



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

**KONSTITUTIVNÍ EXPRESE UDP-  
GLUKOSYLTRANSFERAS VLASOVKY SLEZOVÉ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Lucie Nekovová

# PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové, dne

Podpis:

# PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří mé vedoucí školitelce Ing. Petře Matouškové za to, že jsem měla tu možnost provádět experiment pod jejím odborným vedením, za její trpělivost a připomínky a také za zkušenosti, které jsem díky ní získala. Katedře biochemických věd děkuji za umožnění realizace této práce a možnost nahlédnout tak do tajů vědeckého výzkumu. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Nekovové za pomoc při gramatických a interpunkčních výzvách. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině za podporu, nejen při psaní této diplomové práce, ale i při celém studiu.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Lucie Nekovová

Školitel: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Konstitutivní exprese UDP-glukosyltransferas vlasovky slezové

Hemonchóza způsobená gastrointestinální hlísticí *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová) je jedním z nejčastějších parazitárních onemocnění malých přežvýkavců. Napadení chovu tímto krev sajícím parazitem znamená nejen závažné poškození zdraví zvířat, ale i s tím související sníženou produktivitu a ekonomické ztráty. Anthelmintika využívaná pro léčbu hemonchóz jsou často nedostatečně účinná z důvodu celosvětově se rozvíjející rezistence. Znalosti mechanismů způsobující rezistenci nejsou stále dostačující, a proto je kladeno velké úsilí na odhalení faktorů, které by mohly být jejich příčinou. Jedním z důvodů vzniku rezistence se zdají být změny biotransformačních enzymů a jejich exprese. U *H. contortus* bylo nalezeno více jak 40 genů kódujících různé druhy UDP-glukosyltransferas (UGT). UGT jsou hlavními enzymy spojovanými s deaktivací (glykosylací) léčiv u hlístic. Proto se tato práce zaměřuje především na rodinu UGT s cílem analyzovat pomocí qPCR změny v expresi těchto genů u citlivých (ISE) a rezistentních (WR) kmenů vlasovky slezové. 11 genů UGT z kmene ISE a WR, rozdělených dle pohlaví, bylo pomocí metody real-time PCR analyzováno a byla sledována jejich exprese. Signifikantní zvýšení exprese bylo pozorováno u UGT366A1, a to u obou pohlaví rezistentního WR kmene. V experimentu bylo zjištěno, že k vyšší expresi dochází především u samců. Snížení exprese bylo pozorováno u samic i samců u dvou UGT rezistentního WR kmene, konkrétně UGT365B4 a UGT365B5. Tyto obměny exprese mohou znamenat možnost účasti UGT při změnách metabolismu anthelmintik a vzniku rezistence.

# ABSTRACT

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

Candidate: Lucie Nekovová

Supervisor: Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Constitutive expression of UDP-glucosyltransferases from *Haemonchus contortus*

Haemonchosis is one of the most frequent parasitic disease on small ruminants caused by gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. Attack of this blood sucking parasite does not mean only serious health damage but also lower productivity and economic losses. Anthelmintics are used as a medical treatment of haemonchosis however they are often insufficient because of worldwide developing resistance. Knowledge of mechanisms causing resistance is still not sufficient, therefore much effort is spent in order to find the factors which could be their source. It appears that changes of biotransformation enzymes and their expression might be one of the reason for resistance. At *H. contortus* more than 40 genes which code a different types of UDP-glucosyltransferases (UGTs) have been found. UGTs are the main enzymes in nematode which are connected with a deactivation of drugs (glycosylation). Therefore this thesis is focused especially on UGT family with the main goal to analyse changes in expression of these genes of susceptible (ISE) and resistant (WR) strains of *H. contortus* by qPCR. 11 UGT genes of strains ISE and WR, divided by sex, were analysed by Real-Time PCR method and their expression was monitored. Significant increase of expression was observed for UGT366A1 of both sexes in resistant WR strain. The experiment had shown that higher expression occurs primarily in males. Lower expression was observed in two UGTs of both sexes in resistant WR strain, UGT365B4 and UGT365B5 specifically. These changes of expression could mean the possible participation of UGT during changes in anthelmintics metabolism and occurrence of resistance.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 Helminté.....	11
2.1.1 Nematoda .....	12
2.2 Vlasovka slezová.....	16
2.3 Terapie hemonchóz .....	18
2.3.1 Anthelmintika.....	19
2.3.2 Prevence a zoohygienická opatření .....	21
2.3.3 Biologická kontrola .....	22
2.4 Diagnostika .....	23
2.4.1 Klinické příznaky .....	23
2.4.2 Koprologické vyšetření .....	25
2.4.3 Biochemické a imunologické testy .....	25
2.4.4 Molekulární diagnostika.....	25
2.5 Rezistence .....	26
2.5.1 Rezistence benzimidazolů.....	27
2.5.2 Rezistence na ivermektin .....	27
2.5.3 Rezistence na monepantel .....	27
2.5.4 Rezistence u <i>Haemonchus contortus</i> .....	28
2.5.5 Testování rezistence .....	28
2.6 Metabolismus xenobiotik .....	29
2.6.1 Xenobiotika a hlístice.....	30
3. CÍL PRÁCE.....	34

4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
4.1	Biologický materiál, přístrojové vybavení a chemická reagentia .....	35
4.1.1	Biologický materiál .....	35
4.1.2	Přístrojové vybavení.....	35
4.1.3	Pomůcky.....	36
4.1.4	Chemická reagentia .....	36
4.2	Pracovní postupy .....	36
4.2.1	Zpracování vzorků a izolace RNA .....	36
4.2.2	Ošetření DNAsou .....	38
4.2.3	Reverzní transkripce.....	38
4.2.4	Real-Time PCR .....	40
4.2.5	Statistické vyhodnocení dat.....	43
5.	VÝSLEDKY.....	44
5.1	Hodnocení koncentrace a integrity RNA .....	45
5.2	Analýza konstitutivní genové exprese .....	48
6.	DISKUSE .....	51
7.	ZÁVĚR.....	53
8.	POUŽITÉ ZKRATKY .....	54
9.	POUŽITÁ LITERATURA.....	56
9.1	Elektronické zdroje .....	62



# 1. ÚVOD

Helminti jsou typickými parazity ovcí, koz a také skotu. Mezi nejrozšířenější patří *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová). Tento červ nitkovitého tvaru narušuje svým kyjovitým zubem cévy v gastrointestinálním traktu především u ovcí a koz. Vyskytuje se převážně ve vlhkých teplých oblastech, ale díky změnám klimatu se s ním můžeme setkat i u chovů v severní Evropě. V ohrožení jsou především menší zvířata a mláďata, která v důsledku napadení parazitem mohou trpět mimo jiné kachexií, anemií a v krajním případě může dojít až k úhynu. Předcházení a aktivní kontrola helmintózy je v současnosti založena na kombinaci zoohygienických opatření v prostředí chovu a podání antinematod hostitelským zvířatům (Lamka a Ducháček 2014).

Mezi používaná léčiva se řadí benziimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony a aminoacetonitrilové deriváty. I přes vysokou účinnost, relativní bezpečnost a dostupnost terapie skýtá léčba vážný problém způsobený nadužíváním anthelmintik, a tím je rezistence. Helmintherezistence je jedním z nejzávažnějších problémů veterinární parazitologie nejen z hlediska zdraví a produktivity chovů, ale také zvýšením ekonomických nákladů na léčbu.

O rezistenci se jedná, pokud se v populaci hlístic vyskytuje vysoké procento parazitů nereagujících na doporučenou dávku léčiva, která je běžně účinná u citlivých jedinců. Dlouhodobé a často zbytečné využívání léčby, její použití jako jediné metody k potlačení množení parazitů, neznalost a nerespektování epizootologie, výrazně přispěli k rozvoji rezistence. Ve státech jižní polokoule je vzrůstajícím problémem také vznik tzv. multirezistence, rezistence proti více druhům dostupných anthelmintik. Jelikož je rezistence dědičná, v mnoha případech je v populaci hlístic rozšířena natolik, že v těchto podmínkách už není možné udržet chov. Rezistence se vyvíjí rychle a paradoxně k ní dochází ještě rychleji, čím je léčivo účinnější a čím má delší účinek. Dnes je všeobecně využíván přístup tzv. cílené selektivní léčby (TST-targeted selective treatment). Při níž jsou ošetřováni jen jedinci, kteří dle klinických příznaků léčbu opravdu potřebují. Principem je zachování tzv. refugií, části populace parazita nevystavené působení léčiva. Tím je umožněno udržovat citlivé alely v populaci díky následnému páření citlivých kmenů s rezistentními (Vadlejch a Langrová 2014).

Existuje mnoho mechanismů a faktorů způsobujících rezistenci a velká většina z nich zatím nebyla pochopena. Rozvoj rezistence může být usnadněn pomocí enzymů metabolizujících xenobiotika (XME). Ve všech organismech totiž slouží XME k metabolismu některých endogenních sloučenin a k ochraně před cizorodými látkami. Mnoho studií spojuje rezistenci u hlístic se zvýšenou expresí těchto detoxikačních enzymů. Opakovaným podáváním léčiv dochází k indukci specifických enzymů, což může mít za následek usnadnění rozvoje rezistence. K deaktivaci xenobiotika dochází ve dvou fázích. V I. fázi dochází k tvorbě hydrofilnějších derivátů pomocí oxidace, redukce a hydrolýzy. Ve II. fázi biotransformace je u hlístic typické připojení aktivovaného cukerného zbytku k lipofilní sloučenině, tzv. glykosilace. (Cvilink *et al.* 2009, Matoušková *et al.* 2016, Vokřál *et al.* 2013, Vokřál *et al.* 2012).

Z důvodu celosvětového rozšíření hemonchóz a s tím související rezistencí na léčbu byl na naší fakultě vytvořen projekt: *UDP-glycosyltransferases in Haemonchus contortus – players in drug-resistance?* založený na klíčových poznatcích z předchozích studií se zaměřením na stanovení detoxikačních enzymů u vlasovky slezové. V tomto experimentu je zkoumán rozdíl v konstitutivní expresi UDP-glukosyltransferas u dvou rozdílných kmenů vlasovky slezové. Za použití qPCR byla analyzována změna genové exprese mezi samci a samicemi kmenů ISE (Inbred Susceptible Edinburg) a WR (White River).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Helminté

Jedná se o různorodou skupinu nepříbuzných organismů dříve uváděných jako Vermes (červi). Vědu, zabývající se jejich studiem, nazýváme helmintologií, onemocnění jimi způsobené pak jako helmintózy. Termín helminti, využívaný parazitology, dnes slouží většinou k označení zástupců parazitických kmenů Plathelminthes (ploší hlísti), Nemathelminthes (oblí hlísti) a Acanthocephala (vrtějši) (Horák a Scholz 1998). Systematické členění dělí kmen plochých hlístic na třídy *Trematoda*, *Monogenea* a *Cestoda*. Kmen oblí hlísti pak zahrnuje třídu *Nematoda*, kam spadá i *Haemonchus contortus*. V širším smyslu by mohl zahrnovat i zástupce parazitických ploštěnek (*Turbellaria*), vířníky (*Rotifera*), strunovce (*Nematomorpha*) či pijavky (*Hirudinea*).

Za helminty označujeme bilaterálně souměrné protostomní živočichy, kteří mohou mít během vývoje i několik životních cyklů (Volf *et al.* 2007). Podle jejich průběhu a počtu hostitelů mluvíme o geohelmintech s přímými, tzv. monoxenními cykly, nebo o biohelmintech s dvou-, tří-, výjimečně čtyř-hostitelskými cykly (dixenní, trixenní, tetraxenní). Vícečetné cykly probíhají s pomocí tzv. mezihostitelů, kteří slouží jen k larválnímu vývoji. V případě geohelmintů jde o napadení jednoho definitivního hostitele, ve kterém helminti pohlavně dospívají a reprodukují se (Kořínková, K. 2006). Některé druhy využívají tzv. paratenické hostitele, určené pouze k hromadění infekčních larev bez dalšího vývoje (Volf *et al.* 2007).

Parazitičtí helminti mohou do těla pronikat několika cestami. Perorálně pomocí predace nebo pozřením kontaminované stravy, perkutánně, spojivkovým vakem, kongenitálně, nebo dalšími tělními otvory (Kořínková, K. 2006). K napadení hostitele slouží přichycovací orgány a struktury, které napomáhají k uchycení či rozrušení hostitelské tkáně. Důležité funkce plní povrch parazita. Kromě tvorby vnější kostry, katalytické aktivity, sekrece a osmoregulace, ochrany proti enzymům a absorpce živin plní také funkci senzorickou (Horák a Scholz 1998).

### 2.1.1 Nematoda

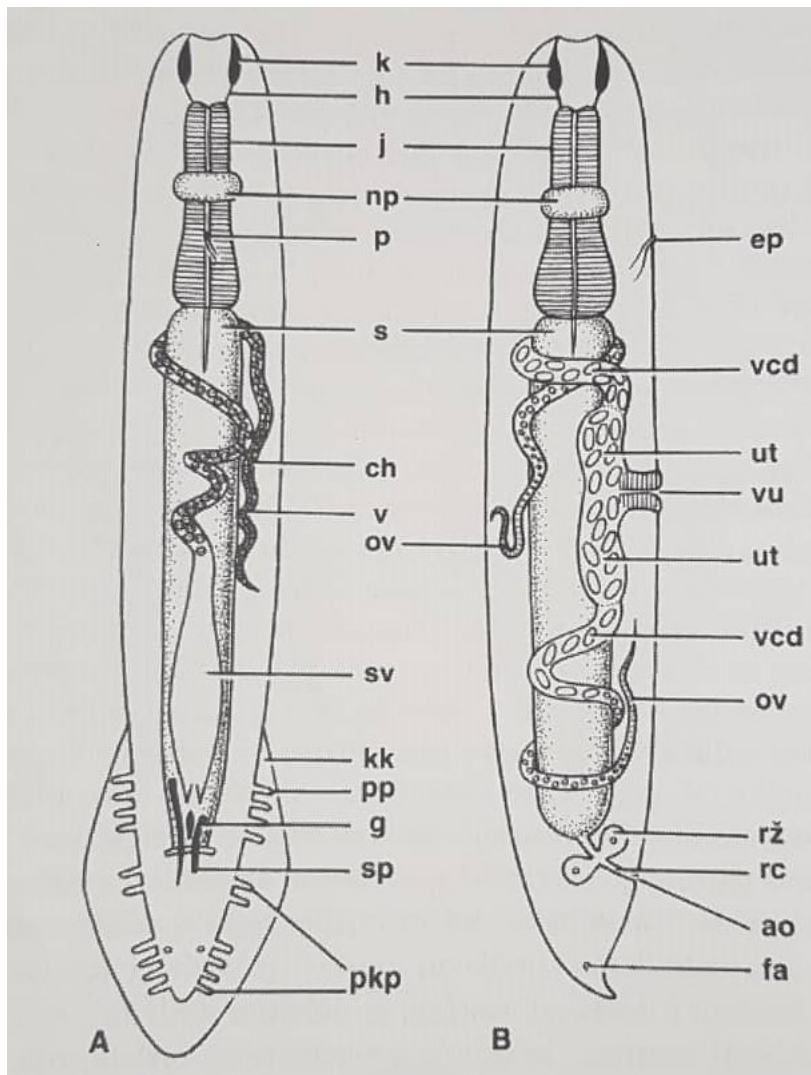
Třída Nematoda neboli hlístice je početná a nesourodá skupina čítající téměř 20 tisíc druhů. S pomocí klíčů dle Andersona a kol. (1974-83) můžeme klasifikovat hlístice do nadčeledí. Podle přítomnosti kaudálních sensorických orgánů neboli fazmidů, zas můžeme dělit hlístice do dvou podtříd, Aphasmidae (Adenophorea) a Phasmidea (Secernentea) a dále pak do řádů s nadčeledmi. Toto rozřazení však neodpovídá skutečným příbuzenským vztahům (Horák a Scholz 1998). Další členění jsou komplikovaná a stále se vyvíjejí díky novým poznatkům na molekulární úrovni.

S pomocí fosilních nálezů můžeme, na rozdíl od jiných kmenů, u hlístic lépe sledovat vývoj jednotlivých zástupců. Nejstarší doklady o neparazitických předchůdcích dnešních hlístic pochází z doby před 345 miliony let. Důkaz o parazitických zástupcích se objevuje až v období třetihor (eocén, oligocén). Předpokládá se vznik ze suchozemských půdních rhabditoidních hlístic.

Hlístice mají protáhlé nitkovité vřetenovité válcovité tělo dlouhé 0,3mm – 8,5 m. Barva je nejčastěji bělavá nebo krémová, někdy nažloutlá až hnědožlutá. Díky potravě (krev) nebo přítomnosti vajíček mohou být hlístice tmavě zbarveny. Jejich tělo má tři základní části. Přední (hlavová) slouží výhradně k příjmu potravy, a to pomocí kapsuly (ústní dutina). Má zvýšenou pohyblivost a napomáhá orientaci v prostoru pomocí hlavových papil (tango-, chemo-receptorů). Orgány střední části jsou spojeny s trávením potravy, pohlavními orgány (u samic) a jejich vyústěním. V zadní části je pak vývod střeva a samčích pohlavních orgánů (Ryšavý *et al.* 1989).

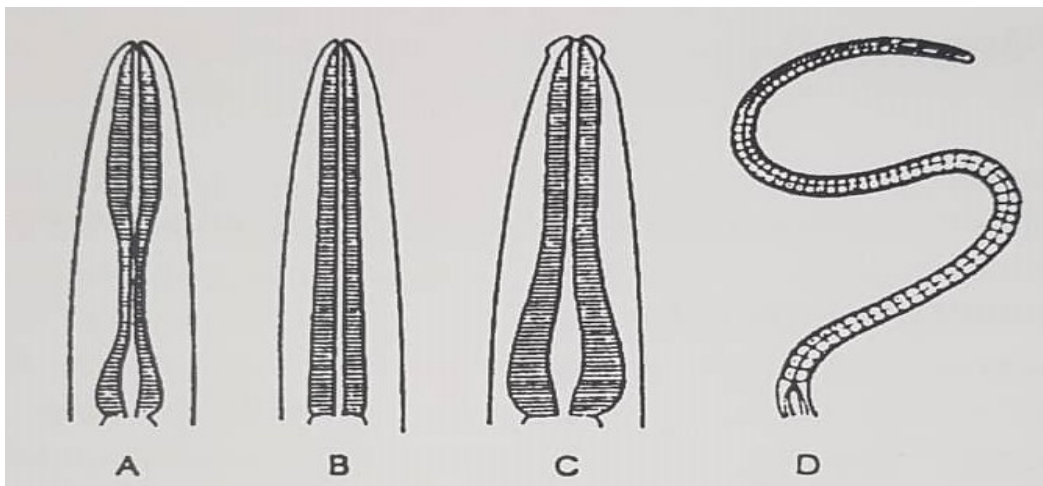
Povrch těla je chráněn pomocí kutikuly, která se může u jednotlivých druhů lišit (Volf *et al.* 2007). Kutikula neboli tegument je vytvářena jako mnohvrstevný útvar z hypodermis (epidermis). Slouží nejen k pohybu, ale i jako podpora stavby těla. Společně s pseudocoelem tvoří pomocí tělní tekutiny tvar těla. Dále slouží k ochraně, má osmoregulační funkci a obsahuje mnoho látek jako je kolagen, glykoproteiny nebo keratin. Hypodermis se nachází v tenké vrstvě mezi kutikulou a svalovými vlákny. Její výběžky zabíhají do těla (čtyři podélné lišty) v podobě různých útvarů a ornamentů typických pro jednotlivé druhy (rýhy, boční křídla, trny, papily) (Langrová *et al.* 2010). Pod vrstvou hypodermis najdeme podpovrchovou svalovinu tvořenou podélnými vlákny, díky kterým můžeme při příčném průřezu hlístice dále dělit, a to na polomyární, meromyární a holomyární (Horák a Scholz 1998). Tyto svazky svalů působí proti vnitřnímu hydrostatickému tlaku, který znesnadňuje mimo jiné polykání. Proto je

zapotřebí velkého svalového hltanu (někdy chybně označovaného jako jícen) k pumpování potravy do střeva (Volf *et al.* 2007). Všechny svaly jsou ovládány dvěma páry podélných nervových vláken, které jsou spojeny příčnými spojkami. Hltan je pak ovládán s pomocí hltanového (jícnového) nervového pletence spojeného s podélnými nervy různými ganglii (Jacobs *et al.* 2015).



**Obr. 1** Schematické znázornění základní morfologie hlístic: A – samec (ventrálně), B – samice (laterálně), k – ústní dutina, h – hltan, j – jícen, np – nervový prstenec, p, ep – exkretční porus, s – střevo, ch – chámovod, v – varle, ov – vaječníky, sv – semenný váček, kk – kaudální křídla, pp – prekloakální papily, g – gubernakulum, sp – spikuly, pcp – postkloakální papily, vcd – vejcovody, ut – uterus, vu – vulva, rz – rektální žlázy, re – rectum, ao – anální otvor, fa – fazmidy. (převzato z Volf *et al.* 2007, str.201)

Stejně dobře jako nervová soustava je u parazitických hlístic vyvinuto také trávicí ústrojí. Na jejich předním konci se nachází ústní otvor přizpůsobený přijímání specifické potravy, na konci opačném pak funkční anální otvor. (Horák a Scholz 1998). Část živin může být přijímána pomocí celé plochy těla (Volf *et al.* 2007). Ústní otvor je většinou vybaven různými pohyblivými útvary tzv. pysky (labia), které mohou být i ozubené. Hltan bývá rozdělen na žláznatou a svalnatou část, která slouží jako pumpa k nasávání potravy. Rozlišujeme čtyři základní typy hltanu tj.: rhabditoidní, strongyloidní, oxyuroidní a trichuroidní. Postupně se hltan rozšiřuje až na kulovitý útvar zvaný bulbus, který navazuje na střevo (Volf *et al.* 2007). Střevo je povětšinou jednoduchá trubice, u samic zakončená análním otvorem. U samců vyúsťuje střevo společně s vývody pohlavních žláz do kloaky. Na začátku střeva se může vyskytovat caecum (slepé střevo) (Volf *et al.* 2007).



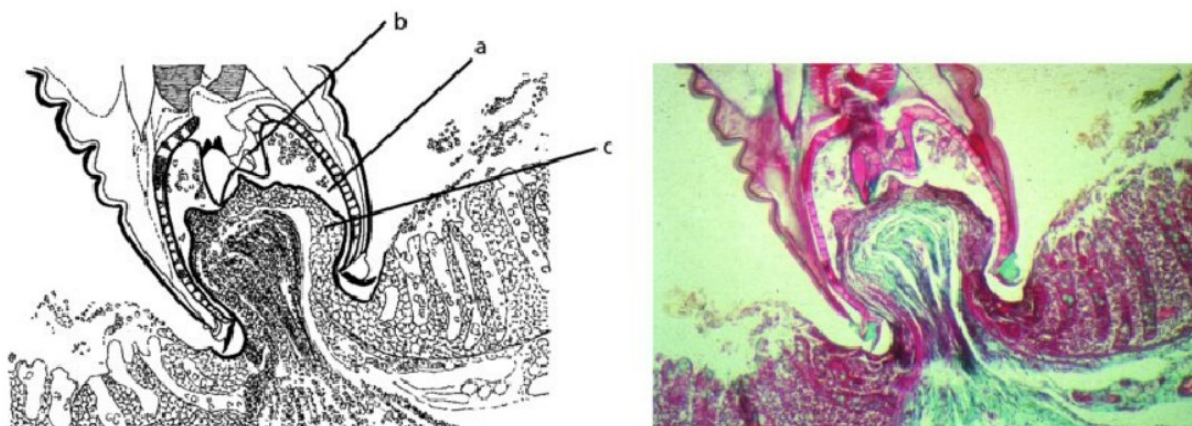
**Obr. 2** Některé typy jícnu nematod: A – rhabdioidní, B – strongyloidní (filariformní), C – oxyuroidní, D – trichuroidní (Langrová *et al.* 2010, str. 80).

Hlístice jsou převážně gonochoristé tzn., že pohlavní soustava je u samic a samců rozlišena. Bývá i výrazný dimorfismus. U některých druhů se můžeme setkat s hermafroditismem, heterogonií nebo partenogenetickými generacemi. Velká část je oviparních (vejcorodých), výjimečně se může jednat o ovoviviparii (larvy se líhou z vajíček už v děloze) (Horák a Scholz 1998, Laštůvka 2014). U samců se skládá povětšinou z nepárových pohlavních orgánů. Trubicovité varle přechází v chámovod tvořený semenným váčkem a vývodným kanálkem. Zadní část těla může být u samic zahnuta v kopulační burzu (bursa copulatrix) složenou ze tří laloků vyztužených žebry (Volf *et al.* 2007). Tento znak je užitečný pro první krok při identifikaci červů (Jacobs

*et al.* 2015). Pomocné kopulační orgány – spikuly, gubernakulum a telamon jsou zpevněny kutikulou (sklerotizovány). Spikuly jsou pohyblivé povětšinou párové jehlice či tyčinky různé délky, na konci mohou být rozšířené (Volf *et al.* 2007). Napomáhají k rozšíření a uchycení v pohlavním otvoru samičky a jsou také společně s ostatními kopulačními orgány důležitými rozlišovacími znaky (Ryšavý *et al.* 1989). Gubernakulum je tvořeno destičkami zpevněnými kutikulou. Tento útvar odděluje spikuly a ovlivňuje jejich pohyb. Podobnou funkci má telamon nacházející se v laterálních nebo ventrálních částech kloaky. Při kopulaci orientuje spikuly správným směrem (Volf *et al.* 2007). Samice mají na rozdíl od samců pohlavní orgány většinou párové. Na trubicovité vaječníky (ovaria) navazují vejcovody (ovidukty), které ústí v trubicovité děloze (uteru). Děloha je spojena krátkým kanálkem (vaginou) společným pro všechny větve dělohy. Na povrchu se nachází svalnatá vulva jejíž umístění je významným taxonomickým znakem (Langrová *et al.* 2010).

Životní cyklus hlístic spadá do skupiny geohelmintů i biohelmintů. Samice po páření produkuje vajíčka, která se obvykle pomocí stolice dostávají ven z hostitele (Jacobs *et al.* 2015). Larvální vývoj hlístic probíhá ve čtyřech stádiích (L1-L4), která jsou charakteristická svlékáním staré a tvorbou nové kutikuly, nebo jejich vrstvením (Volf *et al.* 2007). Při vývoji se u geohelmintů z vajíčka líhne infekční larva buďto přímo, nebo dochází k svlékání až mimo vajíčko. Vnější podmínky výrazně ovlivňují jejich další vývoj. Při nepříznivých podmínkách larva setrvává ve svých starých obalech nebo vytváří nové ochranné obaly. U biohelmintů je zapotřebí minimálně jednoho mezihostitele pro zabezpečení vývoje dalšího stádia, které pak napadá definitivního hostitele (Horák a Scholz 1998). K přenosu na hostitele/mezihostitele dochází požitím vajíčka či infekční larvy perorální cestou, nebo perkutánně v podobě larva migrans cutanea (např.rod měchovci) (Volf *et al.* 2007). Infekční larvy se mohou v hostiteli také kumulovat. Tento jev se nazývá paratenický parazitismus a je u hlístic velmi rozšířený. Při požití mezihostitele paratenickým hostitelem dochází k závažné infekci (Ryšavý *et al.* 1989).

Nejvíce druhů hlístic parazituje na obratlovcích, bezobratlých nebo rostlinách. Menší část žije volně v půdě nebo vodě. Dospělci parazitující v obratlovcích napadají především jejich gastrointestinální trakt (Jacobs *et al.* 2015). Jejich potravou je natrávený obsah trávicího traktu hostitele, krev a jiné tělní tekutiny. Parazitismus gastrointestinálních hlístic je příčinou ekonomických ztrát především u chovu ovcí (Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017)



**Obr. 3** Histologický segment střevní mukózy a krmící se hlístice: a - ústní dutina, b - zuby, c - část nasáté mukózy (převzato z Jacobs *et al.* 2015, str.372).

## 2.2 Vlasovka slezová

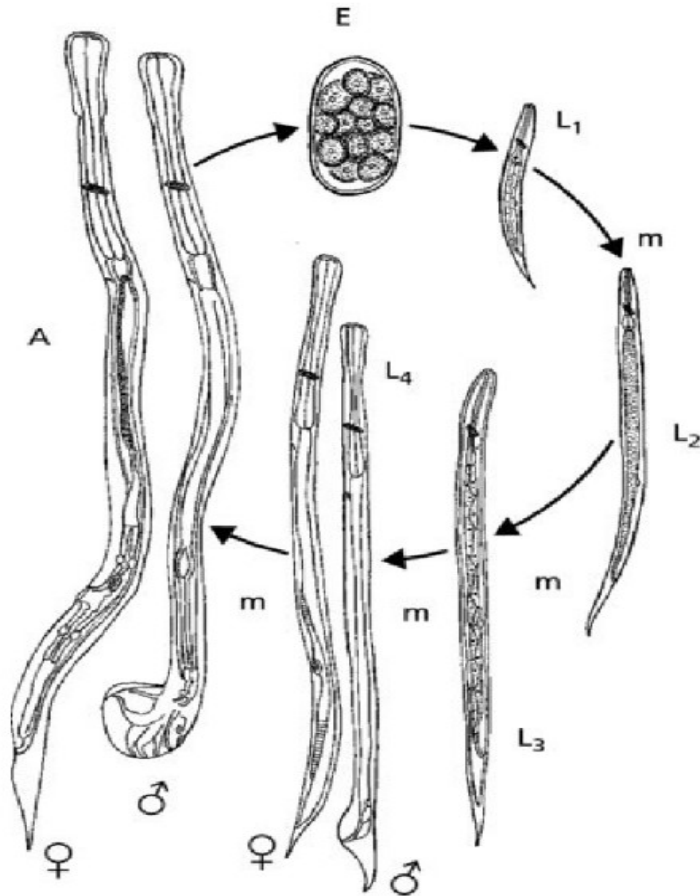
Vlasovka slezová, latinsky *Haemonchus contortus*, patří do řádu Strongylida, třídy Secernentea, nadčeledi Trichostrongyloidea. V rámci řádu se jedná o nejpočetnější skupinu (Volf *et al.* 2007). Oba druhy *H. contortus* i *H. placei* rodu *Haemonchus* patří k nejvíce patogenním hlísticím trávicího traktu a dosud není jasné, jestli se jedná opravdu o dva různé druhy (Vadlejch a Langrová 2014). Vlasovka je parazit primárně tropických a subtropických oblastí. Jeho výskyt se však díky změnám klimatu rozšiřuje i do chladnějších oblastí jako je severní Británie nebo Kanada (Jacobs *et al.* 2015). Napadá převážně malé přežvýkavce jako jsou ovce a kozy, ale může parazitovat i u srnčí zvěře, bizonů, losa amerického, alpak, lam a výjimečně i u člověka (Irán, Brazílie, Austrálie) (Jíra 1998). Infekce *H. contortus* je hlavním důvodem ztrát živočišné výroby. Proslulý je díky schopnosti překonávat extrémní selektivní tlak vytvořený řadou používaných anthelmintik. S resistencí na velkou část anthelmintik se tak u něj setkáme po celém světě (Waller a Chandrawathani 2005).

Při diagnostice využíváme výrazných morfologických znaků. Dospělci dorůstají velikosti 2-3 cm (samice bývají větší). Podél výrazně prosvítajícího jasně červeného střeva naplněného krví se u samic vine spirálovitá děloha. Samec je na obou stranách těla zúžený, cervikální papily má dozadu ohnuté a laterální paprsky bursy copulatrix má na bázi spojené (Dyk *et al.* 1972, Vadlejch a Langrová 2014). Při jejich vývoji se za optimálních podmínek z vajíček velmi rychle líhnou larvy prvního stádia (L1). Samice



klade denně až 10 000 vajíček (Vadlejch a Langrová 2014). Pokud jsou podmínky stále příznivé, svlékne larva svoji kutikulu a vyvíjí se v larvu stádia L2. Vlhké prostředí je pro larvy ideální. Působí pro ně jako médium, které jim napomáhá v pohybu a zároveň zabraňuje jejich vysychání. Pomocí rosy či deště se mohou larvy dostat až do vzdálenosti 90 cm od trusu. Tyto první dvě stádia se živí bakteriemi přítomnými v trusu. Po druhém svlékání vzniká stádium L3, infekční larva. V tomto stádiu si larva buďto vytvoří novou kutikulu, která ji ochrání před nepříznivými vlivy, ale zamezí jí v přijímání potravy, nebo aktivně či pasivně migruje po vegetaci (Langrová *et al.* 2014). Po pozření L3 se v hostiteli vyvíjí čtvrté poslední stádium L4 (Vadlejch a Langrová 2014). Dospělci poté kladou vajíčka a jsou buďto vyloučeni z organismu společně se stolicí, nebo v organismu zůstávají i několik týdnů (cca 3 měsíce) (Dyk *et al.* 1972, Vadlejch a Langrová 2014). Odolnost larev roste se stupněm invaze, L3 je nejodolnější. Vysoké teploty, nebo naopak velmi nízké pod 0 °C pro ně ale mohou být letální. Přímý sluneční svit larvám též nesvědčí. Délka jejich života na pastvině závisí na podmínkách. Paradoxně při velmi vhodných podmínkách hynou rychleji, jelikož se rychle vyvíjí a vyčerpají tak své zásobní látky (Dyk *et al.* 1972).

Patogenní vliv stádia L4 a dospělců spočívá v sání krve. Denně odsaje hlístice hostiteli kolem 50μl krve (při 5000 jedincích to může být až 250 ml krve za den). Vlasovka sice nemá ústní kapsulu a má jen malou ústní dutinu, ale je vybavena silným kyjovitým hltanem. Svým vlivem na střevní stěnu může způsobit až hemoragickou anemii (Dyk *et al.* 1972). Klinické příznaky jako hyperpnoe nebo tachypnoe se mohou projevit rychle a může docházet až k úmrtí jedince (Vadlejch a Langrová 2014). Obecně působí na hostitele negativně hlavně úbytek živin v podobě proteinů. Parazit je odčerpává pro vlastní potřebu a hostitel pak nově nasyntetizované proteiny využívá pro základní zachování homeostázy a funkci svalů. Problém nedostatku proteinů se projeví například v době kolem porodu nižší produkcí mléka, nedostatkem složek imunitního systému proteinové povahy, nebo pozastavením růstu vlny. Dodáním proteinů do krmné směsi se sníží negativní dopad parazita na metabolismus hostitele a zvýší se jeho obranyschopnost (Langrová *et al.* 2014). Po přechodu do chronicity vykazují infikovaní jedinci úbytek hmotnosti, slabou tělesnou kondici, podčelistní otok (v důsledku hypoproteinemie), jsou letargičtí a slabí. Při ztrátách krve dochází k vyprázdnění zásob železa vedoucích k anemii.



**Obr. 4** Životní cyklus hlístic: E - vajíčko, L1 - první larvální stádium, m - svlékání kutikuly, L2 - druhé larvální stádium, L3 - třetí larvální stádium, A - dospělec (převzato z Jacobs *et al.* 2015, str.373).

## 2.3 Terapie hemonchózy

Terapie chorob způsobených helminty zahrnuje u zvířat kombinaci zoohygienických opatření s farmakoterapií a farmakoprophylaxí (Lamka a Ducháček 2014). V první řadě je nutný rozbor trusu, ze kterého se určí druh cizopasníka. Vlastní odčervení probíhá až po obahnění z důvodu rizika potratu. Po podání léčiv se nechá stádo 2-3 dny v karanténě. Důvodem je zachycení zbylých vajíček či dospělých jedinců v trusu, který se poté vydezinfikuje a zlikviduje (Štolc *et al.* 2012). Komplettní eradikace parazita z těla hostitele je nereálná. Proto je hlavním cílem snižování populace těchto parazitů. K tomu využíváme tři hlavní principy: minimalizace kontaktu infekčních larev s hostitelem, zvýšení obranyschopnosti a odolnosti hostitele, odstranění parazitů

přítomných v hostiteli. Zatímco v minimalizaci kontaktu s parazitem hraje hlavní roli především prostředí (pastviny), pro zvýšení obranyschopnosti je nejdůležitějším faktorem potrava (proteiny) a plemenný původ. Odstranění parazitů z těla hostitele mají za úkol anthelmintika (Štolc *et al.* 2012). Vlastní léčbu komplikuje fakt, že je relativně nízký počet dostupných léčiv, která se používají dlouhodobě a jejich účinnost se tak snižuje (Cvilink *et al.* 2009). V prevenci a odčervovacích programech je nutné brát ohled na dobu odčervení, jeho četnost, volbu léčiva a preparátů, průběh počasí, druhový nálezh parazitů, počet vajíček v trusu atd. (Horák *et al.* 2012).

K pomoci s odstraněním parazitů z těla zvířat lze použít také některé rostliny. Jedná se především o doplnění anthelmintické léčby tzv. nutraceutika, protože účinek syntetických léčiv zatím žádná z rostlin nedokázala nahradit. Existuje řada sekundárních metabolitů působících proti hlísticím. Patří mezi ně například: mastné kyseliny, tetrahydrofurany, fenolické sloučeniny (trísloviny), alkaloidy nebo terpeny. Tyto látky byly však zkoumány jen jako izolované sloučeniny a to ve vysokých koncentracích, ve kterých se v rostlinách běžně nenacházejí. Není proto jisté, jestli by jejich použití bylo úspěšné při *in vivo* testech. Mezi ty s relativně prokázanou účinností patří lespedezie (*Lespedeza cuneata*), vičenec (*Onobrychis viciifoliae*) nebo čekanka (*Cichorium intibus*) (Vadlejch a Langrová 2014).

### 2.3.1 Anthelmintika

Anthelmintika se využívají k profylaxi i terapii infekcí způsobených parazitickými červi a jejich různými stádii (Dobšíková a Šíroková 2014). Mechanismus účinku anthelmintik je založen na ovlivňování nervového systému parazitů. Většina z nich vyvolává spasmus svalstva působením na nikotinové receptory, ale mohou působit i na jiné receptory (GABA). Také mohou ovlivňovat mikrotubuly, nebo různé enzymy (Hartl *et al.* 2012). Některá léčiva mají navíc účinek antitrepatodní nebo anticestodní. Podávají se v podobě individuálních veterinárních léčivých přípravků nebo premedikovaných krmiv (PMK). Hlavními skupinami jsou makrocyclické laktony, benzimidazoly (BZ), imidazothiazoly (Lamka a Ducháček 2014) a deriváty aminoacetonitrilu.

Ideální anthelmintikum by mělo splňovat náležitosti jako bezpečnost, efektivní účinnost jak proti dospělcům, tak proti nedospělým stádiím, mělo by se rychle metabolizovat a být kompatibilní s jinými léčivy, mělo by být dostupné ekonomicky a

ve více aplikačních formách (Horák *et al.* 2012). Odčervování „naslepo“ není vhodné hned z několika důvodů. V první řadě nevíme, jaké konkrétní druhy parazitů způsobují infekci. Vymýcením všech parazitů značně snížíme formování imunity a podpoříme vznik rezistence. V neposlední řadě stojí toto jednání finanční i pracovní úsilí. (Horák *et al.* 2012).

### **2.3.1.1 Makrocyklické laktony**

Léčiva biosyntetického původu produkována fermentací půdních aktinomycet. Dělí se na avermektiny a milbemyciny (Ducháček a Lamka 2014). Vážou se a aktivují glutamátové receptory spojené s chloridovými kanály (GluClRs). Způsobují jejich hyperpolarizaci, což vede k inhibici neurotransmise (narušení přenosu signálu) (Dobšíková a Šíroká 2014, Atif *et al.* 2017). Dochází tak k porušení funkce motorických neuronů a hltanových svalových buněk, načež parazit umírá na samotnou paralýzu, nebo vyhladovění (Atif *et al.* 2017). Účinkují proti endo i ekto parazitům, jsou to tzv. endektoparazitika (Ducháček a Lamka 2014, Dobšíková a Šíroká 2014). Jejich spektrum je široké a účinek se dostaví už při nízkých koncentracích. Výraznou nevýhodou je rozšířená rezistence. Jsou vylučovány výkaly, ve kterých se nachází v nezměněné formě i několik měsíců. Nebezpečí tedy hrozí i ze strany reziduí. Zástupci avermektinů: ivermektin (IVE), doramektin, eprinomektin, selamektin. Milbemyciny: moxidektin, milbemycin (Dobšíková a Šíroká 2014, Ducháček a Lamka 2014).

### **2.3.1.2 Benzimidazoly**

Mají antinematodní, antitrepatodní i anticestodní účinky. Většina z látek této skupiny působí proti dospělcům. Jejich použití je omezené v graviditě z důvodu teratogenity. Mechanismus účinku je založen na inhibici  $\beta$ -tubulinových podjednotek při tvorbě mikrotubulů, což vede k inhibici tvorby ATP a pozastavení tvorby energie. Obecně jsou tyto látky málo metabolizovány a jsou spolu s pomocí žluče vylučovány výkaly. Hlavní zástupci: tiabendazol, albendazol (ABZ), febantel, fenbendazol, flubenzdazol (FLU), mebendazol, oxibendazol (Dobšíková a Šíroká 2014, Ducháček a Lamka 2014).

### 2.3.1.3 Imidazothiazoly

Látky objevené již v 60. letech 20. století, které už dnes nejsou významně využívány. Jediný registrovaný zástupce je levamizol. U parazitů, výhradně nematod, účinkuje na nikotinových receptorech díky čemuž dochází k svalové paralýze. Zvyšuje intestinální motilitu hostitele a tím podporuje vyloučení ochromeného parazita ven z těla. Má řadu nežádoucích účinků. Nesmí se podávat březím samicím a jeho rezidua přechází i do živočišných produktů. Jeho použití může být i v oblasti imunomodulace. Zástupce: levamizol (Dobšíková a Široká 2014, Ducháček a Lamka 2014).

### 2.3.1.4 Deriváty aminoacetonitrilu

Nejnovější skupina anthelmintik. Třída léčiv, jejichž hlavní zástupce monepantel v přípravku Zolvix® (2009), byl považován za důležitou alternativní léčbu při rezistenci na jiná anthelmintika. Působí na nikotinové receptory. Je účinný i proti rezistentním kmenům, ale bohužel i na něj v posledních letech vzniká rezistence. Další zástupce derquantel se používá v kombinaci s abamektinem. V této kombinaci ale neúčinkuje na L4 u rezistentního kmene *H. contortus*. Zástupci: monepantel, derquantel. (Dobšíková a Široká 2014, Kaminsky *et al.* 2011)

## 2.3.2 Prevence a zoohygienická opatření

Jelikož se v našich podmínkách jedná ve většině případů o multiparazitární infekce způsobené více druhy červů, je nutný systémový přístup. Strategie by měla být následující: 1. pokud možno zabránit těžkým infekcím, které mohou vést k úhynu, 2. sekat kontaminované pastviny, 3. minimalizovat dopad na užitkovost, 4. sledovat účinnost odčervení pomocí diagnostických prvků, imunitu a v neposlední řadě možnou rezistenci. Důležitou prevencí je také střídání pastvin. Pravidelné sekání v kombinaci s působením slunečního záření (UV záření a teplota) má výrazný vliv na mortalitu parazitů. Proti parazitům na pastvinách tedy můžeme zakročit pomocí chemických nebo mechanických sil. Chemicky pomocí pravidelného odčervování. Mechanicky pomocí už zmíněného sečení a UV záření, nebo vápněním půdy, které hubí vajíčka parazitů a v neposlední řadě také mezipastvou. Mezipastva, střídání druhů pasoucích se na jedné pastvině, napomáhá k jejímu čištění za předpokladu, že jsou parazité mezidruhově nepřenosní (Horák *et al.* 2012, Axmann a Sedlák 2008). Mezi hlavní zásady hygieny

chovu malých přežvýkavců patří kvalitní a vhodné ustájení, volba krmení a napájení nezávadnou vodou (Vejčík a Pešinová 2012).

Pro prevenci parazitárních onemocnění je velmi důležitá nespecifická i specifická imunita. Imunitní odpověď organismu je složitý proces, který se vytváří až po delším vystavení parazitům. U jehňat se objevuje kolem 4.-5. měsíce a během života se stále zdokonaluje. Proto je důležité, aby byla i dospělá zvířata vystavena přiměřenému stimulu. Se silným imunitním systémem zvířata lépe odolávají i vyššímu výskytu infekčních larev. Obranyschopnost znesnadňuje uchycení parazitů a vniku infekce, omezuje jejich růst a vývoj populace (Vadlejch a Langrová 2014).

### 2.3.3 Biologická kontrola

Jednou z novějších možností zabránění šíření hemonchóz je ošetření zvířat pomocí chlamydiospor hub např. *Duddingtonia flagrans*. Tato dravá mikrohouba chytá hlístice do svých speciálních sítí. Je schopna přežít průchod gastrointestinálním traktem hostitelů a v jejich trusu pak vyhledat a zlikvidovat velký počet parazitů (zejména stádium L3), čímž sníží následný počet jejich vajíček (Larsen 2000). Proběhly již i studie na toto téma. Například Aguilar-Marcelino *et al.* 2017 ve své studii uvádí poznatky při experimentu s jehňaty infikovanými *H. contortus*. Jehňata byla rozdělena na dvě skupiny: kontrolní a léčená pomocí houby *D. flagrans*. Experiment trval 11 týdnů a jehňatům byla po tuto dobu podávána různá strava. Kontrolní skupina dostávala klasické komerční krmivo, zatímco druhá skupina měla stravu obohacenou nutričními peletami (NP) obsahujícími  $2 \times 10^6$  chlamydiospor *D. flagrans* / kg tělesné váhy. K hlavnímu snížení počtu larválních stádií dochází v 1. týdnu od ošetření a poté mezi 6. až 11. týdnem. Obě skupiny měly srovnatelný přírůstek váhy jehňat. Hlavní rozdíl byl mezi počtem L3 stádií *H. contortus* v trusu jehňat. Kusy ošetřené NP měly výskyt L3 výrazně nižší.

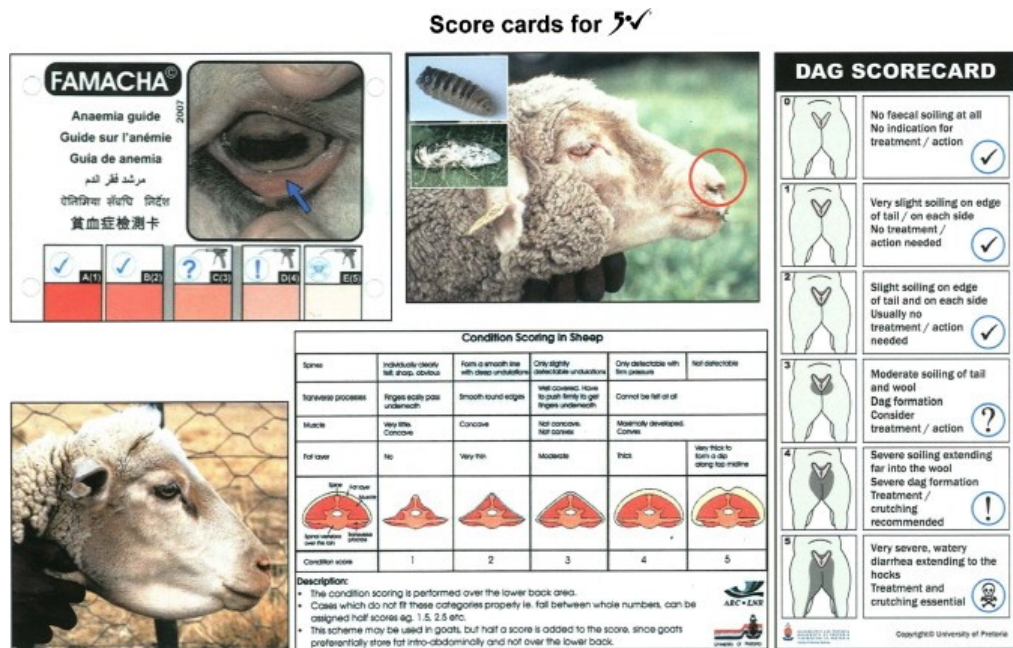
## 2.4 Diagnostika

Parazitární infekce způsobují nejen ztráty přímé jako zvýšený úhyn, nebo nižší kvalita masa, ale i nepřímé, mezi něž patří snížení produkce, vliv na reprodukci a zvýšení vnímavosti k jiným onemocněním, tj. snížení funkce imunitního systému. Proto je důležité včas zachytit tato onemocnění a pokud možno jim předcházet (Horák *et al.* 2012). Klinické příznaky jako průjem, záněty střev, ztráta chuti k jídlu, dehydratace, krvácení mohou vést až k úhynu (Vejščík a Pešinová 2012, Kuchtík *et al.* 2007, Vadlejch a Langrová 2014).

V dnešní době máme možnost vybírat z celé škály intravitálních metod určených pro diagnostiku, které mají rozdílnou citlivost, přesnost, spolehlivost, časovou i finanční náročnost. Mezi základní nástroje diagnostiky řadíme rozpoznání parazitózy pomocí klinických příznaků, koprologické vyšetření, biochemické a imunologické testy, metody molekulární biologie a postmortální vyšetření (Vadlejch a Langrová 2014).

### 2.4.1 Klinické příznaky

*H. contortus* je pravděpodobně jediný parazit z kmene nematod, kterého lze snadno diagnostikovat i bez laboratorních testů pomocí příznaků (Waller a Chandrawathani 2005). Jednou z alternativních strategií léčby je cílené selektivní ošetření (TST-targeted selective treatment), kdy jsou léčena pouze zvířata s klinickými příznaky a pokleslou produktivitou (Rizzon Cintra *et al.* 2018, Vadlejch a Langrová 2014). Jelikož je koprologické vyšetření v celém chovu časově i finančně náročné, byla vytvořena snadnější metoda Five Point Check© (Van Wyk a Bath 2002, Vadlejch a Langrová 2014). Na základě klinických příznaků lze rozeznat jedince, kteří potřebují léčbu. Tato metoda je levná, snadná, efektivní a slouží pro více druhů parazitů (Vadlejch a Langrová 2014). Kontroluje se pět částí těla zvířete: oko (FAMACHA© tabulka), hřbet (kondice), ocas (znečištění vlny změnou konzistence výkalů), čelist (otok v dolní části z důvodu hypoproteinémie) a nozdry (výtok z nozder).



**Obř. 5** Five Point Check<sup>®</sup> karty slouřící ke kontrole pětĩ částĩ těla ovcí při rozhodování o léčbě (převzato z Bath a van Wyk 2009).

### 2.4.1.1 FAMACHA <sup>®</sup> systém

Pro diagnostiku anemie u ovcí a koz nakařených *H. contortus* se používá pro TST systém FAMACHA<sup>®</sup>. Název je akronym odvozený od jména doktora, který se zasloužil o hlavní myšlenku tohoto testu. Dr. Faffa Malan a odtud FAffa MAlan CHArt. Při této metodě se porovnává barva oční sliznice s tabulkou FAMACHA<sup>®</sup>, která obsahuje standardizovanou sadu barev, podle nichž můžeme odhadnout hodnotu hematokritu u postiženého zvířete. Je známo, že během probíhající hemonchózy se barva spojivek u zvířat mění z tmavě červené přes růžovou na bílou barvu (prokrvení se s pokračujícím rozvojem anemie sniřuje) (Rizzon Cintra *et al.* 2018, Van Wyk a Bath 2002). Nevýhodou tohoto testu je fakt, že je to test značně subjektivní a bez řádného výškolení a zkušeností může dojít k nesprávné klasifikaci. Cílem metody je zachování refugií snířením četnosti anthelmintické léčby. Zvířata se skóre F5 a F4 potřebují ihned léčbu althelmintiky. Jedinci odpovídající F3 jsou dále vyšetřováni, zda je u nich léčba skutečně potřebná. FAMACHA<sup>®</sup> test se používá u dospělých kusů především v zemích s vysokým výskytem hemonchóz. Existuje však jen málo studií, které by se zabývaly použitím u jehňat (Rizzon Cintra *et al.* 2018). Jednou z nich je studie Rizzon Cintra *et al.* 2018, jejíž závěrem bylo, že systém FAMACHA<sup>®</sup> má jen nízkou citlivost pro



klinickou diagnózu anemie u jehňat a neměl by být v tomto případě používán samostatně.

## **2.4.2 Koprologické vyšetření**

U každého chovu je důležité stanovení individuálního odčervovacího programu. Zjištění výskytu parazitů a jejich druhů se během roku zajišťuje pomocí vyšetření trusu. Odběr trusu se provádí od 5-10 % zvířat v chovu. Vzorky se zasílají do laboratoře, která určí druh/y parazita/ů a počet jejich vajíček v 1 g trusu. Tento počet pomáhá v rozhodování, zda zvířata léčit nebo ne. V případě, že je počet vajíček v trusu vyšší než  $10^3$ , je odčervení bezpodmínečně nutné. To samé platí pro nález určitých druhů parazitů jako například motolice, tasemnice, nebo plicní a slezová červivost. (Horák *et al.* 2012).

## **2.4.3 Biochemické a imunologické testy**

Testy jsou založeny na změnách hladin enzymů pepsinogenu nebo gastrinu, což může být nevýhoda z důvodu existence i jiných faktorů ovlivňujících hladinu těchto hormonů. Jsou finančně náročnější a vyžadují odběr krve. Nevýhodou je také fakt, že se dají využít jen u parazitů napadající slez. V případě imunologických testů se jedná o detekci antigenů v krvi, krevním séru nebo výkalech, anebo stanovení hladiny specifických protilátek. Nevýhodami tohoto stanovení je zkřížená reaktivita, některé produkty nemají antigenní charakter, nebo o nich je málo informací, není možné rozeznat intenzitu infekce, zdali jde o současnou nebo proběhlou infekci (Vadlejch a Langrová 2014).

## **2.4.4 Molekulární diagnostika**

Je jednou z nejprogresivnějších metod. Nové poznatky v této oblasti umožňují další vývoj těchto citlivých a specifických metod. Uplatnění nachází technika PCR (Real-Time, multiplex, RAPD a další). Tyto metody jsou ale drahé a náročné na vybavení, proto nelze předpokládat, že by se v dohledné době staly základem konvenční diagnostiky (Vadlejch a Langrová 2014).

## 2.5 Rezistence

Ačkoliv byly základy rezistence proti anthelmintikům intenzivně studovány, faktory přispívající k jejímu rozvoji nejsou doposud zcela známé. Z počátku bylo farmářům a zemědělcům doporučováno, aby snížili frekvenci léčby a tím zpomalili rozvoj rezistence (Silvestre *et al.* 2002). Nedostatek vědomostí a snadný přístup k anthelmintikům je ale vedl spíše k častému a nevhodnému používání těchto léčiv (Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017). Faktory chovu zvířat jako je nákup již infikovaných jedinců, společné pastviny, vysoký výskyt infekčních larev na pastvinách, opakované podávání léčiv ze stejné skupiny a časté poddávkování anthelmintiky k její tvorbě jen přispěly (Silvestre *et al.* 2002). Častá léčba je považována za jeden z hlavních rizikových faktorů přispívající k rozvoji rezistence, zvláště pokud je podávána celému stádu. Při časté léčbě totiž přežívají výhradně rezistentní kmeny, které se dále reprodukují a navyšují tak násobně svůj počet (Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017). Panuje i obava z reziduí samotných léčiv, a to jak v živočišných produktech, tak v samotném ekosystému (Aguerre *et al.* 2018).

O rezistenci mluvíme tehdy, jestliže vyšší množství jedinců v populaci není ovlivněno či postiženo podanou dávkou, nebo koncentrací léčiva, nebo je-li zapotřebí velmi vysokých dávek k požadovanému účinku. Rezistence je dědičná. Při rezistenci na léčivo určité třídy anthelmintik je pravděpodobné, že k ní bude docházet i u dalších zástupců z této skupiny. Pokud je v populaci parazitů rezistence přítomna, zatím nebylo pozorováno, že by došlo k její reverzi či ztrátě. Rozvoj rezistentních alel a jejich akumulaci lze rozdělit do tří fází. První fáze závisí značně na náhodě a není nutným výsledkem podávání léčiv. Probíhá většinou pomalu a závisí na velikosti populace a její diverzitě. Důležitým faktorem je genetická výbava a biologie parazitů. Parazité mají rychlý vývoj a vysokou plodnost, což způsobuje reprodukci rezistentních alel v relativně krátkém čase. Také léčba a její výběr je silným selektorem. Ve druhé fázi jsou vnímaví jedinci léčbou usmrceni, zatímco přeživší odolní jedinci se mohou dále reprodukovat. Pokud tato situace nastane, dochází ke třetí (poslední fázi), kde dojde k výraznému zvýšení výskytu rezistentních alel a rozvoji rezistence. Vznik rezistence ovlivňují také vlastnosti ze strany léčiv, jako je vlastní povaha chemické látky, její farmakokinetika, volba dávky, kombinace léčiv atd. Součástí zabránění rozvoje rezistence by mělo být správné načasování léčby (klimatické podmínky), strategie chovu a další opatření (Wolstenholme *et al.* 2004).

### 2.5.1 Rezistence benzimidazolů

Rezistence u této skupiny je spojena s mutacemi v  $\beta$ -tubulinových genech, které brání vázání léčiva. Dobře známý je Phe-Tyr polymorfismus na 200. kodonu pro  $\beta$ -tubulin isotypu 1. U vysoce rezistentních kmenů *H. contortus* se objevuje mutace i u isotypu 2. Druhým polymorfismem je mutace 167.kodonu pro  $\beta$ -globulin isotypu 1 a 2. Při studiích s rekombinantními kmeny *H. contortus* bylo prokázáno, že mutace v isotypu 1 i 2 redukuje afinitu k BZ receptorům (Wolstenholme *et al.*2004).

### 2.5.2 Rezistence na ivermektin

Ivermektin (IVE) je zlatým standardem při léčbě helmintóz. Jeho rezistence se stává vážným problémem zdraví lidí i zvířat stejně jako živočišné výroby. IVE ovlivňuje svalové buňky hltanu a motorické neurony parazita účinkem na GluClR. GluClR je receptor s chloridovým kanálem patřící do skupiny iontových kanálů s pentamerickým ligandem (pLGIC). Jsou to membránově vázané receptory usnadňující difúzi iontů přes membránu jako odpověď na navázání agonistů. Pomocí funkčních a krystalografických studií byla vymezena vazebná kapsa pro IVE a byly identifikovány potenciální zbytky se kterými by IVE mohl interagovat. Studie Atif *et al.* 2017 se zabývala komplexním vyšetřováním funkčních vlastností GluClR u *H. contortus*. Snažili se kvantifikovat aktivační vlastnosti glutamátu a IVE na GluClR u divokého a zmutovaného kmene GluClR, G36-A. Výsledky demonstrují, že tato mutace snižuje senzitivitu na IVE pomocí funkčních vlastností GluClR spíše, než by ovlivňovala specifickou vazbu na receptor.

### 2.5.3 Rezistence na monepantel

V roce 2009 byl monepantel uveden na trh. Čtyři roky poté (v roce 2013) byla poprvé zmíněna rezistence na tuto látku konkrétně u dvou druhů hlístic (*Teladorsagia circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis*) na Novém Zélandu. Následující roky byla rezistence hlášena i u rodu *Haemonchus* v Austrálii, Uruguayi, Nizozemí a Brazílii. Mechanismy rozvoje rezistence jsou složité a mohou zahrnovat i mutaci v genomu parazita. U *H. contortus* byly nalezeny mutace v genech *Homo-mpt1-1* a *Hco-des2H*, zatímco u *C. elegans* proběhla mutace v alele *acr-23* (Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017, Mederos *et al.* 2014). Studie Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017 se zabývala

použitím supresivního léčebného programu s monepantelem po dobu 3 měsíců. Tím, že léčba odstranila citlivé kmeny *H. contortus*, zůstaly pro další reinfekci jen kmeny rezistentní. Na konci studie byli přítomni jen jedinci rezistentní na monepantel. Důležité je, že během experimentu byly ovce, léčené ve stejném programu umístěny odděleně, a přesto se u nich objevila rezistence nezávisle na sobě s odstupem cca 1 měsíce. Za zmínku stojí jistě i fakt, že se vznik rezistence urychlil při příznivých podmínkách (vlhko, horko) (Alexandre de Albuquerque *et al.* 2017).

#### **2.5.4 Rezistence u *Haemonchus contortus***

*H. contortus* je nejčastější parazit malých přežvýkavců, jehož léčba se stává velice obtížnou z důvodu zvýšené a opakované rezistence. Zástupce lze dělit na citlivé a rezistentní kmeny. Pro studium biotransformačních enzymů proti různým xenobiotikům se často využívají kmeny s různou citlivostí vůči anthelmintikům, například: ISE (náchylný na běžná anthelmintika), ISE-S (rezistentní k ivermectinu), BR (rezistentní k benzimidazolům) a WR kmen (rezistentní na všechna používaná anthelmintika). Údaje *in vitro* ve studii Vokřál *et al.* 2012 ukázaly významné rozdíly mezi citlivými a rezistentními kmeny při metabolismu flubendazolu (FLU), v aktivitě UDP-glukosyltransferas a několika karbonyl-redukujících enzymů. U rezistentních kmenů byl metabolismus FLU výrazně vyšší. Tyto změny aktivity mohou chránit parazity před toxickým působením anthelmintik a přispívat tak k rezistenci (Vokřál *et al.* 2012). Jedna z dalších studií se zaměřila na metabolismus albendazolu (ABZ), jelikož se běžně používá při léčbě hemonchóz (Vokřál *et al.* 2013). I v této studii byly zjištěny u multirezistentního kmene WR výrazně vyšší koncentrace metabolitů léčiva, konkrétně glukosidů (považováno za deaktivaci xenobiotika).

#### **2.5.5 Testování rezistence**

Rozvoj rezistence vedl k vývoji standardizovaných diagnostických testů. Většina z nich má ale nedostatky v podobě vysoké ceny, nereprodukovatelnosti, použitelnosti nebo interpretace výsledků. Existuje i pár *in vivo* testů vhodných pro všechna anthelmintika. Jako nejspolehlivější metoda sloužící k detekci rezistence se uvádí Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT). Je vhodný pro všechna anthelmintika a jejich metabolity. Jako spolehlivý je považován tehdy, pokud více jak 25 % červů vykazuje rezistenci. Obecně spočívá v porovnávání počtu vajíček v trusu před a po ošetření anthelmintiky. Vajíčka hlístic se poté počítají ve stanovených intervalech

odpovídajících konkrétním léčivům. Při provádění testu by měla být zavedena i kontrolní skupina z důvodu přirozené změny v počtu vajíček během celého období. U benzimidazolů je doba odběru vzorků trusu 8-10 dní, u makrocyclických laktonů 14-17 dní po léčbě. Po tomto období by se u citlivých kmenů ve vzorcích trusu neměla nacházet žádná vajíčka hlístic (Coles *et al.* 2006, Papadopoulos 2008, Taylor *et al.* 2002).

Jako další možnost kontroly rezistence mohou sloužit *in vitro* laboratorní testy. Egg Hatch Test (EHT) byl vyvinut k detekci rezistence u benzimidazolových derivátů. BZ totiž brání embryonaci a šrafování vajíček hlístic. Interpretace výsledků stojí na počtu vylíhnutých vajíček vystavených anthelmintiku (většinou thiabendazolu kvůli jeho dobré rozpustnosti). Z vylíhnutých larev ve stádiu L1 nebo L3 lze poté poznat druh hlístice. Můžeme se setkat i s falešně pozitivním výsledkem, ve fázi embryonace citlivost na thiabendazol klesá. Jako další test lze uvést test paralýzy, migrace a motility. Červi jsou inkubováni za přítomnosti anthelmintika v několika ředěních. Po 24 hodinách sledujeme počet paralyzovaných jedinců. V testu migrace jsou červi inkubováni 30 minut v přítomnosti anthelmintika uvnitř migrační komory. Komora je vybavena polyamidovými sítěmi o dané velikosti ok. Usmrcené nebo paralyzované larvy nejsou schopny projít oky síta. Za pomoci přístroje na měření mikromotility lze změřit díky změně úhlu světla pohyb larev. LDT (Larval Development Tests) je založen na vlivu anthelmintika na vývoj a metabolismus hlístic podobně jako EHT. Larvy L1 jsou kultivovány až do stádia L3 za přítomnosti působení anthelmintika a jako potrava slouží tepelně zpracované a lyofylizované *E.coli*. Z dalších můžeme uvést například biochemické testy nebo metody molekulární techniky (Coles *et al.* 2006, Papadopoulos 2008, Taylor *et al.* 2002).

## 2.6 Metabolismus xenobiotik

Ve všech organismech se setkáváme s metabolismem xenobiotik jakožto ochranou proti jejich negativním účinkům. K ochraně slouží xenobiotika metabolizující enzymy (XME), mezi něž patří různé druhy oxidas, reduktas, hydrolas, transferas a transportérů (Cvilink *et al.* 2009). Metabolismus xenobiotik je na rozdíl od jiných fází farmakokinetiky ovlivňován vlastnostmi molekuly jako celku. Pro vazbu na transportní a biotransformační enzymy jsou klíčové vlastnosti jako lipofilita, inoizace a distribuce

elektronů. Pro účinek enzymů jsou nejdůležitější elektrochemické vlastnosti, konfigurace a konformace molekuly. Asymetrii prostorového rozložení molekuly nazýváme chiralitou. Chirální látka, konkrétně chirální uhlík v molekule má schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. To má za následek odlišné chování jednotlivých enantiomerů v prostředí organismu. Enantiomery, jakožto své zrcadlové obrazy, v organismu působí odlišným chováním i aktivitou. Odlišnosti jsou vnímány hlavně ze strany enzymů. Pokud se enzym zaměřuje jen na jeden z enantiomerů, nazýváme tuto vlastnost stereoselektivita. Ta je velmi důležitá z hlediska farmakokinetiky i farmakodynamiky. Objevuje se tedy snaha o obměny struktury léčiv v tomto směru s cílem vytvořit co nejlepší vlastnosti pro budoucí léčivo (Skálová *et al.* 2017, Parkinson 2001).

Většina xenobiotik se metabolizuje na hydrofilnější metabolity, které jsou snadněji vylučovány. Biotransformační reakce xenobiotik dělíme na dvě fáze. První fáze obnáší odkrývání nebo vnášení hydrofilních skupin do molekul xenobiotika pomocí oxidace, redukce nebo hydrolýzy. Ve druhé fázi podléhají xenobiotika nebo jejich metabolity konjugačním reakcím s endogenními sloučeninami. Speciální transportéry využívající aktivní transport, napomáhají přenesení substrátů, konjugátů nebo metabolitů přes membránu. Tento proces se nově nazývá třetí fází biotransformace (Matoušková *et al.* 2016, Cvilink *et al.* 2009).

## **2.6.1 Xenobiotika a hlístice**

Detoxikace se u Nematod skládá ze tří cest: modifikace, konjugace a exkrece. V I.fázi jsou to především cytochromy P450 (CYPs) a dehydrogenasy/reduktasy (SDRs). Ve fázi II. Jsou to UDP-glykosyltransferasy a glutathion S-transferasy (GST). Transportéry ABC (ATP-binding cassette) ve fázi III. *H. contortus* je jeden z nejvíce zkoumaných parazitických hlístic. Jeho blízký vztah s *C. elegans* umožňuje aplikovat biologické znalosti do základního i aplikovaného výzkumu. Rovněž ale upozorňuje na významné rozdíly mezi těmito druhy (Laing *et al.* 2013).

### **2.6.1.1 I. fáze biotransformace**

V první fázi metabolismu (konverzi) léčiv a jiných xenobiotik dochází k oxidačním, redukčním nebo hydrolytickým reakcím.

Nejdůležitější enzymy první fáze jsou bezesporu CYPs. Jsou přítomné ve všech (zkoumaných) organismech. Ovlivňují nejen metabolismus xenobiotik, ale i některých eobiotik. Z endogenních látek to jsou například cholesterol, steroidní hormony, vitaminy rozpustné v tucích, mastné kyseliny, eikosanoidy nebo žlučové kyseliny (Skálová *et al.* 2017). Na základě sekvence genů (dle podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu) byly tyto enzymy rozděleny do několika rodin, podrodin a na jejich jednotlivé isoformy (Cvilink *et al.* 2009, Skálová *et al.* 2017, Velík *et al.* 2004). Jedná se o širokou nadrodinu hemoproteinů, které jsou jedinečné nejen svým počtem, ale také počtem substrátů, které metabolizují, indukovatelností a počtem katalytických aktivit, které zprostředkovávají (Skálová *et al.* 2017). Původně se předpokládalo, že helminté vůbec monooxidasy neobsahují, protože tyto enzymy u nich nebyly detekovány. Až po analýze genomu *C. elegans* bylo nalezeno 80 druhů genů kódujících CYPs (Cvilink *et al.* 2009). U *H. contortus* bylo zatím objeveno jen 42 těchto genů (Laing *et al.* 2015, Matoušková *et al.* 2016). Obvykle působí katalyticky při mono-oxidaci, ale mohou vystupovat také jako peroxidasy či reduktasy.

Další z řady enzymů, schopné oxidovat především sloučeniny s heteroatomy N, S a P, se nazývají flavinové monooxygenasy (FMO). Jsou to membránové proteiny hladkého endoplazmatického retikula a jejich struktura obsahuje mj. jednu molekulu flavinového koenzymu FAD (Skálová *et al.* 2017). U *C. elegans* je předpovídáno nejméně pět genů, které by mohly kódovat FMO podobné savcům (Cvilink *et al.* 2009).

Peroxidasy byly u helmintů zkoumány většinou jen z hlediska jejich antioxidační funkce (Cvilink *et al.* 2009). Imunitní systém hostitele se při napadení helmintem aktivuje a zvýší tak produkci volných radikálů (ROS). ROS parazita ohrožují, proto začne produkovat enzymy jako superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa nebo xanthinoxidasa, které ho chrání. *H. contortus* se brání proti působení peroxidů pomocí katalasy a glutathionperoxidasy (Cvilink *et al.* 2009).

Redukční reakce představují méně častou cestu metabolizace probádanou jen okrajově. I když se v posledních letech zájem o ně zvýšil, stále není plně dokončena jejich klasifikace a zařazena je jen část reduktas. Reduktasy se dělí na tři velké nadrodiny: reduktasy/dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-ketoreduktasy (AKR). Představují hlavní cestu metabolismu pro sloučeniny jako jsou ketony, aldehydy, nitro sloučeniny atd., které deaktivují (Skálová *et al.* 2017, Cvilink *et al.* 2008). Jejich deaktivující účinek zabraňuje u *H. contortus* toxickému působení karbonylu aldehydů a

ketonů a zároveň by mohl napomáhat k maření účinku některých anthelmintik (Cvilink *et al.* 2008). Konkrétně u *H. contortus* byla zkoumána redukce sloučenin nesoucí karbonyl. Byly vybrány substráty D,L-glyceraldehyd, daunorubicin, acenaphthenol, metyrapone a oracin. Všechny modelové substráty byly metabolizovány a specifická aktivita karbonyl-metabolizujících enzymů se shodovala s nalezenými u hospodářských zvířat (Cvilink *et al.* 2009).

### 2.6.1.2 II. fáze biotransformace

V druhé fázi biotransformace dochází u xenobiotik, nebo jejich metabolitů z fáze I., ke konjugačním reakcím s endogenními sloučeninami (Velík *et al.* 2004). Pro průběh reakce je nutné dodání energie, proto se endogenní sloučenina před konjugací aktivuje makroergním kofaktorem (Cvilink *et al.* 2008, Skálová *et al.* 2017). Konjugací vznikají hydrofilní deriváty, které nemohou samovolně difundovat přes membránu. K jejich vylovení jsou důležité transmembránové přenašeče, které jsou považovány za III. fázi konjugace (Velík *et al.* 2004). Typů konjugací existuje velké množství a xenobiotikum může být deaktivováno i více druhy konjugačních enzymů. Aktivita těchto enzymů není u všech organismů stejná. V jednotlivých organismech můžeme najít různé enzymy s různou aktivitou, jejichž výsledné konjugáty se mohou mezidruhově významně lišit. To značně omezuje využití metabolických drah napříč živočišnými druhy. V první řadě ale záleží hlavně na struktuře dané látky. Přítomnost funkčních skupin a její prostorové uspořádání ovlivňuje následnou konjugaci. Časté podávání farmakologických substancí může vést k indukci či inhibici některých z enzymů. Modulací enzymů změni intenzitu i poločas substance, čímž ovlivníme koncentraci látky v krvi a její možné toxické účinky. Mezi reakce patří glukuronidace, sulfonace, konjugace s glutathionem, acetylace, methylace a konjugace s aminokyselinami (Skálová *et al.* 2017, Parkinson 2001).

Důležitou cestou druhé fáze biotransformace je glykosidace, která je běžně zaměňována s termínem glykosylace. Glykosidace je jakákoliv reakce, na jejímž konci vzniká glykosid. Obecně jde o připojení hexosové skupiny v  $\beta$ -poloze s malou molekulovou hmotností za vzniku  $\beta$ -D-glykosidu. Pokud se využije jako donor cukru glukuronová kyselina proces nazýváme glukuronidací. Podobně je tomu u glukosy (glukosidace), galaktosy (galaktosidace) nebo xylosy (xylosidace). Proces tedy využívá aktivované cukerné dárce obsahující uridindifosfát (UDP-glukurová kyselina (UDP-GlcAU), UDP-glukosa (UDP-Glc), UDP-galaktosa (UDP-Gal) atd.) Enzymy druhé fáze se nazývají uridindifosfátglykosyltransferasy tj. UGT (některými autory jsou



označovány jako UGT jen UDP-glukuronosyltransferasy, toto označení však slouží podle Výboru pro názvosloví UGT souhrnně pro UDP-glykosyltransferasy, což umožňuje odkaz na všechny členy rodiny UGT bez rozdílu donoru cukerného zbytku) (Meech *et al.* 2012). Jsou to enzymy hladkého endoplazmatického retikula orientované do lumen, které se nachází u člověka převážně v játrech, ledvinách nebo střevech. Při katalýze dochází k přenosu aktivované cukerné jednotky. V cytosolu buňky probíhá její syntéza aktivace a poté je teprve přenesena do lumen. Substrátem bývají látky obsahující nukleofilní heteroatom. Jsou to například alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aminy, amidy, thioly aj. Výsledné produkty mají  $\beta$  konformaci, díky které jsou více rozpustné ve vodě, a tak i méně aktivní a toxické (Cvilink *et al.* 2008, Skálová *et al.* 2017, Parkinson 2001, Rowland *et al.* 2013). Zatímco u savců převládá jako hlavní role glukuronidace, u rostlin a bakterií je významná spíše glykosidace. Glykosidace je mimo jiné spojována s cestou rezistence na BZ deriváty u *C. elegans* a *H. contortus* (Matoušková *et al.* 2016). Rozděluje se dle aminokyselinové sekvence do rodin a jednotlivé isoformy pak do podrodin. U *H. contortus* je předpokládán výskyt 32 UGT, které dělíme do 15 ti rodin. Podílí se na metabolismu klíčových endogenních látek, ale také mnoha skupin léčiv. Existují velké mezidruhové rozdíly v expresi těchto enzymů. Za mechanismy ovlivňující expresi můžeme považovat epigenetické regulace struktury chromatinu, specifika dané tkáně, nebo ligandem aktivované transkripční faktory (Cvilink *et al.* 2008, Skálová *et al.* 2017, Parkinson 2001, Rowland *et al.* 2013).

Mezi významné reakce II. Fáze patří také konjugace s glutathionem (GSH). Glutathion, endogenní tripeptid, slouží jako kofaktor. Pomocí thiolové skupiny vytváří GSH konjugáty s xenobiotiky (nebo jejich metabolity) obsahující elektrofilní centra jako například: epoxidy, ketony, izokyanáty apod. S jejich aktivitou je spojena biosyntéza steroidů, leukotrienů, geradace peroxidů a mnoho dalších (Oakley, A.J. 2011, Skálová *et al.* 2017). Lze je rozdělit do tří odlišných rodin v závislosti na místě výskytu: cytosolické, mikrosomální a mitochondriální (Boušová a Skálová 2012)

Další cesty biotransformace jako konjugace s aminokyselinami, acetylace nebo sulfatace, nebyly zatím zdokumentovány u všech hlístic. Nalezena byla například acetylace u *C. elegans* (Cvilink *et al.* 2009).

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovit konstitutivní expresi vybraných UDP-glukosyltransferas u vlasovky slezové a porovnat získané hodnoty mezi samci a samicemi a dvěma kmeny s různou citlivostí vůči anthelmintikům.

Pro získání výsledků a závěru bylo nutné provést:

- Izolaci celkové RNA z biologických vzorků
- Kontrolu a převod RNA do podoby cDNA
- Kvantitativní stanovení vybraných UGT pomocí qPCR
- Hodnocení výsledků

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Biologický materiál, přístrojové vybavení a chemická reagentia

#### 4.1.1 Biologický materiál

Pro tuto práci byly použiti dospělci *H. contortus* ze dvou různých kmenů: citlivý ISE (Inbred Susceptible Edinburg) a multirezistentní WR (White River). Zdravá jehňata ve věku 3-4 měsíců, bez parazitů, byla infikována cca 5000 kusy larev *H. contortus* třetího stádia (L3). Jehňata byla po celou dobu chovu izolována od vnějšího prostředí. Při chovu bylo se zvířaty zacházeno dle platných zákonů (Z. České národní rady č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a zásadami pro zacházení a práci s laboratorními zvířaty dle Vyhlášky č. 419/2012 SB. O ochraně pokusných zvířat). Po 7 týdnech byla jehňata usmrcena a dospělci byli post mortem vyjmuti ze slezu. Samci a samice byli pod mikroskopem ručně rozděleni (vzorek=10ks). Vzorky byly připraveny pro okamžitou izolaci RNA nebo byly uloženy do -80 °C.

#### 4.1.2 Přístrojové vybavení

Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf

Bioanalyzátor – Bioanalyzer 2100, Agilent

Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo scientific

Hlubokomrazicí box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific

Kuličkový homogenizér – FastPrep24, M.G.P.

Laminární box – AURA 2000, M.A.C, BioAir

Laminární box – UVC/T-AR, BioSan

Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific

Přístroj pro Real-Time PCR – QuantStudio6, AppliedBiosystems

PCR cykler – MJ mini, Bio-Rad

Spektrofotometr – NanoDrop 2000, Thermo Scientific

Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

### 4.1.3 Pomůcky

Laboratorní sklo, pinzeta, plastové zkumavky, mikrozukavky Eppendorf, skleněné kuličky, skleněné Pasteurovy pipety, stojany na zkumavky a mikrozukavky, sterilní pipetovací špičky, sterilní pipetovací špičky s filtrem, PCR stripy, rukavice.

### 4.1.4 Chemická reagentia

DEPC (diethylpyrocarbonát) – Sigma-Aldrich

DNasa I – New England BioLabs

DTT (dithiotreitol) – Sigma-Aldrich

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) – Sigma-Aldrich

ethanol 99 % – Sigma-Aldrich

chloroform – Sigma-Aldrich

isopropanol – Sigma-Aldrich

náhodné hexamery – Generi Biotech

primery (GAPDH, UGTs) – Generi Biotech

qPCR kit: Xceed qPCR SG Mix – Lo-ROX – Institute of Applied Biotechnologies

RT (Reverzní transkriptasa): ProtoScript II – New England BioLabs

směs dNTP – Eurogentec

TRI Reagent – Molecular Research Center

voda redestilovaná

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Zpracování vzorků a izolace RNA

Biologické vzorky tkáně *H. contortus*, rozdělené dle pohlaví a kmene, byly zmrazeny spolu s 500µl TRI reagentu. Všechny práce spojené s izolací byly provedeny v rukavicích. Ve zkumavkách byly vzorky přeneseny do speciálního laminárního boxu určeného výhradně jen pro práci s RNA, kde byly teprve rozmrazeny z důvodu možnosti kontaminace a znehodnocení díky všudypřítomným RNasam. Do každé ze zkumavek byly vloženy skleněné kuličky a tkáň byla tak s jejich pomocí v homogenizátoru rozrušena. Poté bylo doplněno 500µl TRI reagentu a znovu

zhomogenizováno. Zkumavky se nechaly stát 10 minut při laboratorní teplotě (RT). Po 10 minutách bylo přidáno 200 $\mu$ l chloroformu a 15 sekund se intenzivně protřepávalo v ruce. Po protřepání se zkumavky nechaly 3minuty stát při RT. V následujícím kroku byly zkumavky umístěny do vychlazené centrifugy (4 °C) a po dobu 15 minut odstředovány při 12.000 g.

Ve zkumavkách došlo pomocí centrifugy k oddělení vodné a olejové fáze. Horní vodná fáze se velmi opatrně přepipetovala do nové 1,5ml zkumavky. Tento krok musel být proveden velmi pečlivě a nesmělo dojít ke kontaminaci dotykem špičky s mezifází nebo dolní organickou fází. V tom případě by vzorky nemohly být použity z důvodu kontaminace genomovou DNA a proteiny.

K vodné fázi v nových zkumavkách bylo přidáno 500 $\mu$ l isopropanolu a směs byla promíchána pomocí vortexu. Po 10 minutách stání při RT byly vzorky umístěny opět do vychlazené centrifugy. Tam byly odstředovány po dobu 10 minut při 4 °C a 12.000 g. Nastavením všech zkumavek stejným směrem, otvíráním směrem dolů, se dala předpokládat poloha pelety (na protilehlé stěně zkumavky) a tím se zamezilo jejímu nežádoucímu odsátí.

Supernatant byl opatrně odsát pipetou. Peleta byla omyta a očištěna 1ml 75 % ethanolu čerstvě naředěného DEPC vodou z absolutního ethanolu. Směs byla promíchána pomocí vortexu a umístěna do vychlazené centrifugy. Vzorky byly odstředovány po dobu 5 minut při 4 °C a 7.500 g. Opět byl odstraněn supernatant, tentokrát ve dvou krocích, napřed silnější a poté úzkou skleněnou pipetou, protože peleta špatně držela na dně/stěně zkumavky. Odstraněním velké části ethanolu začaly pelety na vzduchu samovolně usychat. Během 5-10 minut bylo možno usychání pozorovat jako zprůhledňování.

Vyschlé pelety byly rozpuštěny v DEPC vodě. Pokud by k zprůhlednění došlo dříve, je vhodné peletu rozpustit v DEPC vodě po kratším intervalu, aby nedošlo k jejímu přesušení. Množství vody se lišilo v závislosti na pohlaví, ze kterého pocházel vzorek. Jelikož pelety v samčích vzorcích byly menší, bylo k nim napipetováno jen 30 $\mu$ l DEPC vody. U samic pak byl vzorek RNA větší, proto k nim bylo přidáno 40 $\mu$ l DEPC vody. Vzorky byly důkladně promíchány a nechány při RT 5minut stát a poté opět promíchány.

V konečném kroku byla změřena koncentrace RNA a pomocí poměru specifických absorbancí zjišťováno případné znečištění proteiny nebo fenolem. Před ošetřením DNAsou byly vzorky uloženy v mrazícím boxu při teplotě -70°C.

## 4.2.2 Ošetření DNasou

Ošetření pomocí DNasy bylo použito z důvodu možné kontaminace vzorků genomovou DNA. DNasa I je enzym, který selektivně štěpí jen DNA, a odstraní tak nežádoucí DNA ze vzorku.

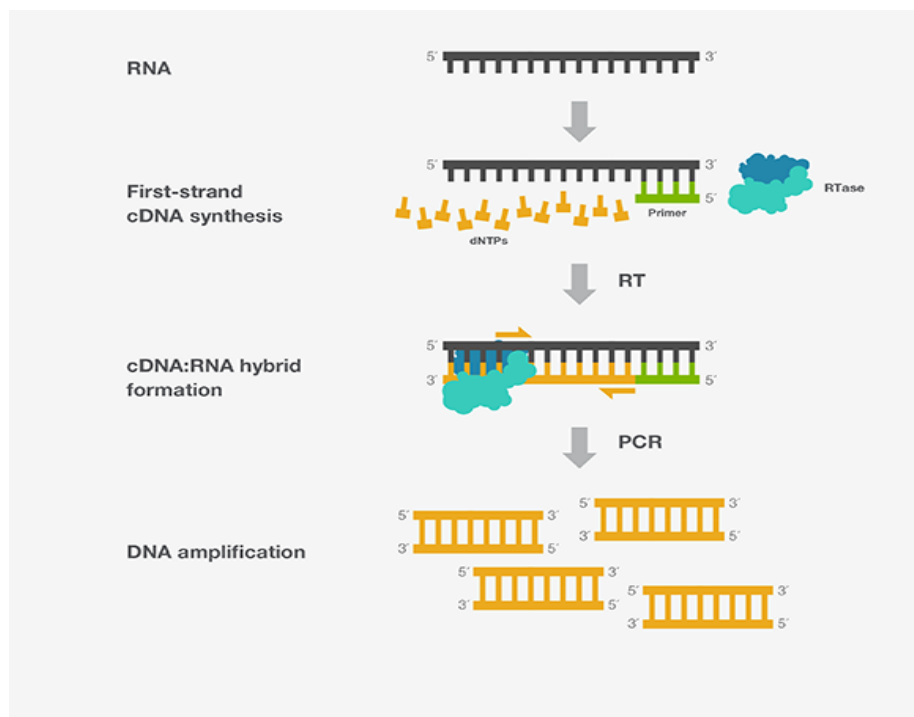
Dle naměřené koncentrace RNA (ng/μl) se u jednotlivých vzorků vypočítalo potřebné množství RNA v μl, aby odpovídalo množství 5μg RNA. Poté bylo dopočítáno množství přidávané vody DEPC v μl (doplněním do 26 μl).

Dále byl v laminárním boxu připraven tzv. mastermix (voda DEPC + pufr + DNasa) v nadbytku. Pro 12 vzorků se tedy počítá s rezervou +1, tedy 13x všechny složky. Mastermix tedy tvořilo 13 μl DNasy + 39 μl pufru. Reakční směs (celkem 30 μl) je tedy tvořena 26 μl RNA+DEPC a 4 μl mastermixu. Zkumavky byly promíchány na vortexu, stočeny na minicentrifuze a ponechány ve stolním inkubátoru po dobu 25 minut při teplotě 37 °C a protřepávání 500rpm. Poté byly stočeny na vortexu, aby k nim mohlo být přidáno 1,5 μl 0,1M EDTA, z důvodu inaktivace DNasy. Opět byly vzorky promíchány, stočeny a nakonec se nechaly inkubovat ve stolním inkubátoru 10 minut při teplotě 75 °C.

V konečném kroku byly vzorky vyjmuty z inkubátoru a rovnou zchlazeny v ledu, stočeny a bylo k nim přidáno 18,5 μl DEPC vody. Následně bylo 30 μl konečného objemu vzorku o koncentraci RNA 0,1 μg/ml uloženo do mrazicího boxu o teplotě -70 °C a připraveno pro reverzní transkripci.

## 4.2.3 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA je pomocí reverzní transkriptasy (RT) převedena na komplementární jednořetězcovou DNA (cDNA). Pro reakci je esenciální přidání primerů (oligo(dT)<sub>18</sub>, náhodné hexamery, nebo specifický primer). V této práci byly použity náhodné hexamery. Primery jsou oligonukleotidy vážící se na komplementární úsek templátové RNA. RT na tomto místě začíná syntetizovat hybridní molekulu DNA-RNA (cDNA).



**Obr. 6** Schéma průběhu reverzní transkripce a PCR (převzato z: Thermo Fisher Scientific [online]). V prvním kroku je přítomno jen vlákno RNA. Za přítomnosti RT dochází k syntéze cDNA nasednutím specifického primeru a následně připojování jednotlivých dNTPs (deoxyribonukleotid trifosfát). Při metodě PCR pak dochází k amplifikaci DNA, tj. zmnožení původní cDNA.

Pro reakci bylo použito 8 $\mu$ l ošetřené a zředěné RNA (do reakce bylo tedy použito 800ng). K RNA byl připipetován 1 $\mu$ l hexamerů a tato směs byla řádně promíchána. Poté byla vložena do PCR cyklieru a zahřívána po dobu 5 ti minut při 65 °C. Zahřívání je v této fázi důležitým krokem z důvodu denaturace RNA a možnosti výskytu sekundárních struktur, které by mohly znemožnit následné nasednutí primerů. Po zahřátí byly zkumavky rychle vloženy na led a po chvilce mírně stočeny v minicentrifuze. Mezitím byl připraven tzv. mastermix podle Tab. 1 v dostatečném nadbytku kvůli možné pipetovací chybě. V dalším kroku bylo k směsi RNA a hexamerů přidáno 14 $\mu$ l tohoto mastermixu. Konečná směs o objemu 20 $\mu$ l byla promíchána a následně zahřívána v PCR cyklieru. Po dobu 10 minut při teplotě 25 °C, kdy dochází k nasedání primerů. Dále cyklier zahřívá směs 50 minut při teplotě 42 °C, zde probíhá samotná syntéza cDNA. Nakonec je směs zahřáta až na 85 °C po dobu 5 ti minut, kdy dojde k denaturaci RT. Po proběhnutí všech reakcí se ke směsi přidalo 80 $\mu$ l redestilované vody. Výsledná cDNA byla tak zředěna 1 : 4. Takto připravená cDNA

byla uchována při -20 °C. Celý postup se provádí paralelně se vzorky negativní kontroly „no RT“ s polovičními objemy viz. Tab. 1, kde je RT nahrazena vodou (LABGuide.cz [online]).

**Tab. 1** Složení mastermixu pro reverzní transkripci.

	mastermix "RT+" [μl]	mastermix "noRT-" [μl]
reakční pufr	4	2
0,1 M DTT	2	1
10 mM dNTPs	2	1
ProtoScript II RT	0,5	-
DEPC H <sub>2</sub> O	2,5	1,5
13x (12 vzorků + 1 rezerva)		
reakční pufr	52	26
0,1 M DTT	26	13
10 mM dNTPs	26	13
ProtoScript II RT	6,5	-
DEPC H <sub>2</sub> O	32,5	19,5

#### 4.2.4 Real-Time PCR

Replikace jednořetězcové DNA s pomocí syntetických primerů a DNA polymerasy byla poprvé popsána již v 70. letech 20.století. Nicméně polymerasová řetězová reakce (PCR) jak ji známe nyní, sloužící pro amplifikaci cílové DNA, byla vyvinuta Kary Mullisem až v roce 1983. Je jednou z nejznámějších metod molekulární biologie a byla oceněna Nobelovou cenou za chemii. Existuje tedy hned několik metod PCR.

Pro naši práci byla použita metoda kvantitativní PCR v reálném čase, označovaná souhrnně jako qPCR. Od klasické PCR liší v tom, že monitoruje amplifikaci DNA neustále, nejen na jejím konci. Detekce je umožněna přítomností fluorescenčního substrátu, který fluoreskuje až po navázání na specifický úsek DNA. Poté je měřena hladina fluorescence, která odráží množství původní DNA. Slouží tak především pro kvantifikaci DNA, nejčastěji genové exprese.

Reakci rozlišujeme na několik fází, při kterých je využíváno skokových změn teplot. Nejprve probíhá fáze denaturace, kdy jsou od sebe DNA řetězce separovány díky vysoké teplotě. Ve fázi annealingu poté nasedají při nižší teplotě primery na komplementární části jednořetězcového vlákna DNA. V konečném kroku, fázi extenze,



díky DNA polymerase probíhá syntéza komplementárního řetězce DNA. V průběhu reakce jsou všechny tři fáze cyklicky opakovány a dochází tak k postupné syntéze DNA. (Loftis a Reeves, 2012, LABGuide.cz [online], Thermo Fisher Scientific [online]).

Pro kvantifikaci lze použít dvě metody. Pokud známe koncentraci cDNA použije se metoda absolutní kvantifikace z kalibrační křivky. Jestliže koncentrace není známa, použijeme metodu relativní kvantifikace. Při té je porovnávána fluorescence zkoušených vzorků s jiným vzorkem tzv. vnitřní kontrolou. Pro toto stanovení jsou nezbytné referenční geny k normalizaci dat. Výběr referenčních genů je důležitým faktorem při studiu exprese. V různých experimentálních podmínkách je nezbytné mít pro experiment referenční geny validované. V této práci byl použit gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenasu (GAPDH). Tento referenční gen byl vybrán na základě experimentu (Lecová *et al.*, 2015), kde byla prověřena jeho stabilita a spolehlivost pro studie exprese pomocí qPCR u dospělců *H. contortus*.

**Tab. 2** Souhrn zkoumaných UGT sekvencí *H. contortus*. Charakteristiky jednotlivých genů a jejich primerů. a - identifikační pozice genu v genomové databázi, b - číslo odpovídající verzi genomu V3. Amplicon - délka produktu v párech bazí. Zeleně zatím nalezené v proteomu.

Název genu	Lokus <sup>a</sup>	Gene modell number <sub>b</sub>	Sekvence F (forward) primeru	Sekvence R (reverse) primeru	Ampli con (nt)	Účinnost (%)
UGT22 A2	HCOI00 058000	g5477	GATCTCTGTGG AATCGGCGT	TATGAAGGTGGT GCTGGGAC	119	100
UGT24 B1	HCOI00 244800	g4156	ACGTACACCTA TTCCAATGGCT	CCTTGGTTTTGG GGTGTGAAG	60	106
UGT24 C1	HCOI00 868700	g3647	GGATCCGAGAC ATAGGCAGC	ACAGTGAGTTTG CATCCCTC	69	93
UGT24 D1	HCOI01 592800	g4156	GAGTAGCAGA GACGTTGGCA	TCCCGAAATCAT CACCATCGT	59	100
UGT24 D2	HCOI00 244900	g4328	GATCAGTCGCT CCCAGTCAC	TGGGTGGCAATC GATCTTTCA	132	90
UGT36 5B3	HCOI01 461900	g3996	TCATTCGGTTC AGCAATCAAGG	CGAAGACTTCCA GAAAATTCCTCT	70	106
UGT36 5B4	HCOI01 462000	g3997	TTCACAAAACC ATCCCGCTC	CGGCATGTAGAT TGATTTAGCCA	149	106
UGT36 5B5	HCOI01 462200	g3999	CTTGGTGGAAAT CGCGGTCTA	TTTTGAGGTGCC CATGTGGT	269	100
UGT36 5B6	HCOI01 462100	g3998	TCCAAGTTATG TTCCAGGGCAT	AGTTCCTCATAA TCCTTGAACCGC	177	105
UGT36 6A1	HCOI02 015300	g3385	GCAGCCTTTGA TGAGCACAC	GGCCCACTTGAA TGAGACGA	68	100
UGT36 6D1	HCOI01 255000	g3397	CGGGAAGCCAT TGATCGAGT	TGAAAGGACGTC GCGCTAAT	88	90

Pro referenční i stanovované geny byly navrženy Ing. Petrou Matouškovou specifické primery, které byly ověřeny pomocí PCR, zda jsou vhodné pro naše stanovení. Detailnější charakteristiku primerů můžeme vidět v tabulce 2.

Analýza referenčních genů byla provedena metodou qPCR. Do vhodných stripů bylo napipetováno celkem 20 $\mu$ l směsi (5  $\mu$ l cDNA a 15  $\mu$ l mastermixu). Mastermix obsahoval 0,8 $\mu$ l F+R primerů (specifické primery F-forward a R-reverse) pro GAPDH nebo cílové geny, 4,2 $\mu$ l redestilované vody a 10 $\mu$ l SG Mixu (Xceed qPCR SG Mix *Lo-Rox*). SG Mix byl dodán výrobcem již v konečném složení. Všechny komponenty jsou v něm v optimální koncentraci a složení pro efektivní amplifikaci. Jednotným složením se redukuje počet pipetovacích kroků, které mohou ohrozit vzorek z hlediska kontaminace a zároveň šetří čas při přípravě reakční směsi. Obsahuje konkrétně: *Taq* polymerázu (modifikovaná Hot Start *Taq* polymeráza, která je nejen termostabilní, ale také zabraňuje tvorbě nespecifických produktů), dNTPs (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), reakční pufr a MgCl<sub>2</sub> a fluorescenční barvivo Sybr Green I pro stanovení v reálném čase. Každý vzorek byl měřen v duplikátu a pro každý set primerů byla stanovena negativní kontrola (NTC), kde byla namísto cDNA použita redestilovaná voda.

**Tab. 3** Podmínky při qPCR. Změny teplot a jednotlivé časy.

Fáze (všechny opakovaně ve 40 cyklech)	teplota [°C]	čas [min]x[s]
Hot Start (aktivace DNA polymerasy)	95	10 min
denaturace (vznik jednořetězcové DNA)	98	15 s
annealing (nasedání primerů)	60	20 s
extenze (syntéze DNA)	72	20 s
analýza křivky tání	60 - 95	každých 0,5 °C = 5 s

Pro vlastní analýzu vybraných genů UGT byly vzorky rozděleny dle pohlaví na: m - samci a f - samice, a kmene: ISE (citliví) a WR (rezistentní). Mastermix byl připraven stejně jako u analýzy referenčních genů. Jeho množství bylo přizpůsobeno celkovému počtu vzorků. Pro 12 vzorků se složení vynásobilo x 26 (24 vzorků + 1x NTC + 1 x rezerva na pipetovací chybu). Do zkumavky bylo tedy napipetováno 260 $\mu$ l SG Mixu, 20,8  $\mu$ l F+R primerů a 109,2  $\mu$ l redestilované vody. Do stripů bylo poté napipetováno 5  $\mu$ l cDNA a 15  $\mu$ l mastermixu. Rozložení vzorků můžeme vidět na

obrázku 7. Vzorky byly ihned označeny, promíchány a nakonec zcentrifugovány. Samotná analýza proběhla za podmínek stanovených v tabulce 3. v přístroji pro Real-Time PCR. Po ukončení měření byl zkontrolován průběh fluorescenčních křivek a křivky tání a výsledná data byla analyzována v PC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	} UGT 00X0
B	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	
C	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	} UGT 00Y0
D	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	
E	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	} UGT 00Z0
F	wr m1	wr m2	wr m3	wr f1	wr f2	wr f3	ise m1	ise m2	ise m3	ise f1	ise f2	ise f3	
G	NT C	NT C	NT C										} Negativní kontroly
H													

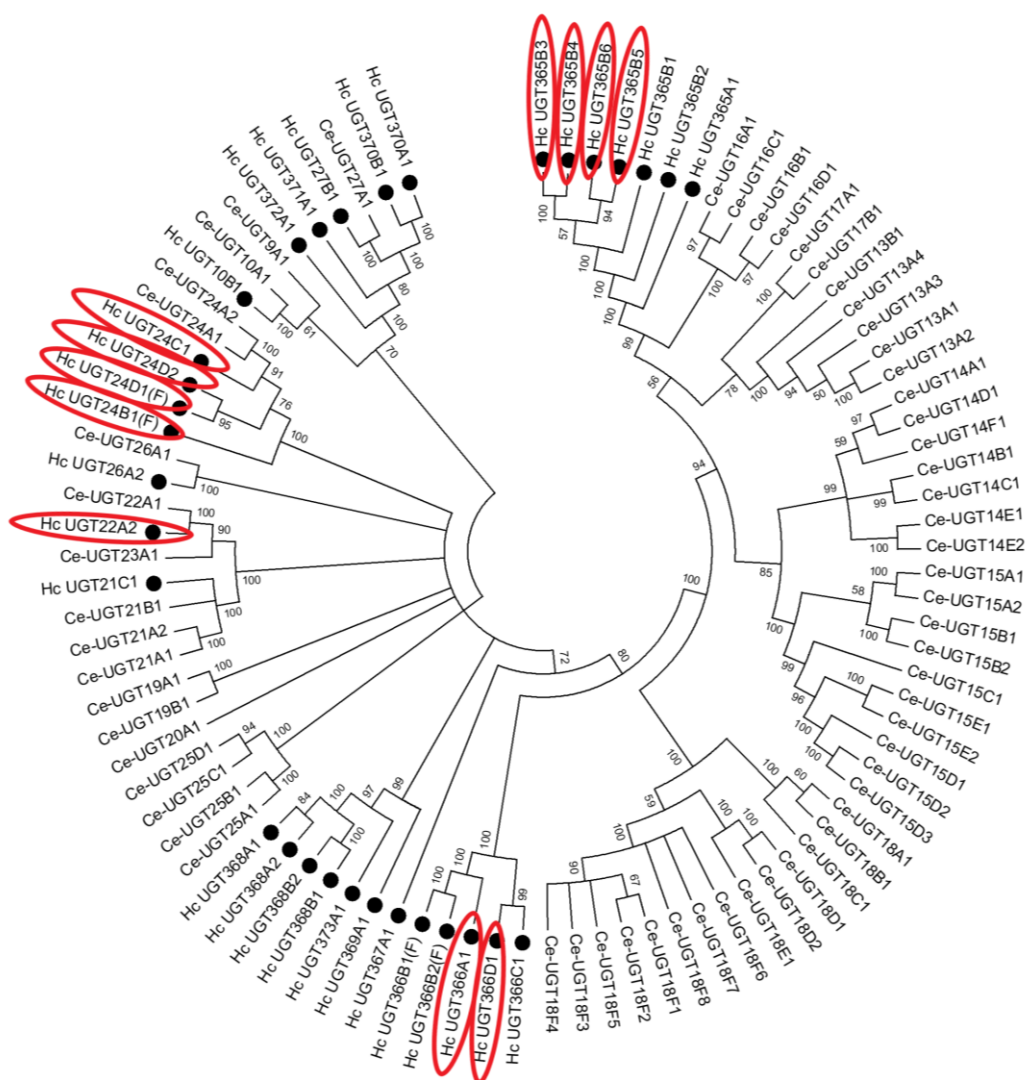
**Obr. 7** Schematické znázornění PCR stripů. Všechny vzorky jsou zkoušeny v duplikátech a ve třech biologických kopiích (jednotně označeny stejnou barvou) Označení: wr - rezistentní kmen, ise - citlivý kmen, m - samci, f - samice, NTC - negativní kontrola, UGT 00X0, 00Y, 00Z0 - příklad UGT

#### 4.2.5 Statistické vyhodnocení dat

Po vyhodnocení dat z PCR v Excelu, bylo Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. provedeno statistické vyhodnocení dat v programu GraphPad Prism 7.04 metodou OneWay ANOVA *s post hoc* Fisher's LSD testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti  $p \leq 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

V této studii byly měřeny hladiny vybraných UGT z *H. contortus*. Konkrétně se jednalo o UGT22A2, UGT24B1, UGT24C1, UGT24D1, UGT24D2, UGT365B3, UGT365B4, UGT365B5, UGT365B6, UGT366A1, UGT366D1. Byly vybrány Ing. Petrou Matouškovou na základě fylogenetického stromu (obr.8). Na obr 8. můžeme vidět dostupné geny u *C. elegans* a *H. contortus* a jejich vzájemnou příbuznost. Námi zkoumané UGT jsou na obrázku 8. vyznačeny červeně.



**Obr. 8** Fylogenetický strom dostupných genů *C. elegans* a *H. contortus* a jejich vzájemná příbuznost. Geny *H. contortus* jsou označeny černou tečkou a písmeny Hc s příslušným označením jednotlivých UGT. UGT použité v tomto experimentu jsou označeny červeně. Geny *C. elegans* jsou označeny Ce- s příslušným označením UGT.

## 5.1 Hodnocení koncentrace a integrity RNA

Pro stanovení koncentrace RNA byl použit spektrofotometr NanoDrop. Ke zjištění případného znečištění proteiny byl použit poměr absorbancí při vlnové délce 260 a 280nm, který by se měl blížit 2 (1,8-2). Pro detekci kontaminace fenolem byl zjišťován poměr absorbancí při 260 a 230nm, který by se měl blížit hodnotě 2. Výsledné hodnoty můžeme vidět v tabulce 4. Všechny zkoušené vzorky těmto hodnotám vyhovovaly a mohly být použity pro další práci.

**Tab. 4** Koncentrace RNA naměřená spektrofotometrem NanoDrop. wr - rezistentní kmen, ise - citlivý kmen, f - samice, m - samci, 260/280, 260/230 - poměr absorbancí při určité vlnové délce v nm.

Sample ID	c RNA [ng/ul]	260/280 [nm]	260/230 [nm]
wr m1	390,4	1,9	2,0
wr m2	394,9	1,9	2,1
wr m3	349,8	2,0	1,4
wr f1	867,4	2,1	2,1
wr f2	1311,0	2,1	1,7
wr f3	1324,0	2,1	2,0
ise m1	423,7	1,9	1,6
ise m2	249,2	1,9	2,3
ise m3	256,6	1,9	1,0
ise f1	892,0	2,0	1,7
ise f2	991,8	2,1	1,7
ise f3	786,8	2,1	1,8

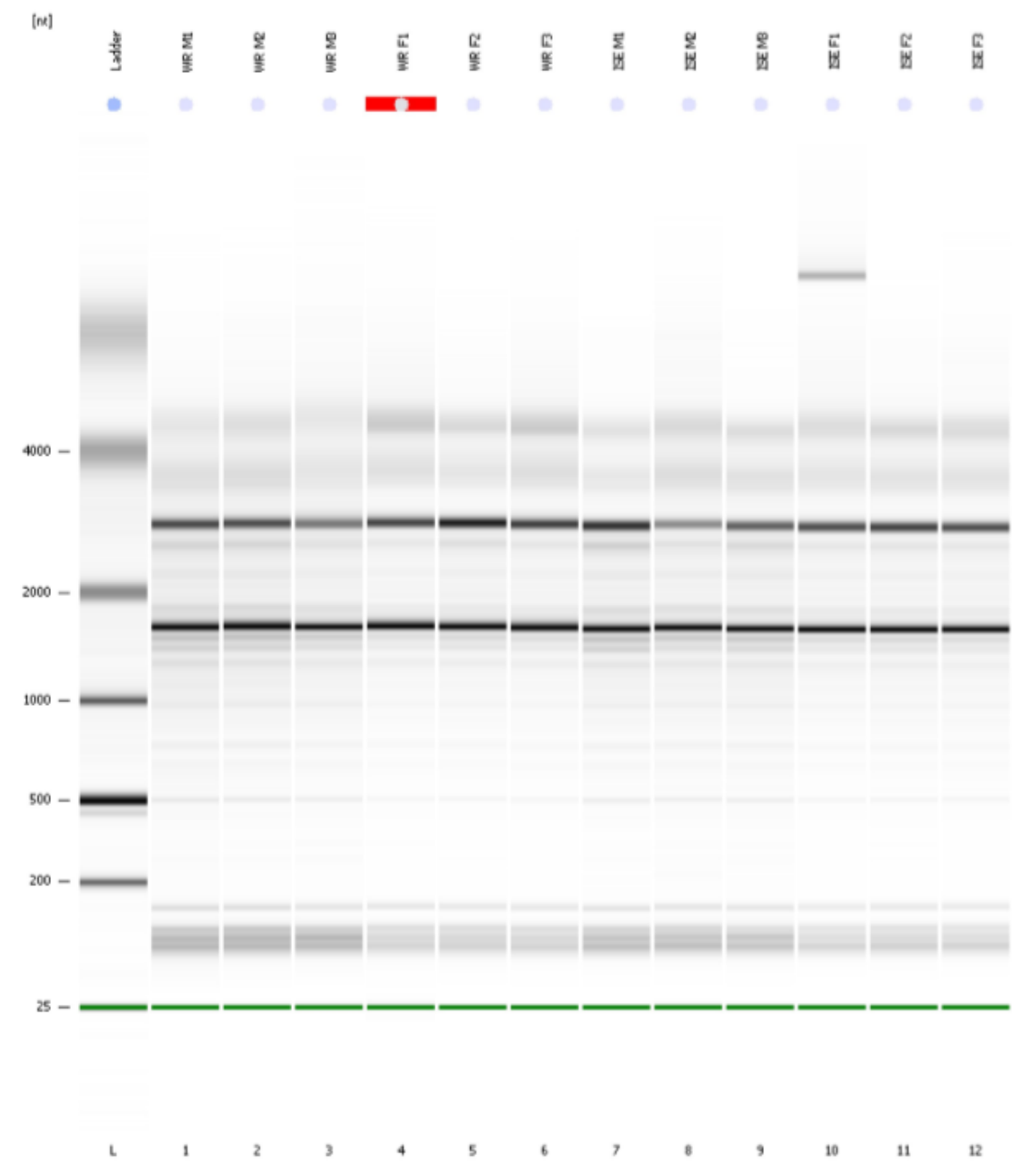
K ověření koncentrace a integrity RNA byl použit bioanalyzátor s mikročipy. Hodnocení integrity RNA je prvním kritickým krokem při získávání dat o genové expresi. Použití neporušené RNA je klíčové pro další analýzu (microarray, Real-Time PCR). Pomocí bioanalyzátoru Agilent 2100 a RNA LabChip® je možné stanovit kvalitu RNA. Přístroj poskytuje informace o koncentraci, integritě a generuje tzv. ribosomální poměry. Použitím elektroforetické separace na mikročipech je RNA nejprve separována a následně je detekována fluorescence indukovaná laserem. Výsledkem měření je

elektroferogram s možností náhledu, jak by vypadalo toto stanovení na agarosovém gelu. Ty však nedostatečně popisují integritu vzorku, proto bylo zaveden systémový algoritmus tzv. RIN číslo (RNA Integrity Number), které odstraňuje chyby individuální interpretace výsledků. Umožňuje klasifikaci eukaryotické RNA pomocí stupnice 1 až 10, přičemž 1 je nejvíce degradovaná a 10 je nejméně porušená RNA (Mueller *et al.* 2004). Naše vzorky byly analyzovány bioanalyzátozem Agilent 2100 s použitím Eucaryote Total RNA Nano. Všechny vzorky měly  $RIN \geq 7$ , což vypovídá o jejich dostatečné kvalitě a integritě, a proto mohly být použity pro další pokusy. Pouze u vzorku WR F1 nebyla z neznámých důvodů hodnota RIN čísla určena (Obr. 9. a 10.). Vzhledem k tomu, že výsledné měření i u tohoto vzorku vypadalo stejně jako u ostatních, tedy že nebyla patrná žádná degradace, která by se projevila jako větší pík/množství kratších RNA, byl i tento vzorek použit pro další stanovení.

#### Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
WR M1		✓	RIN:7	
WR M2		✓	RIN: 7.10	
WR M3		✓	RIN: 7.90	
WR F1		✓	RIN N/A	
WR F2		✓	RIN: 8.60	
WR F3		✓	RIN: 8.60	
ISE M1		✓	RIN: 7.10	
ISE M2		✓	RIN: 7.40	
ISE M3		✓	RIN: 7.20	
ISE F1		✓	RIN: 8.50	
ISE F2		✓	RIN: 8.30	
ISE F3		✓	RIN: 8.30	
Ladder		✓	All Other Samples	

**Obr. 9** Hodnoty RIN našeho měření vyhodnocené bioanalyzátozem Agilent 2100. Všechny vzorky měly  $RIN \geq 7$ , což vypovídá o jejich dostatečné kvalitě a integritě.



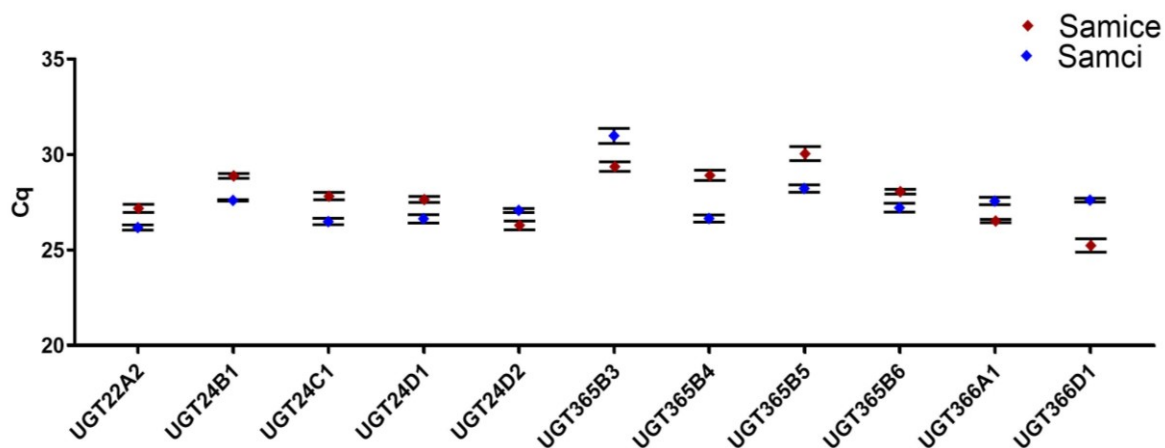
**Obr. 10** Výsledek měření bioanalyzátozem Agilent 2100. Náhled elektroferogramu při převedení dat z bioanalyzátozem do podoby agarosové elektroforesy.

## 5.2 Analýza konstitutivní genové exprese

Pro kvantifikaci genové exprese u citlivých (ISE) a rezistentních (WR) kmenů *H. contortus* byla použita metoda qPCR. Stanovovalo se vždy 11 genů UGT u každého vzorků. Pracovali jsme se třemi biologickými replikáty od jednoho pohlaví a kmene.

### 5.2.1 Porovnání exprese mezi pohlavími

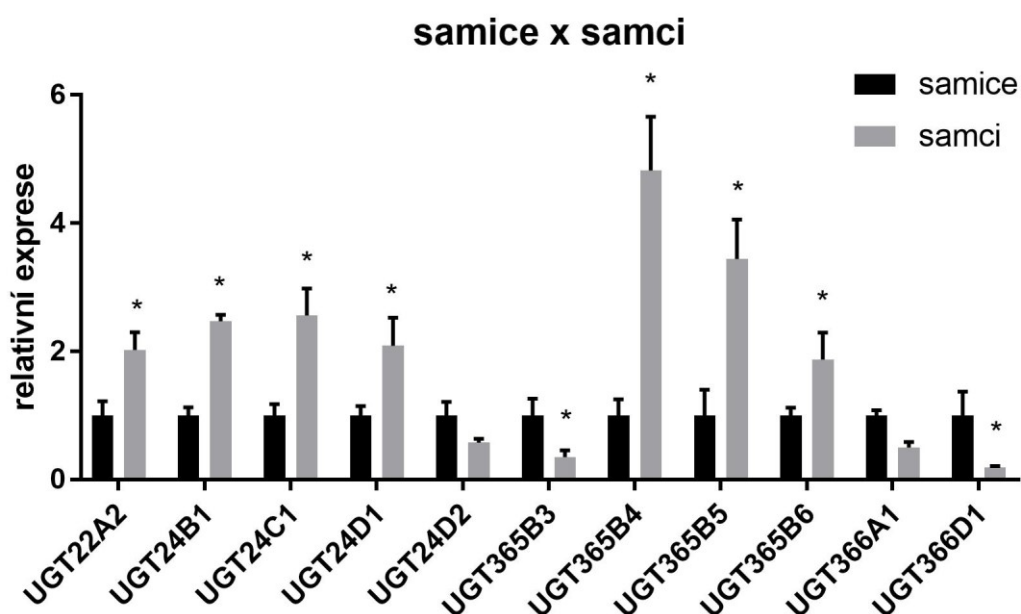
Na obr 11. jsou znázorněny měřené hodnoty C<sub>q</sub> pro všechny vzorky. Je zde vidět rozdíl exprese mezi samci a samicemi u vybraných UGT. Čím je hodnota C<sub>q</sub> vyšší, tím nižší byla počáteční koncentrace templátové DNA. U samic byla nejvyšší exprese zaznamenána u UGT 366D1, UGT24D2 a UGT366A1. Nejnižší exprese pak u UGT365B5, UGT365B3 a UGT365B4. Expresu u samců byla nejvyšší u UGT22A2, UGT24C1 a UGT24D1. Nejnižší expresi u samců měly pak UGT365B3, UGT365B5 a UGT366A1. Nejvyšší expresi mezi všemi UGT měla UGT366D1 u samic. Celkově nejnižší exprese byla zaznamenána u samců konkrétně u UGT365B3, která byla u samic také mezi třemi UGT s nejnižší expresí.



**Obr. 11** Porovnání exprese mezi samci a samicemi jednotlivých UGT pomocí hodnot C<sub>q</sub>.



Na obrázku 12 je zobrazeno relativní porovnání exprese vybraných UGT pouze u citlivého kmene. Je patrné, že výsledky poměrně dobře korespondují s výsledky na předchozím obrázku 11. Zde vidíme konkrétní rozdíly mezi pohlavími i se statistickým vyhodnocením. Obecně lze porovnat zvýšenou expresi v UGT u samců. Největší rozdíl mezi samci a samicemi můžeme vidět v expresi UGT365B4 a UGT366D1, s opačnými tendencemi v míře exprese. Rozdíly v expresi mezi pohlavími mohou znamenat jiný účel jednotlivých UGT.



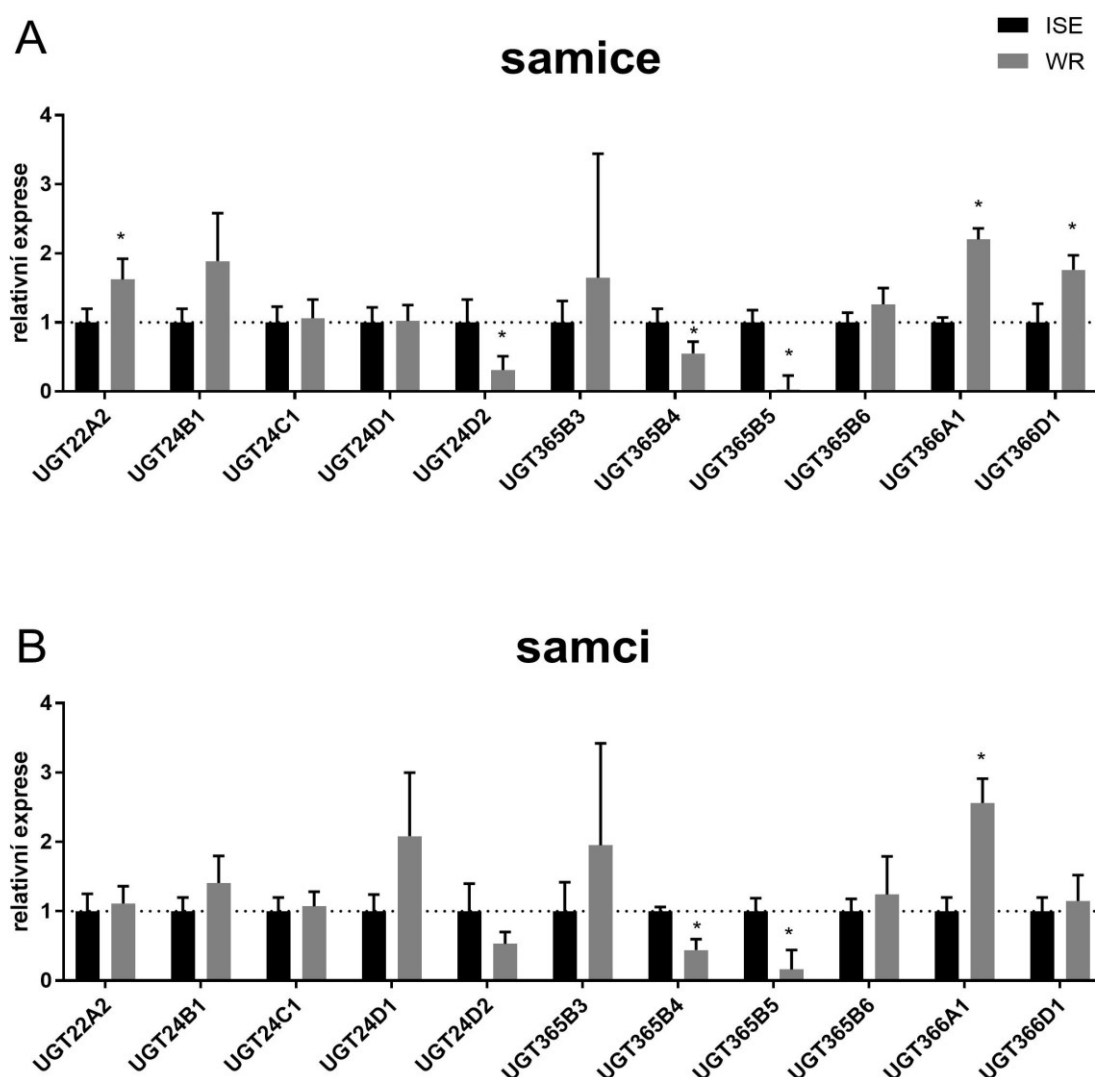
**Obr. 12** Relativní porovnání exprese UGT mezi samci a samicemi. Samice jsou vyznačeny černě, samci šedivě. \* jsou označeny výsledky s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.2 Porovnání exprese mezi kmeny

Při porovnávání dat mezi kmeny s odlišnou citlivostí (ISE x WR) podle obrázku 13 byly u samců zaznamenány statisticky významné rozdíly ve třech případech. U dvou UGT genů: UGT365B4 a UGT365B5 bylo zaznamenáno překvapivé snížení exprese u rezistentního WR kmenu oproti citlivému ISE kmenu. Pouze u UGT366A1 WR kmenu byla výrazně zvýšená exprese.

Samice měly rozdíl exprese mezi kmeny ve více případech než samci, konkrétně v šesti. Ve třech z nich (UGT24D2, UGT365B4, UGT365B5) se jednalo o snížení exprese u WR kmene oproti ISE. Zvýšení exprese u WR kmene bylo zaznamenáno u UGT22A2, UGT366A1 a UGT366D1.

U dvou genů: UGT365B4 a UGT365B5 byla zaznamenána snížená exprese u samců i samic z kmene WR. V případě UGT366A1 došlo ke zvýšené expresi u obou pohlaví WR kmene.



**Obr. 13** Relativní porovnání exprese UGT mezi kmeny ISE a WR u samic a samců. Obrázek A znázorňuje rozdíly mezi ISE kmenem (černě) a WR kmenem (šedivě) u samic. Část B znázorňuje tento rozdíl u samců. \* jsou označeny výsledky s hladinou významnosti  $p \leq 0,05$ .

## 6. DISKUSE

I přes znalost biologie hlístic, infekcí jimi způsobenými a neustálý výzkum zabývající se vznikem rezistence, jsou hemonchózy jedny z nejrozšířenějších parazitárních onemocnění chovu malých přežvýkavců. Anthelmintika zůstávají hlavním prostředkem v boji proti gastrointestinálním hlísticím jako je *Haemonchus contortus*. Léčba anthelmintiky je relativně levná, dostupná, s rychlým efektem a nenáročnou aplikací. Díky jejich neuváženému používání je dnes ale ve většině zemí s rozvinutým chovem ovcí a koz rozšířena rezistence na většinu ze zástupců anthelmintik. V některých oblastech je kvůli stavu rezistence chov a produkce těchto přežvýkavců prakticky nemožný (Vadlejch a Langrová, 2014). Vývoj nových léčiv je složitý a zdoluhavý, a jak můžeme vidět na zástupci skupiny aminoacetonitrilových derivátů monepantelu, ani nové léčivo není zárukou vyřešení léčby u rezistentních kmenů.

Díky tomu, že byl nedávno publikován genom *H. contortus*, otevřela se nám cesta pro studium jeho genové exprese a možnost porovnání například s volně žijícím *C. elegans*. Porovnání genové exprese u citlivých a rezistentních kmenů by totiž mohlo pomoci k identifikaci konstitutivních a anthelmintiky indukovaných genů zapojených do vzniku rezistence (Laing *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že pro detoxikaci xenobiotik u hlístic jsou důležité enzymy II.fáze biotransformace, a to především UDP-glykosyltransferasy. Při zkoumání metabolizace FLU a ABZ u hlístic, bylo *ex vivo* detekováno zvýšené množství glukosidových metabolitů FLU u rezistentních kmenů. *In vivo* byly pak nalezeny výrazné změny aktivity UDP-glukosyltransferas mezi citlivými a rezistentními kmeny (Vokřál *et al.* 2013, Vokřál *et al.* 2012). Na druhou stranu byly tyto experimenty jen přibližné, jelikož nezohledňovaly rozdíly v metabolismu samců a samic, které mohou být výrazné. Výsledky experimentu Raisová Stuchlíková *et al.*, 2018 ukázaly, že většinou se nachází větší množství metabolitů u samic a také, že mohou být tyto metabolity specifické jen pro určité pohlaví (byly nalezeny tři specifické metabolity jen pro samice). Zohlednit musíme také fakt, že použité metody dostupné v době původního experimentu nebyly na takové úrovni jako dnes. Metody nejen molekulární biologie se vyvíjejí velice rychle a už nyní umožňují detailnější, citlivější a rychlejší práci. O tom se můžeme přesvědčit v novějších experimentech zabývajících se tímto tématem. Bylo objeveno dalších 8 metabolitů, z nichž některé vznikly reakcemi u

hlístic dosud nepopsanými, nebo se tyto metabolity od stávajících liší jen v prostorovém uspořádání. Vyvstává tedy otázka, zda metabolity nalezené do dnešní doby, považované za glukosidy, jsou opravu konjugáty s glukosou, nebo se jedná o jiné deriváty hexos (Raisová Stuchlíková *et al.*, 2018). Deaktivace pomocí glykosidace, přidáním aktivovaného cukerného zbytku na lipofilní sloučeninu, je rozhodně možným důvodem zrychlené metabolizace anthelmintik a vzniku rezistence u hlístic (Laing *et al.*, 2013, Vokřál *et al.* 2013, Vokřál *et al.* 2012).

Z těchto důvodů a také proto, že dosud ještě nebyly dostatečně zkoumány, byly pro naši práci vybráni zástupci z rodiny UGT. Konkrétně bylo cílem stanovit konstitutivní expresi vybraných UDP-glukosyltransferas u vlasovky slezové. Nejprve byly identifikovány předpokládané geny kódující UGT u *H. contortus* a poté byly tyto geny porovnány s již známými UGT u *C. elegans*. Výsledkem byl fylogenetický strom na obrázku 8, kde byly jednotlivé UGT systematicky pojmenovány na základě jejich aminokyselinové sekvence. Pomocí qPCR byly pak u vybraných UGT sledovány změny konstitutivní exprese mezi pohlavími u citlivého (ISE) a multirezistentního (WR) kmene. Tím, že byli samci a samice testováni odděleně, bylo možné i mezi nimi sledovat rozdílnou expresi. U samců byla zaznamenána všeobecně vyšší exprese jednotlivých genů oproti samicím. U samic byla častější změna exprese mezi kmeny ISE a WR. Celkem ve třech vzorcích UGT byla u samic zaznamenána vyšší exprese u WR kmene. U jedné UGT (UGT366A1) byla vyšší exprese zaznamenána i u samců WR kmene, což naznačuje odlišný metabolismus rezistentního kmene, a s tím i možnost propojení s výskytem rezistence a větším množstvím metabolitů BZ anthelmintik. I přes zaznamenané rozdíly v expresi u některých UGT rezistentního kmene, není zatím potvrzené nakolik, a jakým způsobem jsou tyto změny důležité pro ovlivnění vývoje rezistence. V nedávném experimentu s mutantními kmeny *C. elegans* bylo zjištěno, že jedna ze sledovaných UGT (ugt-22, na obr 8. Ce-UGT16C1) má důležitou roli při účinnosti ABZ. Toto je první přímý důkaz účinku UGT při rezistenci u hlístic (Fontaine a Choe, 2018).

Vybrané UGT byly v této práci zkoumány pouze jednou. Pro potvrzení závěrů je proto nutné měření opakovat. Další studie by se pak mohly zaměřit na jednotlivé UGT, které v práci vykazovaly výrazné změny exprese. Vhodné bude také zhodnocení exprese UGT i u dalších členů z této rodiny enzymů. Je jisté, že se rezistence bude i nadále rozšiřovat, je proto nutné pokračovat ve studiích, a co nejdříve objasnit mechanismy jejího vzniku, abychom mohli efektivně bojovat proti odolným jedincům.

## 7. ZÁVĚR

V této práci byla zkoumána konstitutivní genová exprese u vybraných genů UDP-glukosyltransferas hlístice *H. contortus*. Pro analýzu byly odebrány vzorky RNA požadované kvality a kvantity. Tyto vlastnosti byly ověřeny vhodnou metodou. Pomocí qPCR mohly být porovnány vzorky od citlivých i rezistentních kmenů *H. contortus*, rozlišených dle pohlaví. U více testovaných genů byla vyšší exprese u samců než samic. U samců a samic WR kmene došlo shodně k vyšší expresi u jediného genu UGT366A1. U genů UGT365B4 a UGT365B5 byla u obou pohlaví rezistentního kmene zaznamenána nižší exprese.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

ABC	ATP-binding cassette
ABZ	albendazol
AKR	aldo-keto reductasy
ATP	adenosine triphosphate – adenosin trifosfát
BZ	benzimidazol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA – komplementární DNA k RNA
Cq	cycle of quantification – cyklus kvantifikace
CYP	cytochrom P450
<i>D. flagrans</i>	<i>Duddingtonia flagrans</i>
dATP	deoxyadenosin trifosfát
dCTP	deoxycytidin trifosfát
DEPC	diethylpyrocarbonate – diethylpyrokarbonát
dGTP	deoxyguanosin trifosfát
DNA	deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DTT	dithiotreitol
dTTP	deoxythymidin trifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
EHT	egg hatch test – test líhnutí vajíček
EPG	eggs per gram – počet vajíček v gramu trusu
F	samice <i>H. contortus</i>
F primer	forward primer
FECRT	faecal egg count reduction test – test redukce vajíček v trusu
FLU	flubendazol
FMO	flavin monooxygenasa
GABA	gamma-aminobutyric acid – kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GSH	glutathion
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>

H <sub>2</sub> O	voda
ISE	Inbred Susceptible Edinburgh – citlivý kmen <i>H. contortus</i>
IVE	ivermektin
L3	larvální stadium <i>H. contortus</i> 3. stupně
LDT	larval development test – test vývoje larev
M	samec <i>H. contortus</i>
MDR	medium - chain dehydrogenases/reductases - dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
noRT	mastermix pro reverzní transkripci, která proběhne bez enzymu RT
NTC	no template control – negativní kontrola
PCR	polymerase chain reaction – polymerasová řetězová reakce
pLGIC	Pentameric ligand gated ion channels – Iontové kanály s pentamerickým ligandem
PMK	premedikované krmivo
qPCR	kvantitativní PCR
R primer	reverse primer
RIN	RIN číslo – RNA Integrity Number
RNA	ribonucleic acid – kyselina ribonukleová
RNasy	ribonukleasy
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku
RT	reverzní transkriptasa (také RNA dependentní DNA polymerasa)
RT+	mastermix pro reverzní transkripci, která proběhne s enzymem RT
RT-	mastermix pro reverzní transkripci, která proběhne bez enzymu RT
SDRs	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
Tris-HCl	hydrochlorid trometamolu (2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diolu)
TST	targeted selective treatment - cílené selektivní ošetření
UDP	uridin diphosphate – uridindifosfát
UGT	UDP–glykosyltransferasa, v této práci UDP–glukosyltransferasa
WR	White River – multirezistentní kmen <i>H. contortus</i>

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

AGUILAR-MARCELINO, L., MENDOZA-DE-GIVES, P., TORRES-HERNÁNDEZ, G., LÓPEZ-ARELLANO, M., BECERRIL-PÉREZ, C., ORIHUELA-TRUJILLO, A., . . . OLMEDO-JUÁREZ, A. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*, 2017, 91(6), 665-671. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X1600081X>

ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE, A. C., C. C. BASSETTO, F. ALVES DE ALMEIDA a A.F.T. AMARANTE. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. *Veterinary Parasitology*, 2017, vol. 246, 112-117. ISSN 0304-4017.

ATIF, M; et al. Effects of glutamate and ivermectin on single glutamate-gated chloride channels of the parasitic nematode *H. contortus*. *PLoS Pathogens*, 2017,13, 10, 1-30. ISSN: 15537366

AXMANN, R. a SEDLÁK, J. *Základy veterinární péče o ovce a kozy pro chovatele*. Vyd. 1. Brno: Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR, 2008. 47 s. ISBN 978-80-904140-5-1.

BATH, G.F. a J.A. VAN WYK. The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2009, (vol.86, iss.1-3), 6-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.009>. ISSN 0921-4488.

BOUŠOVÁ, I. a L. SKÁLOVÁ. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metabolism Reviews*. 2012, 267-286. DOI: 10.3109/03602532.2012.713969.

CINTRA, M.CH.R., R.D. OLLHOFF a C.S. SOTOMAIOR. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. *Veterinary Parasitology*, 2018 (251), 106-111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.005>. ISSN 0304-4017.



COLES, G. C., JACKSON, F., POMROY, W. E., PRICHARD, R. K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SILVESTRE, A., TAYLOR, M. A. a VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 2006, vol. 136, no. 3–4, s. 167–185.

CVILINK, V., V. KUBÍČEK, M. NOBILIS, et al. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 2008 (151), 242-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.010>. ISSN 0304-4017.

CVILINK, V. Metabolismus anthelmintik u helmintů. *Metabolismus anthelmintik u helmintů / Viktor Cvilink; vedoucí práce Lenka Skálová; oponent práce Michal Holčápek, Miroslav Machala* [online]. 2008 [cit. 2018-08-11].

DOBŠÍKOVÁ, R. a ŠIROKÁ, Z. *Farmakologie v produkci potravin a rezidua léčiv v potravinách*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 104 s. ISBN 978-80-7305-748-0

DYK, V., ZAVADIL, R. a CHROUST, K. *Parazitologie a invazní choroby: vybrané kapitoly z veterinární helmintologie: určeno pro posl. Vys. školy veter. v Brně. 2., zcela přeprac. vyd. Praha: SPN, 1972. 163 s.*

E MEDEROS, A., Z. RAMOS, G. E BANCHERO. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*. 2014 (7:598), 4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0598-z>.

FONTAINE, P. a K. CHOE. The transcription factor SKN-1 and detoxification gene *ugt-22* alter albendazole efficacy in *Caenorhabditis elegans*. *IJP: Drugs and Drug Resistance*. 2018, (8), 312–319. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.04.006>.

HARTL, J. et al. *Farmaceutická chemie IV. 2., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2012. 166 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2129-6.*

HORÁK, F. et al. Chováme ovce. Vyd. v češtině 1. Praha: Ve spolupř. se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, 2012. 383 s. ISBN 978-80-209-0390-7.

HORÁK, P. a T. SCHOLZ. Biologie helmintů. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-782-8.

JACOBS, D., FOX, M., GIBBONS, L., & Hermosilla, C 2015, *Principles of Veterinary Parasitology*, John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken. Available from: ProQuest Ebook Central. [1 August 2018].

JÍRA, J. Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci. Praha: Galén, 1998. ISBN 80-85824-82-5

KAMINSKY R., BAPST B., STEIN P.A, *et al.* Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*. 2011;109(1):19-23. doi:10.1007/s00436-010-2216-0.

KOŘÍNKOVÁ, K. *Obecná parazitologie: význam a biologie parazitů*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, 2006. ISBN 80-7044-798-2.

KUCHTÍK, J. a kol. *Chov ovcí*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 110 s. ISBN 978-80-7375-094-7.

LAING, R. et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome biology*, 2013, vol.14, no.8.

LAMKA, J. a DUCHÁČEK, L. Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Vyd. 4., nezměn. Praha: Karolinum, 2014. 151 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2790-8.

LANGROVÁ, I. et al. Zoologie bezobratlých. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2010. 160 s. ISBN 978-80-213-2111-3

LARSEN M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*. 2000, 120: 121-131

LAŠTŮVKA, Z. a kol. Zoologie. Vydání: první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. 263 stran. ISBN 978-80-7509-188-8.

LECOVÁ, L., M. RŮŽIČKOVÁ a R. LAING. Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2015, vol.201, iss.2, 123-127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.08.001>.

LOFTIS, A.D. a W.K. REEVES. Principles of real-time PCR. *Veterinary PCR Diagnostics*. Bentham Science Publishers, 2012, capt. 1, 3-17. DOI: 10.2174/97816080534831120101.

MATOUŠKOVÁ, P., I. VOKŘÁL, J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*. 2016, vol. 32, iss. 6, 481-491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>. ISSN 1471-4922.

MEECH, R., J.O. MINERS, B.C. LEWIS a P.I. MACKENZIE. The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012 (vol. 134, iss.2), 200-218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.009>. ISSN 0163-7258.

MUELLER, O., S. LIGHTFOOT a A. SCHROEDER. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control [online]. Waldbronn, Germany: Agilent Technologies, 2004 [cit. 2018-08-16]. Dostupné z: <http://gene-quantification.net/RIN.pdf>

OAKLEY A. J.: Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Met.Rev.*, 43(2),2011, 138-151

PAPADOPOULOS, E. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*. 2008, (vol. 76, iss. 1-2), 99-103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.12.012>. ISSN 0921-4488.

ROWLAND, A., J.O. MINERS a P.I. MACKENZIE. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013, (vol. 45, iss.6), 1357-2725. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019>.

RYŠAVÝ, B. a kolektiv. *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. 215 s.

RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L., P. MATOUŠKOVÁ, I. VOKŘÁL, et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *IJP: Drugs and Drug Resistance*. 2018, vol.8, iss. 1, 50-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>.

SKÁLOVÁ, L. a kol. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. 171 stran. Učební texty Univerzity Karlovy. ISBN 978-80-246-3733-4.

ŠTOLC, L., NOHEJLOVÁ, L. a ŠTOLCOVÁ, J. *Základy chovu ovcí*. Praha: Ústav zemědělské ekonomiky a informací, ©2012. 84 s. ISBN 978-80-7271-201-4

TAYLOR, M.A., K.R. HUNT a K.L. GOODYEAR. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 2002, vol. 103, iss. 3, 183-194. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00604-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00604-5). ISSN 0304-4017.

VADLEJCH, J. a LANGROVÁ, I. *Gastrointestinální hlístice ovcí*. 1. vyd. Praha: Powerprint, 2014. 105 s. ISBN 978-80-87994-20-7.

VAN WYK, J.A. a G.F. BATH. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res.* 33. 2002 (5), 509-529. DOI: 10.1051/vetres:2002036.

VEJČÍK, A. a PEŠINOVÁ, P. *Chov ovcí a koz*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012. 145 s. ISBN 978-80-7394-346-2

VELÍK, J., V. BALIHAROVÁ, J. FINK-GREMMELS, J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in Veterinary Science*. 2004 (76), 95-108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.08.005>. ISSN 0034-5288.

VOKŘÁL, I., BÁRTÍKOVÁ, H., PRCHAL, L., STUHLÍKOVÁ, L., SKÁLOVÁ, L., SZOTÁKOVÁ, B., . . . KUBÍČEK, V. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 2012, 139(10), 1309-1316. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182012000595>

VOKŘÁL, I., R. JIRÁSKO, L. STUHLÍKOVÁ, H. BÁRTÍKOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, J. LAMKA, M. VÁRADY a L. SKÁLOVÁ. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 2013 (196), 373–381. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.018>.

VOLF, P. a P. HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.

WOLSTENHOLME, A.J., I. FAIRWEATHER, R. PRICHARD, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA a N.C. SANGSTER. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 2004, Vol. 20, 469-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>. ISSN 1471-4922.

## 9.1 Elektronické zdroje

LABGuide.cz [online] – qPCR [Citováno 12. srpna 2018], Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>

Thermo Fisher Scientific [online] – Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), [Citováno: 20. srpna 2018], Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>

PARKINSON A. (2001) – Biotransformation of xenobiotics. pp. 133-224, Dostupné z: <http://www.farmasi.unud.ac.id/ind/wp-content/uploads/Bio-Transformation-of-Xenobiotics.pdf>