R., von Samson-Himmelstjerna G. (2003): P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance, *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 332-346

Kim S.-H., Cai G.-B., Bae Y.-A., Lee E.-G., Lee Y.-S., Kong Y. (2009): Two novel phospholipid hydroperoxide glutathioneperoxidase genes of *Paragonimus westermani* induced by oxidative stress, *Parasitology* **136**, 553-565

Kumkate S., Chunchob S., Janvilisri T. (2008): Expression of ATP-binding cassette multidrug transporters in the giant liver fluke *Fasciola gigantica* and their possible involvement in the transport of bile salts and anthelmintics, *Molecular and Cellular Biochemistry* **317**, 77-84

Llaguno M. M., Cortez-Esxcalente J., Waikagul J., Guimaraes Faleiros A. C., das Chagas F., Castro C. (2008): *Diphyllobothrium latum* infection in a non-endemic

country: case report, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41(3)**, 301-303

Li R. W., Li C., Elsasser T. H., Liu G., Garrett W. M., Gasbarre L. (2009): Mucin biosynthesis in the bovine goblet cell induced by *Cooperia oncophora* infection, *Veterinary Parasitology* **165**, 281-289

Le Jambre L. F. (1995): Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep, *International Journal for Parasitology* **25 (3)**, 269-273

MacDonald A. S., Araujo M. I., Pearce E. J. (2002): Immunology of parasitic helminth infections, *Infection and Immunity* **70(2)**, 427-433

Marangi M., Zechini B., Fileti A., Quaranta G., Aceti A. (2003): *Hymenolepis diminuta* infection in a child living in the urban area of Rome, Italy, *Journal of Clinical Microbiology* **41 (8)**, 3994-3995

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

Mas-Coma S., Bargues M. D., Valero M. A. (2005): Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses, *International Journal for Parasitology* **35**, 1255-1278

Matthews B. E. (1998): *An introduction to parasitology*, Cambridge: Cambridge University Press, 204

McConville M., Brennan G. P., Flanagan A., Hanna R. E. B., Edgar W. J., Castillo R., Hernández-Campos A., Fairweather I. (2009): Surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with the experimental fasciolicide, compound alpha, *Parasitology Research* **105**, 757-767

McKay D. M. (2009): The therapeutic helminth?, *Trends in Parasitology* **25 (3)**, 109-114

- McKellar Q. A. a Jackson F. (2004): Veterinary anthelmintics: old and new, *Trends in Parasitology* **20** (10), 456-461
- McNeilly T. N., Devaney E., Matthews J. B. (2009): *Teladorsagia circumcincta* in the sheep abomasum: defining the role of dendritic cells in T cell regulation and protective immunity, *Parasite Immunology* **31**, 347-356
- Miller J. E. a Horohov D.W. (2006): Immunological aspects of nematode parasite control in sheep, *Journal of Animal Science* **84** (E. Suppl.), E124-E132
- Molento M. B. (2011): State-of-the-art of parasite resistance of ruminant hosts. In: de Almeida Regitano L. C. et al. (ed.), *Advances in the knowledge of parasite resistance of ruminant hosts and parasites: Proceedings of the São Paulo Advances School of Science* (First edition), São Paulo: Embrapa Pecuária Sudeste, 133
- Moreau E. a Chauvin A. (2010): Immunity against helminths: Interaction with the host and the intercurrent infections, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, ID 428593, 9 stran
- Mottier M. L., Alvarez L. I., Fairweather I., Lanusse C. E. (2006): Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect, *Journal of Parasitology* **92** (6), 1355-1360
- Muller R. (2002): *Worms and Human Disease*, New York: CABI Publishing, 300
- Munir W. A. a Barrett J. (1985). The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae), *Parasitology* **91**, 145–156
- Naem S. (2007): Morphological differentiation among three *Thelazia* species (Nematoda: Thelaziidae) by scanning electron microscopy, *Parasitology Research* **101**, 145-151
- Northrop-Clewes Ch. A. a Shaw Ch. (2000): Parasites, *British Medical Bulletin* **56** (1), 193-208

Osada Y. a Kanazawa T. (2010): Parasitic helminths: New weapons against immunological disorders, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, ID 743758, 9 stran

Otero L., Bonilla M., Protasio A. V., Fernandez C., Gladyshev V. N., Salinas G. (2010): Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths, *BMC Genomics* **11**, 237-249

Otranto D. a Traversa D. (2002): A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment, *Veterinary Parasitology* **107 (4)**, 317-335

Otranto D. a Traversa D. (2003): Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease, *Trends in Parasitology* **19 (1)**, 12-15

Paris L., Thellier M., Faussart A., Danis M. (2007): World epidemiology of parasitic diseases, *La Revue du praticien* **57(2)**, 131-136

Perry B. D. a Randolph T. F. (1999): Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals, *Veterinary Parasitology* **84**, 145-168

Piedrafita D. M, Spithill T. W., Smith R. E., Raadsma H. W. (2010): Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology, *Parasite Immunology* **32**, 572-581

Riviere J. E. a Papich M. G. (2009): *Veterinary pharmacology and therapeutics (Ninth edition)*, Ames: John Wiley and Sons, 1524

Sargison N. D. (2011): Pharmaceutical control of endoparasitic helminth infection in sheep, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **27**, 139-156

Sayed A. A. a Williams D. L. (2004): Biochemical Characterization of 2-Cys Peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*, *The Journal of Biological Chemistry* **279** (25), 26159-26166

Skálová L. a Boušová I. (ed.) (2011): *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Praha: Karolinum, 162

Solana H. D., Rodriguez J. A., Lanusse C. E. (2001): Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites, *Parasitology Research* **87**, 275-280

Stear M. J., Bishop S. C., Henderson N. G., Scott I. (2003): A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*, *Animal Health Research Reviews* **4** (1), 45-52

Szotákova B., Baliharová V., Lamka J., Nožinová E., Wsól V., Velík J., Machala M., Neča J., Souček P., Šusová S., Skálová L. (2004): Comparison of *in vitro* activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat, and sheep, *Research in Veterinary Science* **76**, 43–51

Tena D., Pérez Simón M., Gimeno C., Pérez Pomata M. T., Illescas S., Amondarain I., González A., Domínguez J., Bisquert J. (1998): Human infection with *Hymenolepis diminuta*: Case report from Spain, *Journal of Clinical Microbiology* **36** (8), 2375-2376

Vaca-Paniagua F., Torres-Rivera A., Parra-Unda R. Landa A. (2008): *Taenia solium*: Antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **8**, 393-399

Várady M., Čorba J., Letková V., Kováč G. (2009): Comparison of two versions of larval development test to detect anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology* **160** (3-4), 267-271

Volf P., Horák P. (2007): *Paraziti a jejich biologie*, Praha: Triton, 318

Waller P. J. (1997): Sustainable helminth control of ruminants in developing countries, *Veterinary Parasitology* **71**, 195-207

Wiwanitkit V. (2004): Overview of *Hymenolepis diminuta* infection among Thai patients, *Medscape General Medicine* **6 (2)**, 7

Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N. C. (2004): Drug resistance in veterinary helminths, *Trends in Parasitology* **20 (10)**, 469-476

Wu M., Lin Z., Wolbeis O. S. (2003): Determination of the activity of catalase using a europium (III)-tetracycline-derived fluorescent substrate, *Analytical biochemistry* **320**, 129 – 135

http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index.html - 28.11.2011

7 PŘÍLOHY

7.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce

- I. Cvilink V., Szotáková B., Vokřál I., **Bártíková H.**, Lamka J., Skálová L. (2009): Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed *ex vivo* by *Dicrocoelium dendriticum*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 2679-2684
- II. **Bártíková H.**, Vokřál I., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2010): *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*, *Xenobiotica* **40** (9), 593-601
- III. **Bártíková H.**, Vokřál I., Forstová-Křížová V., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2011): The transport of albendazole and albendazole sulphoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*), *Veterinary Parasitology* **176**, 27-33
- IV. **Bártíková H.**, Skálová L., Lamka J., Szotáková B., Várady M. (2010): The effects of flubendazole and its metabolites on the larval development of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae): an *in vitro* study, *Helminthologia* **47** (4), 269-272
- V. Vokřál I., **Bártíková H.**, Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubiček V. (2012): The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Parasitology*, přijato k tisku
- VI. **Bártíková H.**, Vokřál I., Kubiček V., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Várady M., Skálová L. (2012): Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics,

Veterinary Parasitology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.008>,
v tisku

- VII. Bártíková H.**, Vokřál I., Skálová L., Kubíček V., Firbasová J., Briestenský D., Lamka J., Szotáková B. (2012): The activity of drug metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011002265>, v tisku

7.1.1 Publikace I

- I. Cvilink V., Szotáková B., Vokřál I., **Bártíková H.**, Lamka J., Skálová L. (2009): Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed *ex vivo* by *Dicrocoelium dendriticum*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 2679-268

7.1.2 Publikace II

- II.** **Bártíková H.**, Vokřál I., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2010): *In vitro* oxidative metabolism of xenobiotics in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) and the effects of albendazole and albendazole sulphoxide *ex vivo*, *Xenobiotica* **40** (9), 593-601

7.1.3 Publikace III

- III. Bártíková H., Vokřál I., Forstová-Křížová V., Skálová L., Lamka J., Szotáková B. (2011):** The transport of albendazole and albendazole sulphoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*), *Veterinary Parasitology* **176**, 27-33

7.1.4 Publikace IV

- IV.** **Bártíková H.**, Skálová L., Lamka J., Szotáková B., Várady M. (2010): The effects of flubendazole and its metabolites on the larval development of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae): an *in vitro* study, *Helminthologia* **47** (4), 269-272

7.1.5 Publikace V

- V. Vokřál I., **Bártíková H.**, Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubíček V. (2012): The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Parasitology*, přijato k tisku

7.1.6 Publikace VI

- VI. Bártíková H., Vokřál I., Kubiček V., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Várady M., Skálová L. (2012):** Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Veterinary Parasitology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.008>, v tisku

7.1.7 Publikace VII

- VII. Bártíková H.,** Vokřál I., Skálová L., Kubíček V., Fírbasová J., Briestenský D., Lamka J., Szotáková B. (2012): The activity of drug metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Parasitology*
<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011002265>, v tisku

7.2 Ostatní publikace v recenzovaných časopisech

Bártíková H., Krížová V., Štěpničková M., Lamka J., Kubíček V., Skálová L., Szotáková B. (2010): Activities of biotransformation enzymes and flubendazole metabolism in lambs (*Ovis aries*): effect of gender and flubendazole therapy, *Pharmacological Reports* **62** (2), 362-373

Bártíková H., Krížová V., Lamka J., Kubíček V., Skálová L., Szotáková B. (2010): Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **33** (1), 56-62

Vokřál I., Jirásko R., Jedličková V., **Bártíková H.**, Skálová L., Lamka J., Holčapek M., Szotáková B. (2012): The inability of tapeworm *Hymenolepis diminuta* and fluke *Dicrocoelium dendriticum* to metabolize praziquantel, *Veterinary Parasitology* **185**, 168-174

7.3 Abstrakta z konferencí

Bártíková H., Kubíček V., Cvilink V., Nobilis M., Szotáková B., Lamka J., Skálová L. (2009): Reduction of Flubendazole, Mebendazole, and other Carbonyl Bearing Xenobiotics in Lancet Fluke (*Dicrocoelium dendriticum*), *Drug metabolism reviews*, Vol. 41, Supplement 1, 48. 11th European Regional ISSX Meeting, 16. - 21. 5. 2009; Lisabon, Portugalsko

Szotáková B., **Bártíková H.**, Vokřál I., Kubíček V., Lamka J., Skálová L. (2009): Effect of Model Inhibitors on Albendazole Sulphoxidation in Lancet Fluke (*Dicrocoelium dendriticum*), *Drug metabolism reviews*, Vol. 41, Supplement 1, 48: 11th European Regional ISSX Meeting, 16. - 21. 5. 2009; Lisabon, Portugalsko

Bártíková H., Kubíček V., Cvilink V., Nobilis M., Szotáková B., Lamka J., Skálová L. (2009): Aktivita redukčních enzymů a biotransformace vybraných anthelmintik u

motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*), *Sborník abstraktů: XXV.*
Xenobiochemické sympóziu, 22. – 25. 9. 2009; Mikulov, Česká republika

Bártíková H., Firbasová J., Vokřál I., Skalová L., Lamka J., Kubíček V., Szotáková B.:
Biotransformation of selected anthelmintics in rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*,
Sborník abstraktů: XXII. Biochemický zjazd, 8. – 12. 9. 2010; Martin, Slovensko

Lasotová T., **Bártíková H.**, Vokřál I., Szotáková B., Kubíček V., Lamka J., Várady M.,
Skalová L.: Activities of drug-metabolizing and antioxidant enzymes in *Haemonchus*
contortus strains resistant or sensitive to anthelmintics, *Sborník abstraktů: XXII.*
Biochemický zjazd, 8. – 12. 9. 2010; Martin, Slovensko

Bártíková H., Fairweather I., Brennan G. P., Szotáková B., Skalová L.: Impact of
metabolic inhibitor methimazole on the drug susceptibility to albendazole sulphoxide of
a triclabendazole-resistant liver fluke, *The FEBS Journal* 278, supplement S1, 434: 36th
FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, 25. - 30. 6. 2011; Turín, Itálie

Bártíková H., Vokřál I., Skalová L., Kubíček V., Firbasová J., Briestenský D.,
Hanušová V., Szotáková B.: Enzymatic activity and biotransformation of anthelmintic
drugs in rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, *Sborník abstraktů: XXVI.*
Xenobiochemické sympóziu, 7. – 9. 9. 2011; Trenčianské Teplice, Slovensko

7.4 Seznam zkratek

11 β -HSD	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
3 α -HSD	3 α -hydroxysteroiddehydrogenasa
AAD	amino-acetonitrilové deriváty
ABC transportéry	„ATP-binding cassette transporters“
ABZ	albendazol
ABZ.SO	albendazolsulfoxid
ABZ.SO ₂	albendazolsulfon
AcCoA	acetylkoenzym A
Ag	antigen
AChE	acetylcholinesterasa
AKR	aldo-ketoreduktasy
ANTU	α -naftylthiourea
BCRP	„breast cancer resistant protein“
BR	kmen <i>Haemonchus contortus</i> rezistentní vůči benzimidazolovým anthelmintikům
CAT	katalasa
CBR	karbonylreduktasa
C-GPx	cytosolická glutathionperoxidasa
C-SOD	cytosolická superoxiddismutasa
CYP	cytochrom P450
DALY	„disability-adjusted life years“, ztráta zdravého roku života
ECOD	ethoxykumarin-O-deethylasa
EC-SOD	extracelulární superoxiddismutasa
EF	faktor účinnosti
FBZ	fenbendazol
FLU	flubendazol
FLU-H	hydrolyzovaný flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
FMO	flavinové monooxygenasy
GPx	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa

GSH	glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ig	imunoglobulin
IL	interleukiny
ISE	citlivý kmen <i>Haemonchus contortus</i>
ISE-S	kmen <i>Haemonchus contortus</i> rezistentní vůči ivermektinu
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC50	koncentrace anthelmintika inhibující vývoj vajíček na L3 larvy u <i>Haemonchus contortus</i> z 50 %
LC99	koncentrace anthelmintika inhibující vývoj vajíček na L3 larvy u <i>Haemonchus contortus</i> z 99 %
LDT	test vývoje larev
MBZ	mebendazol
MBZ-R	redukovaný mebendazol
MDR	„multidrug resistance protein“
MRP	„multidrug resistance associated protein“
M-SOD	mitochondriální superoxiddismutasa
MTZ	metimazol
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
nAChR	nikotinový receptor pro acetylcholin
NK buňky	buňky označované jako přirození zabíječi („nature killer“)
OXF	oxfendazol
P-gp	P-glykoprotein
P-GPx	plazmatická glutathionperoxidasa
Phe	fenylalanin
PH-GPx	fosfolipid-hydroperoxid glutathionperoxidasa
Prx	peroxiredoxiny
Px	peroxidasa
RF	faktor rezistence
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SOD	superoxiddismutasa

TBZ	thiabendazol
TCBZ	triklabendazol
TCBZ.SO	triklabendazolsulfoxid
TCBZ.SO ₂	triklabendazolsulfon
TGR	thioredoxin-glutathionreduktasa
Th buňky	pomocné T buňky
Trx	thioredoxin
TxrR	thioredoxinreduktasa
Tyr	tyrosin
UglcT	UPD-glukosyltransferasa
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
WHO	Světová zdravotnická organizace
WR	kmen <i>Haemonchus contortus</i> vykazující vícečetnou rezistenci k benzimidazolům, ivermektinu, rafoxanidu a klosantelu