

Állatorvostudományi Egyetem



Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Féregellenes szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának genetikai vizsgálata Caenorhabditis elegans nematoda modell segítségével

Lengyel Diána

Témavezetők:

Dr. Csikó György, egyetemi docens

Vellainé Dr. Takács Krisztina, egyetemi docens

Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés	3
3. Irodalmi áttekintés	4
3.1 A nematodák kezelésére alkalmazott gyógyszerek.....	4
3.1.1. Makrociklusos laktonok	4
3.1.1.1 Ivermectin.....	5
3.1.1.1.1. Eredet, szerkezet	5
3.1.1.1.2. Spektrum.....	5
3.1.1.1.3. Hatásmechanizmus	6
3.1.1.1.4. Farmakokinetika	6
3.1.1.1.5. Metabolizmus.....	7
3.1.1.1.6. Felhasználás	7
3.2. Féregellenes szerekkel szembeni rezisztencia	8
3.2.1. Rezisztencia ivermectinre	11
3.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> modell féreg	11
3.3.1. Felépítése.....	13
3.3.2. Szaporodása.....	14
3.3.3. Tenyésztésük, fenntartásuk	17
4. Célkitűzések	19
5. Anyagok és módszerek.....	20
5.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> fenntartása.....	20
5.2. Hatóanyag, koncentráció	20
5.3. A kezelés.....	20
5.4. RNS izolálás	21
5.5. Reverz transzkripció és kvantitatív PCR	21
5.6. Statisztikai analízis	21
6. Eredmények.....	23
7. Megbeszélés	25
8. Összefoglalás.....	27
9. Summary.....	29
10. Irodalomjegyzék	31
11. Köszönetnyilvánítás	36

1. Rövidítések jegyzéke

ATP: adenosin trifoszfát

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

cyp: citokróom P450 gén

CYP: citokróom P450 enzim

E. coli: *Escherichia coli*

GABA: Gamma-amino-vajsav (Gamma-amino butyric acid)

GluCl: Glutamát mediált kloridion csatorna

NGM: Nematoda Growth Medium

pgp: P-glikoprotein gén

PGP: P-glikoprotein (P-glycoprotein)

2. Bevezetés

Napjain egyik meghatározó kérdése a különböző antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia. Az antibiotikumokkal kapcsolatban a témában már számtalan tanulmány született, azonban nem szabad figyelmen kívül hagynunk a férgek esetében az anthelmintikumokkal szemben mutatott csökkent érzékenységet sem.

A különböző rendszertani besorolású férgek változatos kórképeket okoznak világszerte nemcsak az állatok, de az emberek és növények esetében is. A fertőzések jelentős gazdasági károkat okozhatnak, kiemelten a gazdasági haszonállatok és a termesztett növények esetében. Ahhoz, hogy ezekkel szemben felvehessük a harcot, a hatékony féregellenes szerek kifejlesztése elengedhetetlen volt. A hatóanyagok között vannak endoparaziták ellen ható és endectocid szereket egyaránt. Ezek a hatóanyagokat már évtizedek óta elterjedten használják. Sajnos, több tényező együttes hatása miatt napjainkra kialakult velük szemben a rezisztencia, amelynek eredményeképpen a korábban használt hatóanyagok és alkalmazott koncentrációk már nem képesek ugyanazt a hatást kifejteni. A csökkenő érzékenység egy tulajdonság, melyet a férgek generációk egymás között akár át is örökíthetnek.

Annak érdekében, hogy a csökkent érzékenység mértékét és terjedését képesek legyünk minimalizálni, szükségeszerű a rezisztencia módjának és mechanizmusának vizsgálata és megismerése. Ezt laboratóriumban végzett kísérletek során, modellek segítségével végezhetjük, amelyek azonban sajnos nem teljes mértékben képesek lefedni a valóságot annak nagymértékű összetettsége miatt.

Kutatásunkban azt vizsgáltuk, hogy a *sublethalis* koncentrációjú féregellenes hatóanyaggal - jelen esetben ivermectinnel - kezelt állatokban milyen biokémiai változások mennek végbe, melyek befolyásolják a rezisztencia, illetve csökkent érzékenység kialakulását. Kísérletünkhöz a *Caenorhabditis elegans* modell férget használtuk.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A nematodák kezelésére alkalmazott gyógyszerek

Az állatorvoslásban az egyik legszéleskörűbben alkalmazott gyógyszerek a féregellenes hatóanyagok (Abongwa és mtsi., 2017). Az anthelmintikum kifejezés azon hatóanyagokra vonatkozik, melyeket a parazita férgek okozta fertőzések kezelésére alkalmazunk (Holden-Dye és Walker, 2014).

A férgeknek három nagy csoportja van: nematodák (fonálférgek), trematodák (mételyek) és cestodák (galandférgek). Az ellenük alkalmazott szerek megölik vagy kihajtják a férget a gazda szervezetéből, anélkül, hogy abban jelentős kárt okoznának (Abongwa és mtsi., 2017). Az anthelmintikumok többségének limitált a hatása a mételyek, fonálférgek és galandférgek ellen. Egyedül bizonyos benzimidazolok (albendazol, fenbendazol) képesek mindhárom csoportra hatni, ezen belül is inkább a fonálférgekre, mint a mételyekre vagy galandférgekre (Holden-Dye és Walker, 2014).

Jelenleg kis számú féregellenes szercsoport elérhető az állatok kezelésére. Ide tartoznak a benzimidazolok, a makrociklusos laktonok, a tetrahydropyrimidinek, az amino-acetonitril származékok, a spiroindolok, az imidazotiazolok és a ciklikus octadepsipeptidek (Abongwa és mtsi., 2017). Ezen hatóanyagok nagy része már évtizedekkel ezelőtt bevezetésre került (Burns és mtsi., 2015).

Ezek közül a leggyakrabban használt féregellenes szerek a makrociklusos laktonok, a benzimidazolok és a kolinerg agonisták (Fissiha és Kinde, 2021).

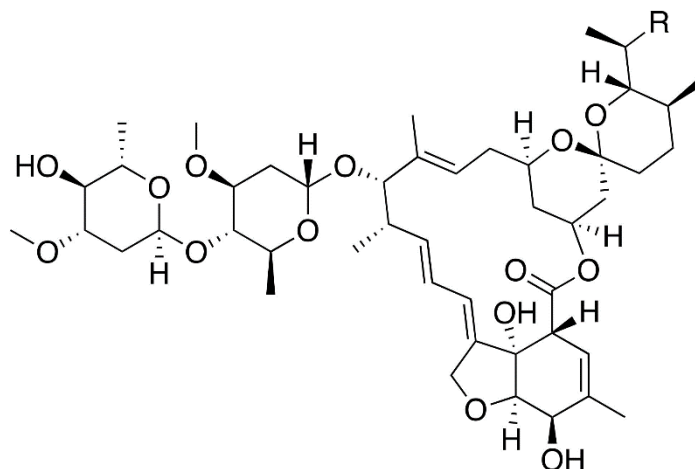
3.1.1. Makrociklusos laktonok

A makrociklusos laktonok olyan kémiai vegyületek, amelyek alapvegyületeit talajlakó mikroorganizmusok, *Streptomyces* fajok termelik. Ezeket az 1980-as évektől vezették be, mint antiparazitikus szereket, melyek széles spektrummal rendelkeznek, így hatékonyak fonálférgek és ízeltlábúak ellen is (Abongwa és mtsi., 2017). Emiatt az egyedi tulajdonságuk miatt, miszerint képesek belső és külső élősködők elpusztítására is, nevezzük a hatóanyag csoportot endektocid szereknek (Riviere és Papich, 2018).

A makrociklusos laktonokon belül két csoportot különíthetünk el: az avermectineket és a milbemycineket. A kereskedelemben elérhető avermectinek közé az ivermectin, az abamectin, a doramectin és a selamectin, míg a milbemycinek közé a milbemycin oxim és a moxidectin tartozik (Abongwa és mtsi., 2017).

3.1.1.1 Ivermectin

3.1.1.1.1. Eredet, szerkezet



1. ábra Az ivermectin szerkezeti képlete (Shubin és mtsi., 2021)

Az ivermectin egy félszintetikus avermectin származék. Az alapvegyület a *Streptomyces avermitilis* fermentációjából származik. Az ivermectin két, kémiaiailag módosított avermectin keveréke (legalább 80% 22-23 dihydroavermectin B1a és kevesebb, mint 20% 22-23 dihydroavermectin B1b) (Fisher és Mrozik, 1989).

Napjainkban az ivermectint haszonállatoknál, társállatoknál, vadállatoknál és az embernél is előszeretettel alkalmazzák. Injekciós, pour-on és orális formában találhatjuk meg az állatorvosi gyógyszerkínálatban (Riviere és Papich, 2018). Érdekesség, hogy eredetileg állatorvosi felhasználásra fejlesztették ki, és csak később engedélyezték használatát a humán orvoslásban az onchocerciasis (folyami vakság és a nyirokér filariosis kezelésére) (Abongwa és mtsi., 2017).

Nagy lipofilitása és széles spektrumú elnyújtott, erős hatása kivételes a féregellenes szerek között (Riviere és Papich, 2018).

3.1.1.1.2. Spektrum

Az ivermectin az endectocidok csoportjába tartozik, így külső és belső élősködőkkel szemben is hatékony. A széles spektruma miatt alkalmazható rovarok, atkák és nematodák okozta fertőzések ellen, azonban anticestoda és antitrepatoda hatással nem bír. A nematodák közül nem csak az adultusokra, de a lárvákra, és a hipobiotikus lárvákra is hat (Riviere és Papich, 2018).

3.1.1.1.3. Hatásmechanizmus

A paralitikus hatását a ligand-kötő kloridion csatornák szabályozzák, vagyis a GABA (gamma-aminovajsav) és/vagy glutamát-mediált kloridion (GluCl) csatornák, amiket az idegrendszerben találunk (Blackhall és mtsi., 2003).

Ahhoz, hogy a GABA-mediált-csatornán kialakuljon a hatás, jelentősen nagyobb koncentrációra van szükség, mint a GluCl esetében. Valójában azonban a GluCl-csatornához igen nagy affinitással kötődnek a molekulák, ami egy lassan kialakuló irreverzibilis hatást eredményez (Forrester és mtsi., 2003). A két fő következmény a hyperpolarizáció (a postszinaptikus kloridion csatornához való kötődés, csatorna nyitás és kloridion beáramlás miatt) és a harántcsíkolt izmok petyhüdt bénulása (Martin és mtsi., 2002).

A glutamát-mediált kloridion csatorna egyedülállóan, csak a gerinctelenekben található meg (Choudhary és mtsi., 2022). A férgek közül ez csak a nematodákra jellemző, hiszen a galandférgekben és a mótelyekben nincsen meg ez a típusú csatorna. A GluCl-csatorna néhány típusát többek között a szabadon élő *Caenorhabditis elegans*-ből is kimutatták, ami jelentős mértékben elősegítette a rezisztencia mechanizmusának megértését (Forrester és mtsi., 2003). Ezzel ellentétben a GABA-mediált kloridion csatornákat már megtaláljuk a gerincesekben is, és az arra érzékeny egyedekben (MDR1-mutáció, vér-agy gát) akár mérgezést okozhat.

Az ivermectin a garat pumpa és a harántcsíkolt izmok gátlását, közvetetten pedig a parazita elhullását, idézi elő. Ezeknek a tápanyagok felvételében, a helyben maradásban/helyhez kötésben van jelentős szerepe (Geary és mtsi., 1999; Riviere és Papich, 2018). Ezen kívül gátló hatást fejt ki a női szaporítószervekben, így a peték termelése is csökkenni fog (Fellowes és mtsi., 2000).

3.1.1.1.4. Farmakokinetika

A makrociklusos laktonok klinikai hatékonysága nagymértékben összefügg a farmakokinetikai tulajdonságaikkal.

Az erősen lipofil ivermectin nagymértékben megoszlik a különböző szövetekben a vérpályába jutást követően. A tipikus predilekciós helyeken/szövetekben, ahol a paraziták előfordulnak - emésztőcsatorna mucosája, tüdő és bőr - sokkal nagyobb koncentrációt mérhetünk, mint a plazmában (Riviere és Papich, 2018).

Az ivermectin kifejezetten hatékony a felnőtt és a lárva féregalakokkal szemben az emésztőrendszer legtöbb parazita *Nematodája* és a *Dictyocaulus viviparus* tüdőféreg

tekintetében. Ennek oka a kedvező megoszlása és a tüdő szövetében, illetve a bélrendszer mucosájában való magas koncentrációja (Lifschitz és mtsi., 2000).

3.1.1.1.5. Metabolizmus

Az ivermectin kis mértékű lebomlása a májban történik, és az epével és a bélsárral ürül változatlan formában. Az ivermectin jelentős része az emlőmirigyeken keresztül a tejjel is távozik, így ez a hatóanyag tejelő állatokon nem alkalmazható (Riviere és Papich, 2018).

3.1.1.1.6. Felhasználás

A makrociklusos laktonok vegyületei több, különböző állatfajban is kivételes potenciállal és széles nematoda és arthropoda ellenes hatással bírnak (Riviere és Papich, 2018).

Kérődzőknél subcutan, orálisan és topicalisan lehet alkalmazni. *Nematodák* tekintetében többek között *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides*, *Bunostomum*, *Trichuris*, *Oesophagostomum*, *Dictyocaulus* fajok, valamint *Chabertia ovina*, ízeltlábúak tekintetében pedig atkák, kullancsok, böglyök és vérszívó tetvek ellen igen hatékonyak (Riviere és Papich, 2018).

Sertéseknél subcutan és orális formában érhetők el készítmények külső és belső élősködők ellen ivermectin hatóanyaggal, amik a fejlődő és felnőtt *Ascaris suum*, *Hyostrongylus rubidus*, *Strongyloides ransomi*, *Oesophagostomum spp.*, *Metastrongylus spp.*, *Stephanurus dentatus*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris suis* alakjai, valamint vérszívó tetvek és atkák ellen hatékonyak (Riviere és Papich, 2018).

Lovak esetében az ivermectint szájon át, gél vagy paszta formájában használjuk. Igen hatásos *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi*, *Draschia megastoma*, *Habronema spp.*, *Trichostrongylus axei*, *Strongyloides westeri*, *Draschia arnfieldi*, *Strongylus spp.*, *Gasterophilus nasalis*, *Onchocerca spp.* ellen (Riviere és Papich, 2018).

A kutyák és macskák esetében is alkalmazhatjuk a makrociklusos laktonokat különféle terápiákban. Teljes hatékonysága és biztonsága azonban nem érvényes kutyák esetében, hiszen már ismert, hogy a collie típusú, de akár egyéb fajtájú kutyák is kifejezetten érzékenyek lehetnek az ivermectinre (Riviere és Papich, 2018). Terápiás dózisban a dirofilariasis megelőzésében használhatjuk, hatékony a hármas és négyes stádiumú *Dirofilaria immitis* lárva ellen, ám az ettől eltérő alkalmazása már off label használatnak minősül (Campbell, 1989, Riviere és Papich, 2018). Szájon át adott magas dózis eredményes többféle *Nematoda* féreg ellen is, többek között *Ancylostoma caninum*, *Trichuris vulpis*,

Toxocara canis, *Capillaria aerophila* (Riviere és Papich, 2018). Különböző tanulmányok azt is kimutatták, hogy kutyáknál már kettő subcutan injekció elég az *Otodectes*, *Sarcoptes* és *Notoedres* rühösség megszüntetéséhez (Campbell, 1989).

3.2. Féregellenes szerekkel szembeni rezisztencia

A különböző férgek jelentős egészségügyi problémát jelentenek az emberek és az állatok számára is a Föld különböző részein (Fissiha és Kinde, 2021). A parazita nematodák a világ populációjának egy negyedét fertőzik. A növény- és állatállományok széleskörű fertőzöttsége kihatással van az egész emberiségre, hatalmas gazdasági károkat okoznak globálisan (Burns és mtsi., 2015).

Napjaink sürgető problémája az antibiotikumok elleni rezisztencia kérdése, de nem hagyhatjuk figyelmen kívül a csökkenő érzékenységet a féregellenes szerekre sem. Ez az elmúlt években olyan nagy méreteket öltött, hogy már nem lehet többé figyelmen kívül hagyni (Kaplan és Vidyasshankar, 2012).

Az előző évtizedekben rohamos emelkedés mutatkozott az anthelmintikus rezisztencia mértékében és elterjedésében is világszerte (Kaplan és Vidyasshankar, 2012). Ennek során a paraziták korábbi érzékenysége az adott szerrel szemben nagymértékben lecsökken, akár el is tűnik. Ez genetikailag kódolt, a felnőtt egyedek az utód generációnak továbbadják a tulajdonságot (Fissiha és Kinde, 2021).

A rezisztenciának több típusa is ismert, így a keresztrezisztencia, a *side resistance* és a többszörös rezisztencia. A keresztrezisztencia lényege, hogy a parazita más kémiai szerkezetű és mechanizmussal rendelkező hatóanyagokkal szemben is ellenálló. A *side resistance* hasonló működésű, míg a többszörös rezisztencia pedig kettő vagy több, hasonló vagy más mechanizmusú hatóanyaggal szembeni ellenállóságot jelent (Nipane és mtsi., 2008). Sajnos a kutatások azt bizonyítják, hogy már a hatóanyag első használatától számított 10 éven belül megjelenik a rezisztencia (Fissiha és Kinde, 2021).

Az elmúlt évtizedekben a paraziták gyógyszeres kontrollja igen hatékornak bizonyult, köszönhetően a széles terápiás sávnak és spektrumnak, illetve a megfizethető árak (Fissiha és Kinde, 2021).

Ugyanakkor, sajnálatos módon a férgesség kezelésére használt gyógyszerek túlzó, kimerítő, gyakori használata, a rosszul megbecsült testtömeg miatti aluladagolás, a paraziták genetikája, a helytelen gyógyszerbeadás, valamint a tömegkezelések komoly rezisztenciához

vezettek szinte valamennyi feregcsoporthoz. A fő mechanizmusok, amelyek elősegítették a csökkent érzékenység kialakulását, a paraziták sejtjeiben a fokozott efflux tevékenység, a megemelkedett aktivitású gyógyszer metabolizmus, a receptor kötőhelyek megváltozása és csökkenő száma volt, azonban ez nagyon összetett. A gazda, a parazita, a gyógyszer típusa és használata, az állatok menedzsmentje és a klimatikus viszonyok is nagyban befolyásolják a folyamatot (Fissiha és Kinde, 2021).

Az ATP-kötő kazetta vagy ABC transzporter család génjeinek kifejeződésében bekövetkező változások összefüggnek a feregellenes rezisztenciával. Itt kiemelhetjük a PGP (P-glikoprotein) géneket, melyeket efflux pumpaként is ismerünk. Ez az efflux pumpa felelős a gyógyszermolekulák eltávolításáért a sejt belsejéből, ezzel megakadályozva azt, hogy elérjék a célhelyüket és kifejtsék hatásukat (Dube és mtsi., 2023).

A CYP 450 enzimek szupercsaládja, melyet szinte minden élő organizmusban megtalálhatunk (Laing és mtsi., 2015), illetve ezek a gyógyszerek metabolizmusának élvonalában vannak jelen (Yilmaz és mtsi., 2019). A CYP enzimek számos reakciót katalizálnak; közreműködnek a szteroidok, retinoidok, prosztaglandinok, zsírsavak bioszintézisében és katabolizmusában, illetve exogén szubsztátok detoxifikációjában (pl.: gyógyszerek, inszekticidek). A CYP enzimek a metabolizmus első fázisának fő enzimei. A *C. elegans* genomja 80 CYP enzimet kódol (Laing és mtsi., 2015). Emellett ezek az enzimek fontos szerepet töltenek be a gyógyszer rezisztenciában daganatellenes és rovaritó szerek esetében. A közelmúltban a makrociklusos laktonok elleni csökkent érzékenységet is összefüggésbe hozzák ezekkel az enzimekkel (Yilmaz és mtsi., 2019).

Az ATP-kötő kazetta vagy ABC transzporter család génjeinek kifejeződésében bekövetkező változások összefüggnek a feregellenes rezisztenciával. Itt kiemelhetjük a PGP (P-glikoprotein) géneket, melyeket efflux pumpaként is ismerünk. Ez az efflux pumpa felelős a gyógyszermolekulák eltávolításáért a sejt belsejéből, ezzel megakadályozva azt, hogy elérjék a célhelyüket és kifejtsék hatásukat (Dube és mtsi., 2023).

A CYP 450 enzimek szupercsaládja, melyet szinte minden élő organizmusban megtalálhatunk (Laing és mtsi., 2015), illetve ezek a gyógyszerek metabolizmusának lényeges enzimei (Yilmaz és mtsi., 2019). A CYP enzimek számos reakciót katalizálnak; közreműködnek a szteroidok, retinoidok, prosztaglandinok, zsírsavak bioszintézisében és katabolizmusában, illetve exogén szubsztátok detoxifikációjában (pl.: gyógyszerek, inszekticidek). A CYP enzimek a metabolizmus első fázisának fő enzimei. A *C. elegans*

genomja 80 CYP enzimet kódol (Laing és mtsi., 2015). Emellett ezek az enzimek fontos szerepet töltenek be a gyógyszer rezisztenciában daganatellenes és rovarító szerek esetében. A közelmúltban a makrociklusos laktonok elleni csökkent érzékenységet is összefüggésbe hozták ezekkel az enzimekkel (Yilmaz és mtsi., 2019). Elsősorban, a lovak, kecskék, juhok és szarvasmarhák emésztőszervi parazitáit érinti a probléma. A növekvő rezisztencia így nem csak az állomány egészségét, de a termelést is nagymértékben befolyásolja (Fissiha és Kinde, 2021). A világ több részén találhatunk multirezisztens parazitákat, illetve sajnos ma már az sem ritka, hogy olyan juh vagy kecske gazdaságot találunk, ahol az összes elérhető anthelmintikus hatóanyaggal szemben kifejlődött rezisztencia. Összességében a lovak és szarvasmarhák esetében szerencsére kevésbé súlyos a helyzet, de náluk is jelen van, sőt, súlyosbodni látszik (Kaplan és Vidyasshankar, 2012).

A féregellenes szerekkel szembeni csökkent érzékenységet több módszerrel vizsgálhatjuk, ám ahhoz, hogy kijelenthessük valódi rezisztencia áll fenn, számos kritériumnak teljesülnie kell. Az *“in vivo”* és *“in vitro”* eljárások mind a rezisztencia kimutatása, mind pedig monitorozása során felhasználhatóak (Fissiha és Kinde, 2021).

A rezisztencia kialakulásának és terjedésének megakadályozása kihívásokkal teli folyamat, főként a számos faktor figyelembevétele és az új hatóanyagok fejlesztési nehézségei (lassú és drága) miatt. A parazita nematodák összetett élelciklusa, illetve az, hogy a szaporodásukhoz gazdaszervezetre van szükségük megnehezíti a hatóanyag molekulák által kifejtett hatások vizsgálatát. A szabadon élő nematoda, a *Caenorhabditis elegans* azonban egy könnyen alkalmazható, jó alternatív modellrendszer azon új vegyületek kutatására, amik specifikusan gátolják a nematodákat. A forgalmazott féregellenes szerek többsége a *C. elegans*-on is hasonló hatást vált ki. Ezen modellállatok alkalmazása nagyban hozzájárult a hatóanyagok működési elvének megértéséhez (Burns és mtsi., 2015).

Az egységes kezelési megközelítés nehézkes, aminek több oka is van, például nagy területi eltérések lehetnek a különböző parazitafajok elterjedtségében, a gazdaállatfajok és -fajták, az éghajlati viszonyok, az élősködők járványtana, az állomány nagysága, a menedzsment kivitelezése és az állattartási tradíciók között (Kaplan és Vidyasshankar, 2012).

Mindezek mellett természetesen szükség van a gyógyszerek megfelelő/szabályszerű alkalmazására, kombinált kezelésekre, a rezisztencia folyamatainak állandó nyomon követésére, a hajlamosító tényezők részletes ismeretére és egyéb alternatívák használatára is (Fissiha és Kinde, 2021).

3.2.1. Rezisztencia ivermectinre

A parazita ellenes stratégiák szinte kizárólag a kémiai anyagok felhasználásán alapulnak. Ezt azonban a nematoda parazitáknál kialakuló rezisztencia fenyegeti, most már beleértve a makrociklusos laktonokat is. Ezen hatóanyagok gyakori alkalmazása nagy szelekciós nyomást gyakorolt az emésztőrendszeri nematodákra, ami így hozzájárult az ellenálló képességük növekedéséhez (Riviere és Papich, 2018).

A rezisztencia a makrociklusos laktonokra, így az ivermectinre, keresztrezisztenciát jelenthet a benzimidazolokra és a levamizolra.

A glutamát-mediált kloridion csatornák szerkezetében bekövetkezett strukturális változásnak és a különböző, gyógyszer efflux fehérjék - PGP -megnövekedett expressziójának szintén szerepe van a rezisztencia kialakulásában (Riviere és Papich, 2018).

Kezdetben a makrociklusos laktonokkal (ezen belül is leginkább az ivermectinnel) szemben mutatott rezisztencia a juhok és kecskék nematodáinál volt megfigyelhető, főképp a *Haemoncus contortus*-nál, de azóta már más *Nematoda* fajoknál is megjelent. A *Teladorsagia circumcincta* és *Teladorsagia columbriformis* esetében az ivermectinre adott csökkent érzékenység világszerte kimutatható (Riviere és Papich, 2018).

Ezek felül, az elmúlt közel 40 évben, az ivermectin 1980-as évek eleji bevezetése óta a rendkívül intenzív globális használat miatt a szarvasmarhák nematodáiban is kialakult rezisztencia - többek között *Cooperia*, *Trichostrongylus* és *Ostertagia* fajok esetében is (Riviere és Papich, 2018).

Összességében tehát az élelmiszertermelő állatok esetében a szelekciós nyomás csökkentése, az éves kezelések számának minimalizálása és az egységes féregellenes stratégia kialakítása szükséges annak érdekében, hogy a széles spektrumú makrociklusos laktonokat továbbra is eredményesen tudjuk használni (Riviere és Papich, 2018).

Szerencsére, kutyák esetében a havi használat ellenére - a szívférgesség megelőzése érdekében - még nincs kialakult rezisztencia (Riviere és Papich, 2018). Nem csak belső, de külső élősködők esetében is megfigyelhető a csökkent érzékenység, így például a *Rhipicephalus microplus*-nál (Perez-Cogollo és mtsi., 2010).

3.3. *Caenorhabditis elegans* modell féreg

A *Caenorhabditis elegans* egy talajban, szabadon élő, nem parazita féreg, amely a világ minden részén megtalálható (Meneely és mtsi., 2019). Főként bomló növényi részekben -

gyümölcsök, virágok, szarak - fordul elő, ahol mikrobákat, kisméretű eukariótákat, gombákat, baktériumokat fogyaszt. A táplálkozás nem csak egyirányú a féreg és a zsákmánya között, hiszen, ha a felnőtt állatok előregszenek, maguk is eleségül szolgálnak a mikroorganizmusok számára (Frézal és Félix, 2015, Herndon és mtsi., 2017).

Ezt a *Nematoda* féregfajt, a *Caenorhabditis elegans*-t kedvező tulajdonságai miatt választották ki laboratóriumi modellként. Először 1963-ban Sydney Brenner volt az első, aki a kísérleteiben baktériumok és bakteriofágok után már inkább állatokat használt. Számos organizmust vizsgált meg, mielőtt döntése a *Caenorhabditis elegans*-ra esett volna, melyet ma már csak "a féreg"-ként emlegetnek (Meneely és mtsi., 2019).

A *Caenorhabditis elegans* egy fontos genetikai modell organizmus, köszönhetően számos hasznos tulajdonságának. Ami igazán vonzóvá és hatékonyá teszi az az, hogy nagyon könnyű vele laboratóriumi körülmények között dolgozni, hiszen minimális tápanyag és növekedési szükséglete van, gyors a fejlődése, néhány napon belül nagy mennyiségű, azonos genotípusú utódot termel önmegtermékenyítéssel, könnyű a fenntarthatósága, genetikailag könnyen módosítható, anatómiáját, élettanát részletesen ismerjük (Park és mtsi., 2017, Meneely és mtsi., 2019).

A *C. elegans* a környezetben főként nedves, mérsékelt éghajlatú területeken található meg. Eredetileg tápanyagban dús talajból, komposztból izolálták őket, ahol leginkább a nem táplálkozó, dauer formában vannak jelen. A közelmúltban viszont táplálkozó és szaporodó alakjait találták meg bomló növényeken, mint gyümölcsök és lágyszárú növények. Ezek az anyagok a rothadás késői szakaszában bőséges táplálékot biztosítanak a férgek számára a baktériumok miatt (Frézal és Félix, 2015).

A *C. elegans* a környezetben ízeltlábúakkal, más mikroorganizmusokkal (fakultatív és obligát parazita baktériumok, gombák, vírusok, mikrosporidiumok) és gerinctelenekkel, beleértve egyéb *Nematoda* fajokat (*Oscheius*, *Pristionchus*, *Panagrellus*, *Caenorhabditis* fajok) él kapcsolatban (Frézal és Félix, 2015, Herndon és mtsi., 2017).

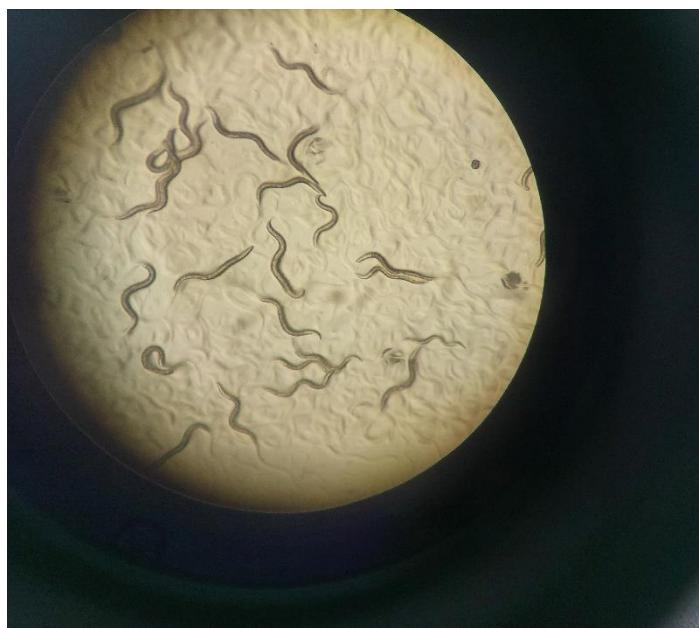
A paraziták legvédtelenebb részekén keresztül képesek fertőzni a férget; a kutikula és a bélcsatorna felől. Néhány nem invazív baktérium közvetlenül kapcsolódik a kutikularéteghez, így biofilmet létrehozva azon. Más baktériumok a féreg tápcsatornájában szaporodnak, melyek így *constipatiót* okoznak és gátolják/ gyengítik a tápanyag felvételét (Frézal és Félix, 2015).

Több, mint 50 év alatt, a laboratóriumi bevezetését követően széleskörűen és sokoldalúan használt modell a biológiai és genetikai kutatásokban. Ez volt az első olyan többsejtű élőlény, melynek teljes genomját megszekvenálták (Meneely és mtsi., 2019).

3.3.1. Felépítése

A *Caenorhabditis elegans* a *Nematodák*, vagyis a fonálférgek törzsébe tartozik. Az osztályon belül két csoportot is elkülöníthetünk; lehetnek szabadon élők vagy paraziták, talajban vagy vízben élők. A nematodák világszerte nagy számban jelen vannak a természetben, illetve mint emberi, állati vagy növényi paraziták is (Wixon és mtsi., 2000).

A fonálférgek teste nem szegmentált, henger alakú, ami a végeken elvékonyodik (Altun és Hall, 2009). A felnőtt példányok mindössze 1 mm hosszúak (Corsi és mtsi., 2015). Kis méretük miatt a genetikai kísérletekben elvégezhetjük a férgek vizsgálatát egy sztereomikroszkóp segítségével (Meneely és mtsi., 2019). A 2. ábrán, saját képen *C. elegans* férgeket láthatunk, a fénymikroszkópban fényképezve.



2. ábra *Caenorhabditis elegans* férgek fénymikroszkópos képe

A férgek teste átlátszó, ami így lehetővé teszi belső szerveik jó megfigyelhetőségét. Az első stádiumú lárva 558, míg a felnőtt hermaphrodita 959, a felnőtt hím pedig 1031 sejtből áll (Altun és Hall, 2009).

A *Caenorhabditis elegans* idegrendszere a garatideggyűrű, amely egy kezdetleges agyat formál, és a testen végigfutó hasi és háti dúcláncokból áll (Wixon és mtsi., 2000).

A felnőtt hermaphroditáknak 302 neuronja és 56 gliasejtük van. A testük falának izmait motoros neuronok idegzik be (Meneely és mtsi., 2019). A *subdorsalis* és *subventralis* összekötött 4 izomcsoport segítségével mozog. Az izmok váltakozó összehúzódása és elernyedése *dorsoventralis* hullámokat idéz elő a testen (Wixon és mtsi., 2000).

A férgek szájníylását kemoszensoros neuronok szegélyezik, melyek közül néhányat gliasejtek vesznek körül, néhány pedig közvetlenül érintkezik a külső környezettel. Más érző neuronok képesek érzékelni és elkülöníteni az érintésben, fényben, hőmérsékletben, sókoncentrációban vagy egyéb körülményekben bekövetkező változásokat (Meneely és mtsi., 2019). A feji és a farki végen érzékszervek találhatók, amelyek ízekre és szagokra reagálnak, illetve képesek érzékelni a hőmérsékletváltozást és az érintést. A férgeknek nincs szemük, de kismértékben reagálhatnak a fényre (Wixon és mtsi., 2000).

Az ökológiai szerepük nagyrészt ismeretlen. Főként, mint "házasított", vagy laboratóriumi egyedként használjuk őket, de ezek a példányok eltérnek a vadon élő egyedektől (Meneely és mtsi., 2019).

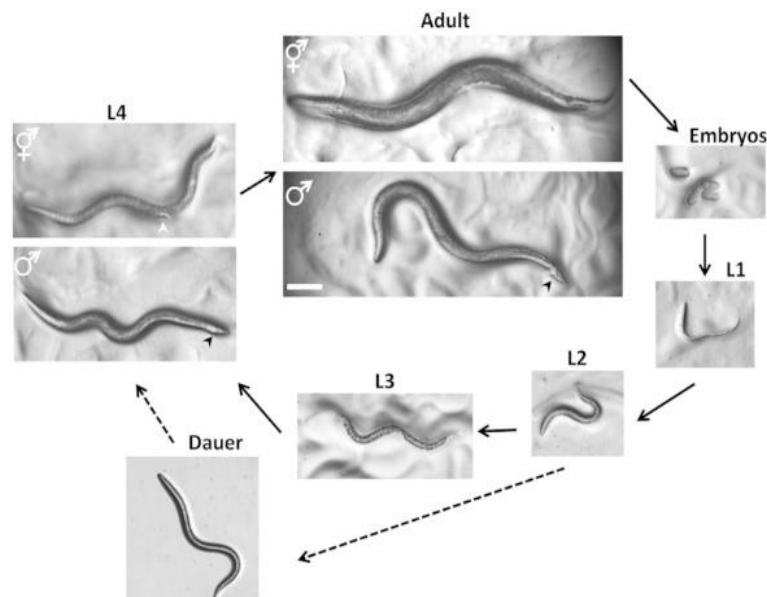
3.3.2. Szaporodása

A *C. elegans* populációit az önmegtermékenyítésre képes, kettő X kromoszómát hordozó hermaphroditák és a sokkal ritkábban előforduló, X kromoszóma nondisjunkcióval keletkező, egy X kromoszómát tartalmazó hímek alkotják. Gyorsan szaporodik; a 3,5 napos reprodukív ciklus alatt nagyjából 300 utódot termel szobahőmérsékleten. Nem csak önmegtermékenyítéssel, de a hermaphroditák és a hímek egymás között is képesek szaporodni (Meneely és mtsi., 2019).

A hermaphrodita egyedek tulajdonképpen nőtényekként foghatók fel, melyek termelnek spermiumot is. A nagyjából egy órás spermiumtermelés után a *spermatogenesis* leáll, az *oogenesis* pedig elkezdődik. A petesejtek termelése mindaddig tart, ameddig van jelen spermium. A hermaphrodita állatokban van egy úgynevezett *spermatheca*, amely a sperma tárolására szolgál, illetve ezen haladnak át az érett petesejtek, amik így megtermékenyülnek (Meneely és mtsi., 2019).

A megtermékenyülés után a petesejtben sejtosztódás megy végbe, kialakul a zigóta és az embrió, melyet a *morphogenesis* és a differenciáció követ, majd első stádiumú lárva fog kikelni (Wixon és mtsi., 2000).

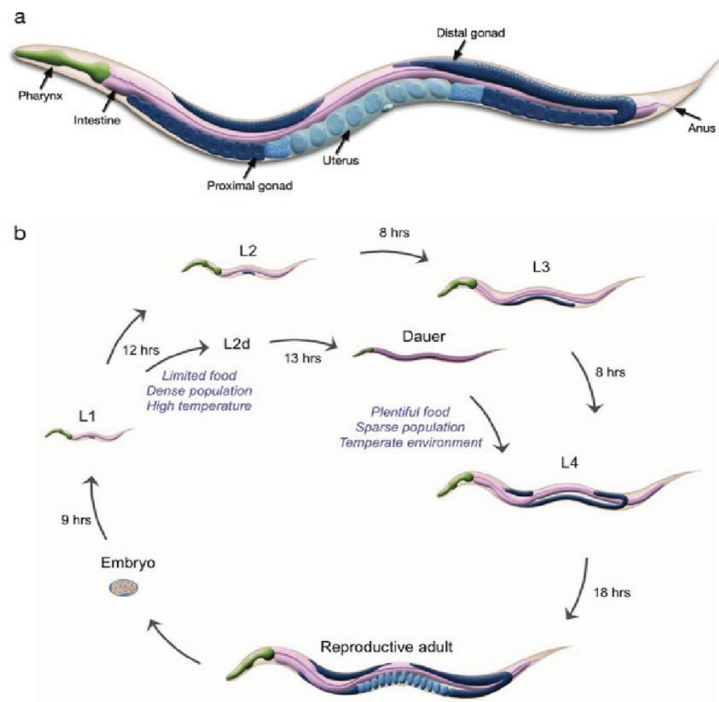
A környezeti feltételektől függően a fertilizációt követően 2 órán belül a peték már lerakásra kerülnek, majd a teljes *embriogenesis* lezajlása után, 12 óra múlva, a lárvák kikelnek a petékből. A frissen kikelt L1 lárváknak nagyjából a hossza és a szélessége is $\frac{1}{6}$ -a a felnőttének. A felnőtt hermaphrodita kifejlődése után már 12 órával elkezd lerakni a petéket (Meneely és mtsi., 2019). A 3. ábrán fénymikroszkópos képek segítségével végig követhetjük a féreg fejlődését, és annak különböző alakjait.



3. ábra *C. elegans* fejlődése fénymikroszkópos képekkel illusztrálva (Corsi és mtsi. 2005-2018)

A *C. elegans* egyedfejlődése során összesen négy lárvastádiumon megy keresztül, amiket egy-egy vedlés választ el egymástól, mielőtt a kifejlett felnőtt létrejön (Meneely és mtsi., 2019, Wixon és mtsi., 2000). A 4. ábrán láthatjuk a különböző fejlődési szakaszokat, illetve az azokhoz szükséges időt.

Ha a lárvális fejlődés során nem megfelelőek a körülmények (alacsony táplálék ellátottság, magas hőmérséklet, magas feromon koncentráció, zsúfoltság), akkor az L2-es lárvalak/ vagy L2d pre-dauer alak átalakul egy alternatív L3, úgynevezett dauer formává. Ezek az egyedek vékonyabbak és sötétebbek is az ellenálló kutikularétegük miatt a normál társaikhoz képest. Ha a körülmények javulnak, akkor a dauer lárva átalakul L4 alakká (Meneely és mtsi., 2019, Ow és Hall, 2015).



4. ábra A *C. elegans* fejlődési stádiumai és az ahhoz szükséges idő (Herndon és mtsi., 2017)

A rezisztens dauer L3 lárvalak táplálkozás nélkül, a fejlődésben megrekedve, stresszrezisztens módon akár hónapokig is képes túlélni. Bár korábban azt gondolták ez egy nyugvó/alvó állapot, a mai kutatások már bizonyították, hogy ez egy igen dinamikus forma. Jelentős változások figyelhetők meg a génexpresszióban, az sRNS (small RNS) mennyiségében, a kromatin állományban, illetve idegi átépülés is látható (Ow és Hall, 2015). A dauer állapotban lévő lárvák aktívan mozognak, illetve van egy jellegzetes viselkedésük is, amit „nictationak” hívnak. Ennek során a férgek a farkukon „állnak”, testüket pedig a levegőben lengetik/ lebegtetik. Rendkívüli módon ezek a dauer lárvák össze is gyűlhetnek egy helyre, hogy oszlopot formáljanak, egy csoportként. Ez a viselkedés valószínűleg abban segíti a férgeket, hogy az elhaladó gerinctelen gazdákat – csigák, ászkarákok, meztelencsigák – megtalálják, melyek hozzájárulásával így képesek szétszóródni (Frézal és Félix, 2015).

Meglepő módon azok a felnőtt egyedek, amelyek keresztülmentek a rezisztens L3 lárvalakon, fenotípusosan és viselkedésben is különböznek normálisan kifejlődött társaiktól. Többek között megfigyelhetők náluk a kromatin állomány változásai az egész genom szintjén, nagyobb az ivadékaik mérete, illetve az átlagos élettartamuk is hosszabb (Ow és Hall, 2015).

A reprodukció után a szülő öregedni kezd, amit az energia csökkenése is jelez, majd elpusztul. Az átlagos élethossz mindössze csupán 2-3 hét (Wixon és mtsi., 2000).

Az önmegtermékenyülés eredménye az erősen beltenyésztett vonal, ami a homozigóta törzsek, akár mutánsok, könnyű laboratóriumi fenntartását eredményezi. Elég egyetlen hermaphrodita egyedet az agarra helyezni, ami majd létrehozza a következő generációt (Meneely és mtsi., 2019).

A hím egyedek spontán alakulnak ki az egyik X kromoszóma elvesztésével. Az arány megközelítőleg 1 hím 600 egyednél. Ezt az arányt tudjuk növelni, ha a gametogenesis során néhány órán keresztül kissé magasabb hőmérsékletet biztosítunk, mint a normál (a normál, 15-25 °C közötti hőmérséklettől eltérően, 30 °C-on inkubáljuk az L4 stádiumú hermaphroditákat 4-6 órán keresztül, majd visszahűtjük a lemezeket 20 °C-ra) (Meneely és mtsi., 2019).

A hímeket könnyedén el lehet különíteni a hermaphroditáktól a fark alakja és a viselkedésük alapján. Hímeket szegregáló törzseket is ki tudunk alakítani egy hím és egy hermaphrodita keresztezésével, hiszen az F1 generációban a hímek aránya jóval magasabb, 50% lesz. A keresztezés, és így a hímek segítségével új allélok vihetők be a hermaphrodita törzsekbe (Meneely és mtsi., 2019).

3.3.3 Tenyésztésük, fenntartásuk

A *Caenorhabditis elegans* kiváló tulajdonságai miatt a laboratóriumban egyszerűen tartható és tenyészthető. Rövid a szaporodási ideje, emellett jó a tárolhatósága is (Frézal és Félix, 2015). A laboratóriumban koleszterollal kiegészített agar táptalajon kiválóan tartható és tenyészthető 15-25 °C között *E. coli*-val etetve (Meneely és mtsi., 2019, Frézal és Félix, 2015). Ha azonban a hőmérséklet folyamatosan 25°C felett van, az állatok sterillé válnak (Corsi és mtsi., 2015).

Emellett a féreg képes túlélni a fagyasztást is; ez lehetővé teszi, hogy hosszú ideig -80 °C-on vagy folyékony nitrogénben, -196 °C-on tároljuk, ami egy rendkívül hasznos tulajdonság a genotípusok tárolása és a kutatások tervezésekor is (Frézal és Félix, 2015). A sikeres fagyasztás kulcsa, hogy a férgek megfelelő fejlődési stádiumban legyenek, adagoljunk glicerint a fagyasztó közeghez, illetve, hogy fokozatosan hűtsük -80°C-ig. Az éheztetett, fiatal lárvák (L1, L2) élnek túl legjobban, míg a jól táplált állatok, a felnőttek, peték és dauer lárvák a legkevésbé a fagyasztást (Stiernagle, 2006).

A *C. elegans* petéinek burka természeténél fogva ellenálló több környezeti stresszhatással szemben is, ezáltal alkalmazható esetükben a *bleaching*. A *bleaching* egy széles körben alkalmazott eljárás a laboratóriumokban. Ezt a műveletet azonban egy populáción belül csak az embriók képesek túlélni. Ennek segítségével lehetséges a szinkronizáció és a mikrobiális kontamináció eltávolítása (Frézal és Félix, 2015).

A férgekél többféle törzstípus érhető el törzsbankokból; többek között Bristol N2 - vad típus, AVR-14/AVR-15/GLC-1 tripla mutáns törzs, PGP deléziós törzs.

Táptalaj tekintetében használhatunk szilárdat (NGM, LB) vagy akár folyékonyat (S Medium) is (Stiernagle, 2006).

Táplálásukhoz nem patogén *Escherichia coli* baktériumtörzseket lehet használni. Mindennapos használatban leginkább az EP/OP50-es, uracil auxotroph *E. coli* törzseket használják (Stiernagle, 2006). Néhány helyen streptomycinnel kezelt táptalajt, illetve streptomycin-rezisztens, OP51-es törzset alkalmaznak a bakteriális kontamináció csökkentése érdekében (Meneely és mtsi., 2019).

4. Célkitűzések

A parazitaellenes szerekkel szembeni rezisztencia terjedése növekvő gond világszerte. Hatékony kezelés hiányában a paraziták okozta fertőzések és azok következményei (csökkent immunválasz, másodlagos fertőzések) jelentős gazdasági kárt okozhatnak.

Számos esetben nem valódi rezisztencia, hanem csökkent érzékenység áll a féregellenes szerek hatékonyságának csökkenésében. Azonban, a pontos mechanizmus, amely az antiparazitikumok hatástalanságát okozza, ismeretlen. Vizsgálataink során a nematodák ezen mechanizmusait szeretnénk feltárni, elsősorban a transzportmechanizmusaikra és a lebontó folyamataikra összpontosítva.

A *Caenorhabditis elegans*t alkalmazzuk a kórokozó paraziták modelljeként vizsgálatainkban. A felnőtt egyedeket a makrociklusos laktonok csoportjába tartozó ivermectinnel kezeljük, majd vizsgáljuk a kiválasztott transzportereket és metabolikus enzimeket kódoló gének kifejeződését.

5. Anyagok és módszerek

5.1. *Caenorhabditis elegans* fenntartása

A kísérlet során a feregtrözssek közül az N2, vagyis a vad, Bristol típust használtuk.

A *C. elegans* tenyészeteket NGM táptalajokon tartottuk, melyekhez OP50 *Escherichia coli* baktérium szuszpenziót adtunk, majd 15 °C-on tároltuk.

Az NGM táptalaj elkészítéséhez (500 ml, 20 db Petri-csésze) 1,5 g NaCl-ot, 1,25 g bacto peptont, 487,5 ml desztillált vizet, 10 g Bacto-Agart kevertünk össze, amit ezután autoklávba raktunk. A sterilizálás után 50 °C-ra hűtve 12,5 ml 1 M, pH 6, KPO₄ puffert, 0,5 ml 1 M CaCl₂-ot, 0,5 ml 1 M MgSO₄-ot és 0,5 ml, 5%-os koleszterint adtunk. Ezután 20 db, 60 mm átmérőjű Petri-csészébe öntöttük az agart és hagytuk megszilárdulni.

A baktériumokat LB (Luria-Bertani) folyékony táptalajban neveltük. A baktériumtenyészetet tartalmazó folyékony szuszpenziót pipetta segítségével rácseppentettük az NGM táptalajokra, majd a csészéket megdöntve eloszlattuk a felületen.

Az egyes férgeket egy platina tű segítségével helyeztük az NGM táptalajokra.

5.2 Hatóanyag, koncentráció

A kísérlet során a kiválasztott hatóanyag az ivermectin volt. A kezeléshez 2,5 nM ivermectin-tartalmú NGM agarlemezeket használtunk. Az ivermectint izopropil-alkoholban oldottuk fel, ezt követően az autoklávban sterilizált majd 50 °C-os hőmérsékletre hűtött tápoldathoz adtuk. A 10 µM koncentrációjú ivermectin oldatból 125 µl-t mértünk 500 ml NGM oldathoz, majd alaposan elkevertük mielőtt 60 mm átmérőjű Petri-csészébe öntöttük. A lemezeket további felhasználásig hűtőben tároltuk.

5.3 A kezelés

A kezelés előtt mintánként 20 lemezt alkalmaztunk, minden lemezre 25 állatot raktunk le, melyek 6 órán keresztül lerakták a petéiket, ezután a felnőtt állatokat eltávolítottuk a lemezekről. Ezzel egy szinkron kultúrát hoztunk létre, csak a tojások/embriók maradtak a lemezeken, melyeket L4 lárvastádiumig növesztettünk. Ezeket az L4 stádiumú állatokat mostuk át a 2,5 nM ivermectint tartalmazó lemezekre, illetve a kontroll állatokat NGM lemezre helyeztük. A kezelést 5 órán keresztül 23 °C-on végeztük, majd az inkubációs idő elteltét követően lemostuk és fagyasztócsövekbe mértük át az egyedeket, és az RNS izolálásig -80°C-ra helyeztük őket.

5.4 RNS izolálás

A *C. elegans* mintákat tartalmazó fagyasztócsöveket (4 kezelt és 4 kontroll mintát) jégen kiolvasztottuk, majd $3000 \times g$ -vel lecentrifugáltuk a csöveket. Ezután a felső tápfolyadék réteget eltávolítottuk róluk, majd csövenként 1 ml RNazol® RT (Sigma-Aldrich) izoláló folyadékot mértünk rájuk. Minden mintát 30 másodpercig 820-as fordulatszámra Potter-Elvehjem (Schuett-Biotech) készülékkel homogenizáltunk. Ezt követően a gyártói leírásnak megfelelően hajtottuk végre az RNS kinyerését.

5.5 Reverz transzkripció és kvantitatív PCR

A reverz transzkripcióhoz a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et (ThermoScientific) használtunk. Ehhez minden mintából 1000 ng mRNS-re volt szükség. A cDNS, úgynevezett komplementer DNS, szintézise során a gyártó utasításait követtük.

A kvantitatív PCR analízist a CFX Opus Real-Time PCR System (Bio-Rad) segítségével végeztük. A végső reakcióelegy, amelynek mennyisége 20 μ l volt, 0,2 μ M koncentrációban tartalmazta a megfelelő primereket és egyszeres koncentrációjú, nukleáz-mentes vízben oldott SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix-et (Bio-Rad) tartalmazott. 2 μ l cDNS mintát adtunk közvetlenül a PCR reakcióelegyhez minden alkalommal. Az ehhez szükséges primerek szekvencia adatait megtaláljuk az 1. táblázatban

A PCR reakció folyamata során először egy hosszabb, 3 perces inkubáció zajlott le 95 °C-on, majd ezt követte 40 ciklus; 95 °C 20 másodperc, 60 °C 30 másodperc 72 °C 30 másodperc. Minden egyes ciklus végén egy 10 másodperces fluoreszcens leolvasást végeztünk, a 40 ciklusból álló rész után pedig olvadásgörbe analízist hajtottunk végre.

5.6 Statisztikai analízis

A kiválasztott gének relatív expressziós szintjeit, illetve a statisztikai analízist a CFX Maestro Software 2.3-mal végeztük. A középértékek közötti különbségek kiértékelését egyszempontos varianciaanalízissel végeztük (ANOVA), majd ezt követően a „post hoc” összehasonlításhoz Tukey 'Honest Significant Difference' módszerét alkalmaztuk. A különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05 ($p < 0,05$).

1. táblázat A qPCR során használt primerek szekvencia adatai

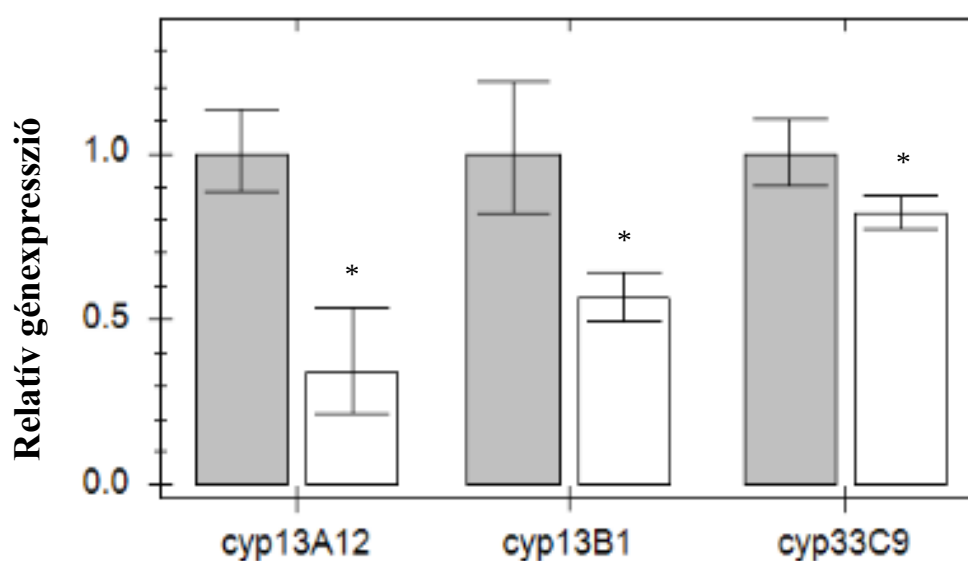
Gén	Kódolt fehérje	primer		bp		Forrás
actin-4	Actin 4	F	CGAGCGTTTCCGTTGC	176	referencia	Ardelli et al. 2009.
		R	CGGCGATTCCTGGGT			
cyp13A12	Cytochrome P450 CYP13A12	F	TGGCAACTCACCCAAAGGTT	244	teszt	Saját
		R	TGAAGTGTCCATGTGTGCGCA			
cyp13B1	Cytochrome P450 CYP13B1	F	CTTGAGAGCTTTGGCATCGC	189	teszt	Saját
		R	GGTTGCCCCATAGCAAGTCT			
cyp33C9	Cytochrome P450 CYP33C9	F	CGGGGACTTTGAGTCGTTCA	187	teszt	Saját
		R	GTTGATGTGTGCTCGCTTC			
pgp-1	Multidrug resistance protein pgp-1	F	GTTTAGCACCTGAAGATGTCC	210	teszt	Ardelli et al. 2009.
		R	CGGTAATAACTGCGACGAGAG			
pgp-5	Multidrug resistance protein pgp-5	F	AGGAGCTCAACTTTCGGGTG	193	teszt	Ardelli et al. 2009.
		R	TGTGGACAATCTGTGGGCAA			
pgp-12	Multidrug resistance protein pgp-12	F	TCCGTTGAGAACCTTTACC	225	teszt	Ardelli et al. 2009.
		R	ATGCTCATTGGTGCCTAC			
pgp-13	Multidrug resistance protein pgp-13	F	TGCTTTGATCAGAGGGCTCG	234	teszt	Saját
		R	TTTCGAAAAGCAGCAACCCG			

Rövidítések: cyp: citokróm P450; pgp: P-glikoprotein, bp: bázispár, F: forward, R: reverse

6. Eredmények

A kísérlet során kiválasztottunk 3 db *cyp* gént (*cyp13a12*, *cyp13b1*, *cyp33c9*) és 4 db *pgp*-t (*pgp-1*, *pgp-5*, *pgp-12*, *pgp-13*).

A kapott eredményeket oszlopdiagramon ábrázoltuk (5. és 6. ábra). Mindkét ábra esetében az első oszlop jelöli a kontroll, míg a második oszlop az 5 órán keresztül, 2,5 nM ivermectinnel kezelt minták eredményeit. Azokat az eredményeket, amelyek szignifikánsan megváltoztak, tehát a P értéke kisebb volt, mint 0,05, azokat csillaggal (*)



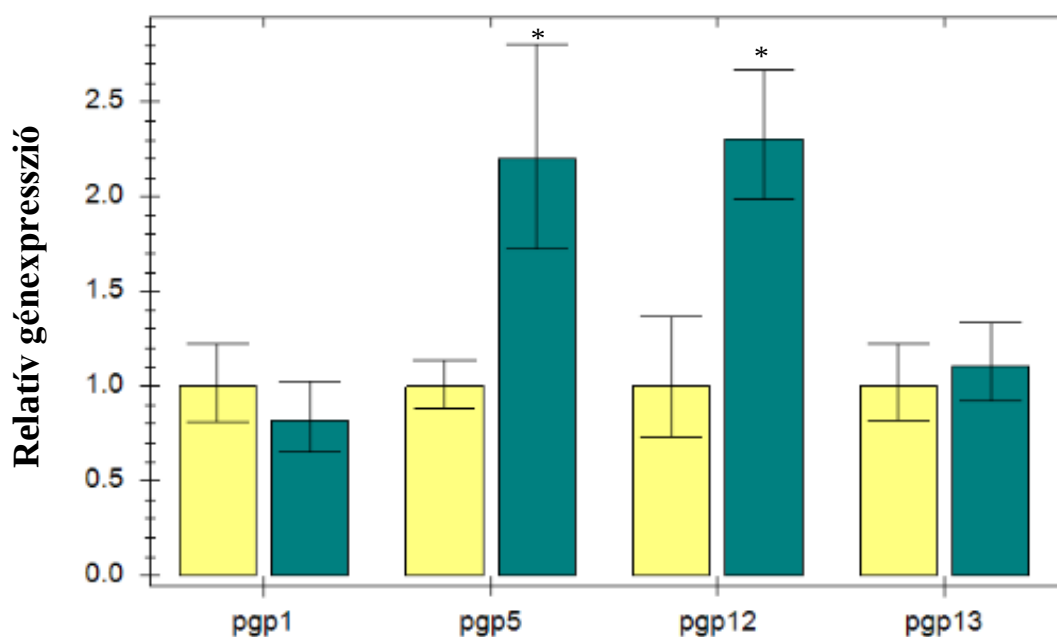
5. ábra A különböző CYP450 (*cyp*) gének expressziói ivermectinnel történő kezelés után. Szürke színnel a kontroll, fehér színnel a 2,5 nM ivermectinnel 5 órán keresztül kezelt csoportok vannak jelölve. * $p < 0,05$

jelöltük.

Az 5. ábrán láthatjuk, hogy a *cyp* gének közül mindhárom, tehát a *cyp13A12*, *cyp13B1* és a *cyp33C9* is szignifikánsan csökkent az ivermectin kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest.

Az *pgp* gének esetében az előzőektől eltérő eredményt kaptunk. Ebben az esetben vagy nem volt változás, vagy emelkedés volt megfigyelhető.

A 6. ábráról leolvashatjuk, hogy a *pgp-1* és a *pgp-13* kapcsán nem volt eltérés, míg a *pgp-5* és a *pgp-12* szignifikánsan emelkedett.



6. ábra A különböző P-glikoprotein (pgp) gének expressziói ivermectinnel történő kezelés után. Sárga színnel a kontroll, zöld színnel a 2,5 nM ivermectinnel 5 órán keresztül kezelt csoportok vannak jelölve. * $p < 0,05$

Továbbá, vizsgáltuk a *pgp-7* gén kifejeződését is, azonban ebben az esetben nem kaptunk értékelhető eredményt, mivel a PCR reakció során nem képződött termék. E miatt ennek a génnek az adatait nem mutattuk be a dolgozatban.

7. Megbeszélés

A parazitikus nematodák veszélyt jelentenek az emberek és állatok egészségére egyaránt, miközben a makrociklusos laktonok (többek között az ivermectin) ellen kialakuló rezisztencia csak tovább súlyosbítja a helyzetet. Ezért is döntő fontosságú a rezisztencia alapjául szolgáló molekuláris folyamatok megértése (Dube és mtsi., 2023).

Azok a fő mechanizmusok, melyek szerepet játszanak a csökkent érzékenység kialakulásában, többek között a fokozott efflux tevékenység a paraziták sejtjeiben, a gyógyszer metabolizmus emelkedett aktivitása, a receptor kötőhelyek megváltozása és csökkenő száma (Fissiha és Kinde, 2021).

A gyógyszer rezisztenciát összekapcsolták a fokozott gyógyszer effluxszal, ami az ABC transzporter génjeinek fokozódó aktiválódásának köszönhető. Néhány makrociklusos lakton, köztük az ivermectin is az ABC transzporterek egyik jelentős szubsztrátja. Ezen transzporter gének szelektelődése összefüggésben van számos parazitikus nematoda faj esetében az ivermectin elleni rezisztenciával (Yan és mtsi., 2012).

Az ABC transzporterek közül kiemelendő a PGP (P-glikoprotein), amely efflux pumpaként felelős a gyógyszer-molekulák eltávolításáért a sejt belsejéből (Dube és mtsi., 2023). Egyes *pgp* gének megnövekedett expressziójának eredménye a fokozott rezisztencia volt az ivermectinnel szemben. Más részről a *pgp-1*, *-5*, *-6*, *-12* és *-13* gének inaktiválása növelte az érzékenységet az ivermectinnel szemben (Holden-Dye és Walker, 2014).

A CYP 450 (citókróm P450) enzimesalád tagjait szinte az összes élő organizmusban megtalálhatjuk (Laing és mtsi., 2015), emellett pedig fontos szerepük van a gyógyszerek metabolizmusának folyamataiban (Yilmaz és mtsi., 2019). A kiválasztott 3 db *cyp* gén (*cyp13A12*, *cyp13B1*, *cyp33C9*) mindegyikénél szignifikáns csökkenést tapasztaltunk.

A *cyp* géneket a parazitikus nematodák esetében kevésbé vizsgálták, illetve eddig nincs egyértelmű bizonyíték arra, hogy ezeknek a géneknek egyáltalán szerepük lenne a makrociklusos laktonok metabolizmusában (Yilmaz és mtsi., 2019). Tudomásunk szerint, a féregellenes szerekkel kapcsolatban a CYP 450 enzimesalád génkészletének változását eddig még nem írták le *C. elegans* fajban.

A *pgp-7* esetében azért nem kaptunk értékelhető eredményt, mivel az a hím farok régióban fejeződik ki (Bygarski és mtsai. 2014), azonban a mi vizsgálataink során, a hermaphrodita

azaz nőstény egyedek voltak többségben, így a hím farok régióból valószínűleg nem képződött értékelhető mennyiségű RNS.

A további két *pqp* gén a *pqp-1* és a *pqp-13* esetén nem volt változás az mRNS mennyiségben, hasonló eredményre jutottak Ardelli és Prichard (2013) is, ebben az esetben a 2,5 órás ivermectin kezelésnek nem volt hatása ennek a két *pqp*-nek a kifejeződésére vad típusú *C. elegans*-ban, azonban a *pqp-5* szignifikánsan emelkedett. Eredményeink összevethetőek egy másik hasonló kutatással, melynek során a másfél órán át tartó ivermectin kezelés mind a négy általunk is vizsgált *pqp* kifejeződését megemelte a kezeletlen kontroll állatokkal összehasonlítva, a Bristol N2 törzsben (Bygarski és mtsai., 2014). A mi vizsgálatunkban az 5 órás ivermectin kezelés a *pqp-1* és -13 esetében nem okozott génexpresszió növekedést, míg a *pqp-5* és *pqp-12* esetében szignifikáns emelkedés mutatkozott.

Több kutatás során ivermectin-rezisztens *C. elegans* törzseket használnak az ivermectinnel, vagy más féregellenes hatóanyaggal történő kezelés során (Yan és mtsai., 2012, Ardelli és mtsai., 2009, Janssen és mtsai., 2013). Mi a vizsgálataink során azért a vad típusal dolgoztunk, mert a fenotípusos csökkent érzékenységről szerettünk volna információt gyűjteni, az ivermectin-rezisztens törzsekben azonban már genotípusos változások akadályozzák az ivermectin hatékonyságát. Az ilyen törzseket a már rezisztens kórokozó féregfajok modelljeként lehetne alkalmazni.

Eredményeinket szeretnénk igazolni parazita féregfajokban is. Azonban, ezek a paraziták bár begyűjthetőek, rajtuk *in vitro* kezelést már nem tudunk végezni, hiszen ezek Petri-csészében nem élnek túl. A csökkent érzékenységre a gazdaállat kezelési protokolljának megismerésével következtethetnénk.

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálataink jó kiindulópontot szolgáltatnak az elkövetkezendőkben majd más hatóanyagok vizsgálatára, hiszen az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben a szakirodalomban megjelent adatokkal összevethető eredményeket kaptunk.

Elmondhatjuk, hogy kutatásunk a féreghajtókkal szembeni rezisztencia kialakulásáról és terjedéséről világosabb információk megszerzését segíti elő. Ezen ismeretek segítségével hosszú távon, akár a féreghajtók megfelelőbb alkalmazása érhető el. Ezen túlmenően új, kizárólag a fonálférgekben specifikusan jelenlevő mechanizmusokat célzó féreghajtó hatóanyagok kifejlesztése is lehetségessé válhat.

8. Összefoglalás

A haszonállattartásban a különböző parazita férgek okozta fertőzések világszerte jelentős gazdasági kárt okoznak. A modern féregellenes hatóanyagok rendszeres alkalmazása jelentősen mérsékelte a termelés kiesést és a fertőzött egyedek elhullását. Azonban tartós adagolásuk klinikailag is jelentős mértékű rezisztencia kifejlődését és elterjedését okozta a napjainkban rendelkezésre álló gyógyszerekkel szemben. Ennek kialakulásában a túlhasználat mellett a szakszerűtlen adagolás (pl. alul dózírozás), és nem megfelelő hatóanyag választása (pl. téves diagnózis) is szerepet játszik. Napjainkra az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia mellett, a féreghajtókkal szembeni fokozott ellenállás jelenti a másik számottevő kihívást az állatorvosok és állattartók számára.

Vizsgálatunkban célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a szubletális dózisban adott ivermectinnek – mint a gyakorlatban az egyik leggyakrabban alkalmazott nematoda-ellenes szernek - milyen közvetlen hatása lehet a kezelt nematodákra. A kísérleteinket a *Caenorhabditis elegans* nevű talajféreggel (*Ordo: Rhabditida*) végeztük. Könnyű tenyésztése és fenntartása miatt ez a faj a nemzetközi tudományos életben elfogadott és gyakran használt modellállat, beleértve a parazitikus nematodákkal kapcsolatos vizsgálatokat is.

A kísérletek során Bristol N2 vad típusú *C. elegans* törzset alkalmaztunk, melyeket NGM (nematode growth medium) táptalajon tartottunk fent és *E. coli* OP50 baktériumtörzs tenyészetével tápláltuk. A kezeléshez 2,5 nM ivermectin-tartalmú NGM agarlemezeket használtunk. A kezelés előtt szikrontenyészetet hoztunk létre, tehát minden lemezen L4 lárvákat tartottunk fent. Ezeket az állatokat mostuk át az ivermectint tartalmazó lemezekre, valamint a kontroll állatokat ivermectint nem tartalmazó NGM agarlemezekre. Az 5 órás inkubáció eltelte után a kontroll és a kezelt csoportokból mRNS-t nyertünk ki. Majd három kiválasztott *cyp* (citokróm P450) gén, illetve négy *pgp* (P-glikoprotein) gén kifejeződését vizsgáltuk qPCR módszerrel.

Eredményeink azt mutatják, hogy az ivermectin kezelés hatására a *cyp13A12* és a *cyp13B1* gének expressziója lecsökkent, valamint a *pgp5* és a *pgp12* transzporterfehérjét kódoló gének kifejeződése megemelkedett. Mind a lebontó enzimek mennyiségének és aktivitásának csökkenése, mind a szállító molekulák megnövekedett mennyisége és aktivitása csökkent gyógyszerhatáshoz vezet.

Vizsgálataink elősegíthetik, hogy pontosabb információt kaphassunk a féregellenes szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásáról és terjedéséről. Ezen ismeretek segítségével szakszerűbb féregellenes gyógyszerhasználat érhető el, továbbá új támadáspontú és hatásmechanizmusú antiparazitikumok fejlesztése válik lehetővé.

9. Summary

In livestock production, infections caused by different parasites lead to major economic loss worldwide. The regular use of modern anthelmintic drugs significantly reduced the production loss and the lethality of infected animals. However, the permanent use of these drugs that are available nowadays led to clinically significant evolvement and spread of resistance. Besides the overuse, the inappropriate dosing (e.g., underdosing) and choice of medications (e.g., improper diagnosis) also play important role in the development of resistance. Nowadays the increased resistance against the anthelmintics alongside the antimicrobial resistance cause a considerable challenge for the livestock farmers and veterinarian practitioner as well.

In our study, we aimed to investigate the direct impact of sublethal dose of ivermectin on the treated nematodes, because ivermectin is one of the most frequently used antinematodal drug in the veterinary practice. During the experiment we used a soil worm/free living nematode called *Caenorhabditis elegans* (Ordo: Rhabditida). Because of its easy culturing and maintenance this species is an accepted and frequently used model in the international scientific research including studies in connection with parasitic nematodes.

During the experiment we used the wild type *C. elegans* strain, Bristol N2. They were maintained on NGM (nematode growth medium) substrate feeding on a bacteria strain that we cultured, called *E. coli* OP50. For the treatment we used NGM agar plates containing 2.5 nM ivermectin. Before the treatment we created a synchronized culture, which means that we maintained L4 larvae on each plate. These nematodes were washed onto plates containing ivermectin, and the other, control worms onto NGM plates without ivermectin. After the 5 hours long incubation we extracted mRNA from both groups – the control and the treated. After that the expression of 3 of the *cyp* (cytochrome P450) and 4 of the *pgp* (P-glycoprotein) genes were chosen to be examined by qPCR method.

Results showed that the expression of *cyp13A12* and *cyp13B1* genes decreased, while the expression of the *pgp-5* and *pgp-12* transport protein genes increased. The decrease of the quantity and the activity of the drug metabolizing enzymes together with the increase of the quantity and the activity of the transport molecules may lead to reduced efficacy of the drugs.

Our research promotes to obtain clearer information of the development and spreading of the resistance to anthelmintic drugs. With the help of these knowledge a more appropriate use of the anthelmintic drugs can be achieved. In addition, development of new anthelmintics targeting mechanisms exclusively present in nematodes might be also possible.

10. Irodalomjegyzék

- Abongwa, M., Martin, R. J., & Robertson, A. P. (2017). A BRIEF REVIEW ON THE MODE OF ACTION OF ANTINEMATODAL DRUGS. *Acta veterinaria*, 67(2), 137–152. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0013>
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Introduction. In *WormAtlas*. [doi:10.3908/wormatlas.1.1](https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1)
- Ardelli B. F., Stitt L. E., Tompkins J. B., Prichard R. K. (2009). A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.043>.
- Ardelli B. F., Prichard R. K. (2013). Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin, *Veterinary Parasitology*, 191 (3–4), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.021>.
- Blackhall, W. J., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (2003). Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Molecular and biochemical parasitology*, 131(2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00201-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00201-9)
- Burns, A. R., Luciani, G. M., Musso, G., Bagg, R., Yeo, M., Zhang, Y., Rajendran, L., Glavin, J., Hunter, R., Redman, E., Stasiuk, S., Schertzberg, M., Angus McQuibban, G., Caffrey, C. R., Cutler, S. R., Tyers, M., Giaever, G., Nislow, C., Fraser, A. G., MacRae, C. A., ... Roy, P. J. (2015). *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature communications*, 6, 7485. <https://doi.org/10.1038/ncomms8485>
- Bygarski E. E., Prichard R. K., Ardelli B.F. (2014). Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.06.002>.
- Campbell, W.C. (1989). Use of Ivermectin in Dogs and Cats. In: Campbell, W.C. (eds) *Ivermectin and Abamectin*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_18

- Choudhary, S., Abongwa, M., Kashyap, S. S., Verma, S., Mair, G. R., Kulke, D., Martin, R. J., & Robertson, A. P. (2022). Nodulisporic acid produces direct activation and positive allosteric modulation of AVR-14B, a glutamate-gated chloride channel from adult *Brugia malayi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(34), e2111932119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111932119>
- Corsi A.K., Wightman B., and Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* (June 18, 2015), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. In: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018. Figure 2, [Life Cycle of *C. elegans*...]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299460/figure/celegansintro_figure2/
- Dube F, Hinas A, Delhomme N, Åbrink M, Svård S, et al. (2023) Transcriptomics of ivermectin response in *Caenorhabditis elegans*: Integrating abamectin quantitative trait loci and comparison to the Ivermectin-exposed DA1316 strain. *PLOS ONE* 18(5): e0285262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285262>
- Fellowes, R. A., Maule, A. G., Martin, R. J., Geary, T. G., Thompson, D. P., Kimber, M. J., Marks, N. J., & Halton, D. W. (2000). Classical neurotransmitters in the ovijector of *Ascaris suum*: localization and modulation of muscle activity. *Parasitology*, 121 (Pt 3), 325–336. <https://doi.org/10.1017/s0031182099006290>
- Fisher, M.H., Mrozik, H. (1989). Chemistry. In: Campbell, W.C. (eds) *Ivermectin and Abamectin*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_1
- Fissiha, W., & Kinde, M. Z. (2021). Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infection and drug resistance*, 14, 5403–5410. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332378>
- Forrester, S. G., Prichard, R. K., Dent, J. A., & Beech, R. N. (2003). *Haemonchus contortus*: HcGluCla expressed in *Xenopus* oocytes forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin.

- Molecular and biochemical parasitology*, 129(1), 115–121.
[https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00102-6](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00102-6)
- Frézal, L., Félix, MA. The Natural History of Model Organisms: *C. elegans* outside the Petri dish (2015), *eLife* 4:e05849. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>
- Geary, T. G., Sangster, N. C., & Thompson, D. P. (1999). Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Veterinary parasitology*, 84(3-4), 275–295.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00042-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00042-4)
- Herndon, L., Wolkow, C., Driscoll, M., Hall, D. (2017). Effects of Ageing on the Basic Biology and Anatomy of *C. elegans*. 10.1007/978-3-319-44703-2_2.
- Holden-Dye, L., & Walker, R. J. (2014). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.2>
- Holden-Dye L. and Walker R.J. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans* (December 16, 2014), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.143.2, <http://www.wormbook.org>.
- Janssen I.J.I., Krücken J., Demeler J., von Samson-Himmelstjerna G. (2013), *Caenorhabditis elegans*: Modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains, *Experimental Parasitology*, 134 (2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.005>.
- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*, 186 (1-2), 70–78.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Laing, R., Bartley, D. J., Morrison, A. A., Rezansoff, A., Martinelli, A., Laing, S. T., & Gilleard, J. S. (2015). The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 45(4), 243–251.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.001>
- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Sutra, J. F., Galtier, P., Alvinerie, M., & Lanusse, C. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Veterinary parasitology*, 87(4), 327–338.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00175-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00175-2)

- Martin, R. J., Robertson, A. P., & Wolstenholme, A. J. (2002). Mode of action of the macrocyclic lactones. In J. Vercruysse, & R. S. Rew (Eds.), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy* (pp. 125-140). CABI publishing.
- Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., & Rose, J. K. (2019). Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19, e35. doi: 10.1002/cpet.35
- Nipane SF, Mishra B, Panchbuddhe AN. Anthelmintic resistance—clinician’s present concern. *Vet World*. 2008;1(9):281.
- Ow, M.C., Hall, S.E. (2015). A Method for Obtaining Large Populations of Synchronized *Caenorhabditis elegans* Dauer Larvae. In: Biron, D., Haspel, G. (eds) *C. elegans. Methods in Molecular Biology*, vol 1327. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2842-2_15
- Park, H. H., Jung, Y., & Lee, S. V. (2017). Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and cells*, 40(2), 90–99. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
- Perez-Cogollo, L. C., Rodriguez-Vivas, R. I., Ramirez-Cruz, G. T., & Miller, R. J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary parasitology*, 168 (1-2), 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>
- Riviere, J. E. & Papich, M. G. (2018). Macrocyclic Lactones: Endectocide Compounds. In C. E. Lanusse, F. A. Imperiale & A. L. Lifschitz (Eds.), *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 10(41), 1102-1127.
- Shubin K, Bērziņš A, Belyakov S. Crystal Structures of New Ivermectin Pseudopolymorphs. *Crystals*. 2021; 11(2):172. <https://doi.org/10.3390/cryst11020172>
- Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (February 11, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.
- Wixon, J., Blaxter, M., Hope, I., Barstead, R., & Kim, S. (2000). *Caenorhabditis elegans*. *Yeast* (Chichester, England), 17 (1), 37–42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)17:1<37::AID-YEA11>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)17:1<37::AID-YEA11>3.0.CO;2-P)

- Yan, R., Urdaneta-Marquez, L., Keller, K., James, C. E., Davey, M. W., & Prichard, R. K. (2012). *The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology*, 190 (3-4), 519–529. doi:10.1016/j.vetpar.2012.06.038
- Yilmaz, E., Gerst, B., McKay-Demeler, J., & Krücken, J. (2019). *Minimal modulation of macrocyclic lactone susceptibility in Caenorhabditis elegans following inhibition of cytochrome P450 monooxygenase activity*. *Experimental Parasitology*, 200, 61–66. doi:10.1016/j.exppara.2019.03.017

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Csikó Györgynek, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék docensének és Vellainé Dr. Takács Krisztinának, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karának docensének. Köszönöm, hogy szeretettel fogadtak és bármikor szükségem volt rájuk, készségesen segítettek és támogattak, időt és fáradságot nem sajnálva.

Hálával tartozom Dr. Palócz Orsolyának és Dr. Farkas Zsoltnak a laboratóriumi kísérletek során nyújtott sok-sok segítségért, a hasznos tanácsokért és elméleti tudásért és fáradhatatlan munkájukért. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Jerzsele Ákosnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, a páromnak, illetve minden barátomnak és ismerősömnek, hogy a nehéz pillanatokban mellettem álltak és mindig számíthattam rájuk, hogy mindvégig támogattak és segítettek ott, ahol tudtak.

A vizsgálatok részben a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alap K134285 számú projekt támogatásával valósultak meg.