

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Změny v expresi vybraných enzymů
metabolizujících léčiva u parazita po kontaktu
se subletálními dávkami léčiv**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Bc. Michael Pasák

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své vedoucí práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení, cenné postřehy a připomínky. Veliké poděkování patří zejména Mgr. Pavlíně Kellerové za její neuvěřitelnou trpělivost a velmi přínosné rady při praktickém i teoretickém zpracování této diplomové práce. Rád bych také vyzdvihl skvělé pracovní prostředí, které je tvořeno zkušeným kolektivem celé katedry.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Michael Pasák

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

Název diplomové práce: Změny v expresi vybraných enzymů metabolizujících léčiva u parazita po kontaktu se subletálními dávkami léčiv

Parazitem, který způsobuje významné ztráty v chovu hospodářských zvířat skrze onemocnění zvané hemonchóza, je vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*). Jedním z anthelmintik používaným ve veterinární medicíně v boji proti hemochóze je i ivermektin (IVM). Příčinou problémů s tímto parazitem je častý výskyt rezistence na IVM i další podávaná anthelmintika. Předpokládá se, že určitou roli v rezistenci u vlasovky mohou hrát enzymy z rodiny cytochromů P450 (CYP) a efluxní transportéry P-glykoproteiny (P-gp). Tato diplomová práce se věnuje vlivu sub-letálních koncentrací IVM na změnu exprese genů pro jednotlivé CYP a P-gp. Před vlastním experimentem se dospělci kmene ISE *H. contortus* rozdělili na samce a samice. Po inkubaci dospělců se 3 různými koncentracemi IVM, byla izolována RNA a změna exprese vybraných genů se stanovila metodou qPCR. Byly zjištěny výrazné rozdíly v expresi testovaných genů u samců a samic. Kontaktem vlasovek s IVM došlo k signifikantním změnám v expresi testovaných genů jak pro CYP tak i P-gp. Indukční efekt IVM byl nejvíce zřetelný v genech pro P-gp.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Michael Pasák

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

Title of diploma thesis: The changes in expression of selected drug-metabolizing enzymes in parasites after exposition to sublethal doses of drugs

The parasite, which causes significant losses of small ruminants through a disease called haemonchosis, is the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. IVM is one of the anthelmintics used in veterinary medicine to eliminate haemonchosis. The main problem with this parasite is the presence of drug resistance to almost all administered anthelmintics including IVM. It is believed that xenobiotic-metabolizing enzymes such as cytochromes P450 (CYPs) and membrane efflux transporters P-glycoproteins (P-gps), play the role in resistance in *H. contortus*. This study focuses on the effect of sublethal doses of IVM on expression of selected CYPs and P-gps. Females and males of susceptible ISE strain *H. contortus* were separated before our experiment. After incubation of nematodes with three different concentrations of IVM, RNA was isolated and the changes in expression of selected genes were analyzed using qPCR. Significant sex-differences were observed in inducibility of tested genes. Significant IVM-induced changes in *H. contortus* were found in expression of CYP and P-gp genes. The induction effect of IVM was most pronounced in P-gp genes.

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Hlístice	9
2.1.1 Vlasovka slézová (<i>Haemonchus contortus</i>)	12
2.2 Hemonchózy	15
2.3 Léčba hemonchóz.....	16
3. Anthelmintika	17
3.1 Benzimidazoly.....	17
3.2 Makrocyclické laktony.....	18
3.3 Aminoacetonitrilové deriváty (AADs).....	19
3.4 Budoucnost léčby helmintóz	19
4. Rezistence.....	20
4.1 Enzymy metabolizující xenobiotika.....	21
4.2 Enzymy metabolizující xenobiotika u hlístic	22
4.2.1 Cytochromy P450 (CYP)	23
4.3 Transportéry xenobiotik	23
4.3.1 ABC transportéry	24
5. Cíl práce	26
6. Experimentální část	27
6.1 Biologický materiál, vybavení, chemikálie.....	27
6.1.1 Biologický materiál	27
6.1.2 Chemikálie.....	27
6.1.3 Přístroje	28
6.2 Postup.....	28
6.2.1 Izolace RNA	28
6.2.2 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem	29

6.2.3	Úprava DNAsou	30
6.2.4	Reverzní transkripce.....	31
6.2.5	PCR (Polymerase Chain Reaction)	32
6.2.6	Real-time PCR.....	33
7.	Výsledky	39
7.1	Zhodnocení dat naměřených pomocí qPCR.....	39
7.2	Vliv ivermektinu na expresi vybraných genů pro CYP	41
7.3	Vliv ivermektinu na expresi vybraných genů pro P-gp	44
8.	Diskuze	48
9.	Závěr	51
10.	Seznam zkratek	52
11.	Použité zdroje	53

1. ÚVOD

Hlístice jsou velmi nebezpeční parazité představující zásadní problém v chovu ovcí a přežvýkavců. Nejznámějším představitelem tohoto chovatelského problému je endoparazit vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*), která byla vybrána jako modelový organismus pro tuto diplomovou práci. Parazituje ve slezu ovcí a jiných přežvýkavců. Způsobuje záněty sliznice a těžkou anémií.

Léčba hemonchózy spočívá v podávání anthelmintik, hlavně makrocyclických laktonů (např. ivermektinu) nebo benzimidazolů (např. albendazolu). Avšak častým a opakovaným podáváním anthelmintik vlasovky přestávají být vůči anthelmintikům citlivé - vzniká tzv. léková rezistence, hlavní faktor komplikující léčbu hemonchózy a dalších helmintóz. Jedním z farmakokinetických principů rezistence je zvýšení exprese genů pro enzymy metabolizující léčiva, která se poté stávají inaktivními.

V rámci této práce byla sledována a porovnávána exprese vybraných genů pro enzymy u vlasovky slézové po kontaktu s anthelmintikem ivermektinem (IVM). Cílem bylo zjistit, jestli je parazit po kontaktu se subletálními dávkami léčiv schopen za účelem svého přežití změnit expresi a aktivitu svých biotransformačních enzymů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hlístice

Hlístice jsou všudypřítomné organismy na zemi. Zahrnují volně žijící parazity rostlin, člověka a dalších živočichů. Disponují trávicím, rozmnožovacím, nervovým a exkrečním systémem, ale postrádají cévní a dýchací systém. Hlístice mají kruhový průřez těla s jednoduchou stavbou, kde na jednom konci těla jsou ústa a na druhém řitní otvor (Basyoni a Rizk 2016).

Tělo hlístic je pokryto kutikulou, která se skládá z několika vrstev epi-, exo-, mezo-, endokutikuly a každá z nich se může skládat z několika podvrstev. Lemuje všechny ektodermální části trávicího traktu. Její funkce není jen oporná, ale jedná se o dynamickou strukturu, která umožňuje pohyb hlístic, probíhá přes ni výměna látek a účastní se interakcí s hostitelem (Volf *et al.* 2007). Epikutikula obsahuje vrstvu bohatou na polysacharidy, zlepšující obranyschopnost hlístice. Výběžky hypodermis pod kutikulou rozdělují svazky svalů do čtyř kvadrantů (Basyoni a Rizk 2016). Počet svazků svalů udává typ svalstva – holomyární, polomyární, meromyární. S trávicím traktem jsou spojeny svalové buňky (Volf *et al.* 2007).

Kutikula, svalstvo a hypodermis tvoří dohromady hydrostaticko-skeletální systém. Systém ohraničuje nepravou tělní dutinu – pseudocoel, která je vyplněná tělní tekutinou, podílející se na tělním turgoru i rozvodu živin. V tělní dutině jsou buňky, které se mohou pohybovat v tělní tekutině a účastnit se vnitrobuněčné komunikace, uskladnění vitamínu B12, syntézy proteinů nebo imunitních dějů (Basyoni a Rizk 2016).

Centrální nervový systém je tvořen hltanovým prstencem, odkud vybíhají nervová vlákna z amfid a hlavových neuronů. Z prstence směřují směrem dozadu dorsální, ventrální a laterální nervové provazce. Těla hlístic jsou bohatá na malé sensorické orgány jako cervikální nebo kaudální sensorické papily, které představují chemické a mechanické receptory. Amfidy jsou chemoreceptory, vyskytující se ve většině hlístic. Hlístice mají většinou dvě amfidy, umístěné laterálně v hlavové části a často slouží k jejich identifikaci (Basyoni a Rizk 2016). Neurony v amfidách zachycují chemické a tepelné signály z okolí, umožňují najít výhodnější pozici pro hledání hostitele, vyhnout se působení nox a toxinů. Srovnáním rezistentních a senzitivních kmenů *H. contortus* se ukázala značná degenerace těchto neuronů u rezistentních kmenů (Freeman *et al.* 2003).

Začátek trávicí soustavy hlístic tvoří dutina ústní s pysky, někdy ozubená, hltan, který spojuje dutinu ústní a střevo (Basyoni a Rizk 2016). Hltan lze u některých hlístic rozdělit na část svalnatou a žláznatou. V zadní části se může hltan rozšiřovat a vytvářet kulovitý nebo kónický bulbus. U trichineloidních hlístic tvoří lem hltanu žláznaté buňky-stichocyty, uspořádané do stichosomu (Volf *et al.* 2007). Stichosom je sekreční orgán, jehož sekrety mění procesy v buňkách hostitele ve prospěch parazita (Sofronic-Milosavljevic *et al.* 2015). Střevo představuje jednoduchá trubice s postranním výběžkem na začátku – slepé střevo. U samic ústí střevo análním otvorem, u samců je vyústění společně s pohlavní soustavou do kloaky. Část živin, ať už se jedná o tráveninu z trávicího traktu hostitele, obsah rostlinných buněk nebo krev může být přijímána i povrchem těla (Volf *et al.* 2007).

Hlístice jsou gonochoristé odděleného pohlaví se sexuálním rozmnožováním, ale v rámci cyklu se u některých druhů může objevit hermafroditismus nebo partenogeneze (Volf *et al.* 2007). Samčí rozmnožovací soustava je tvořena varletem, semenným váčkem a chámovodem, kam ústí přídatné žlázy (Basyoni a Rizk 2016). Z velmi tenkého nitkovitého varlete se zárodečnou tkání vede odvodný kanálek do chámovodu (*vas deferens*), sloužící pro dopravu samčích buněk a přecházející v chámomet (*ductus ejaculatorius*). Samci nedosahují rozměru samic, jejich tělo směrem dozadu vytváří vláknitý výběžek a stáčí se do tvaru písmene C. Zadní část těla se může rozšiřovat v orgán *bursa copulatrix*, ten umožňuje fixaci samice v místě gonoporu a usnadňuje rozmnožování (Smrž 2013). Kopulační burza je složena ze tří laloků vyztužených žebry. Utváření a rozložení žeber je důležitým taxonomickým znakem (Volf *et al.* 2007). K přichycení k samičímu pohlavnímu otvoru při kopulaci slouží také *spiculi* (Smrž *et al.* 2013). Jsou vloženy do samičí vulvy, kterou rozšíří a umožní lepší přesun spermií do samice (Basyoni a Rizk 2016). Spikuly jsou jehlicovité, pohyblivé, většinou párové útvary, u některých druhů je pouze jedna, u jiných nejsou přítomny vůbec. Drážky, v nichž se spikuly pohybují a samotné oddělení spikul zajišťuje *gubernaculum*, to ale u některých druhů chybí. Orientaci spikul u některých hlístic pak zajišťuje podpůrná struktura *telamon*, ve ventrální a laterální části kloaky (Volf *et al.* 2007).

Samice dosahují větších rozměrů. Samičí tenký vaječník (*ovarium*) se rozšiřuje ve vejcovod (*oviduct*) a nakonec v dělohu (*uterus*). Děloha dosahuje povrchu těla jako nepárová pochva (*vagina*). Děloha je mnohem větší než vejcovod, je naplněna vajíčky v různém stádiu oogeneze, kterým se zde také tvoří jejich vícevrstevné obaly (Basyoni a Rizk 2016). Zralá vajíčka jsou obalena mechanicky i chemicky odolným chitinósním

nebo lipidním obalem. Obal je odolný proti mechanickému tlaku, vlhkosti, vysychání, zavodnění nebo vymrznutí a může být i lepkavý (Smrž *et al.* 2013). Samičí vývod je tvořen ventrálně uloženou svalnatou vulvou. Její umístění u samice bývá taxonomickým znakem. Z ovárií putují oocyty do dělohy, ale k jejich oplození spermii dojde už ve vejcovod (Volf *et al.* 2007).

Hlístice při svém vývoji procházejí čtyřmi larválními stádii – na konci každého stádia syntetizují novou kutikulu a starou svlékají. U řádu Rhabditida, zahrnující *Caenorhabditis elegans*, se vyskytuje fenomén „dauer larva“, kdy larva nesvléká kutikulu předchozího stádia a dojde k vrstvení, což ji umožňuje přežít i nepříznivé podmínky (Kiontke a Fitch 2013).

Vývoj hlístic může být buď monoxenní - přímý nebo heteroxenní zahrnující mezihostitele. Monoxenní vývoj je typický pro geohelmintry jako např. škrkavka. K infekci monoxenních hlístic dochází perorálně (požitím infekční larvy) nebo perkutánně. Následuje migrace tkáněmi hostitele a usazení, většinou v trávicí soustavě. Heteroxenní hlístice jsou biohelminty s mezihostitelem, ať už bezobratlým nebo obratlovcem. Patří sem i skupina hlístic Secernentea, která využívá mezihostitele až do stádia L3, kdy už je infekční pro definitivního hostitele. K přenosu těchto hlístic dochází perorálně, požitím infikovaného mezihostitele nebo probíhá vývoj v členovcích sajících krev (např. filiárie), kteří slouží jako vektory a při sání krve dojde k průniku infekčních stádií do hostitele (Volf *et al.* 2007).

U některých hlístic čeledi Trichostrongylidae se vyskytuje fenomén hypobiózy. Dochází k ustrnutí vývoje larvy, to umožňuje přežít nevhodnou dobu pro vývoj. Nejvíce se hypobióza vyskytuje v regionech se zimou, trvající i několik měsíců (Meradi *et al.* 2016). Ve vývoji v dospělce u hostitele pak larvy pokračují na základě stimulů jako je porod. Tím se produkce infekčních stádií synchronizuje s obdobím rození neimunních mláďat hostitele (Volf *et al.* 2007). Hypobióza je primární forma přezimování u *Haemonchus contortus*, jejíž infekční forma je nejméně odolná vůči zimním podmínkám. Hypobiotické larvy u *H. contortus* se ale vyskytují i v extrémně suchých podmínkách (Gatongi *et al.* 1998).

Existují dva základní typy exkrečního systému hlístic: glandulární a tubulární. Tubulární typ, charakteristický pro Secernentea, se skládá ze dvou kanálů, příčně propojených spojovacím kanálem v hypodermis, dotvářejícího tvar písmene H. Do spojovacího kanálu mohou ústit žlázy s exkreční funkcí a tento kanál ústí středovým duktem skrze exkreční pór ven z těla. Lokace exkrečního póru je specifická a slouží jako

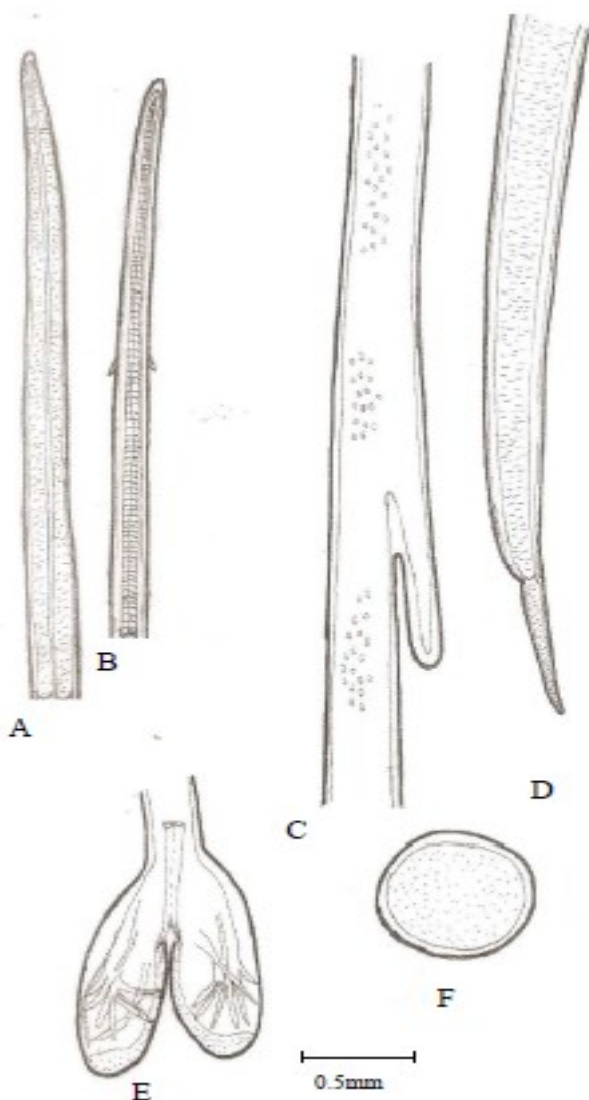
taxonomický znak (Basyoni a Rizk 2016). Glandulární typ, charakteristický pro volně žijící mořské a sladkovodní hlístice, je složen z jednobuněčné ventrální renety (žláznaté exkreční buňky) situované v tělní dutině nebo pseudocoelomu, připojené přímo na exkreční pór (Volf *et al.* 2007).

2.1.1 Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*)

Vlasovka slézová je střevní parazit třídy Secernentea, řádu Strongylida, čeledě Trichostrongylidae a rodu *Haemonchus* (Tak *et al.* 2014). Volně žijící *H. contortus* je nejvíce patogenní v subtropích a vlhkých tropech, kde nejvíce hrozí infekce vajíčky. Vlasovka se živí krví hostitele, a proto je nejvýraznějším znakem hemonchózy anémie (Waller a Chandrawathani 2005). Infikované ovce ukazují značné snížení koncentrace hemoglobinu zejména v létě, kdy je aktivita sajících vlasovek největší (Tak *et al.* 2014).

2.1.1.1 Morfologie

Tělo vlasovky slézové je pokryto kutikulou, tvořenou zejména z kolagenu, chránící hlístici v trávicím traktu hostitele. Dospělci mají tvar vlákna s tělem zbarveným do červena díky vysáté krvi z hostitele. U samic lze zpozorovat i bílé vaječníky, obtočené okolo střeva (Tak *et al.* 2014). Vulva je u samic kryta kutikulární řasou (Jíra 1998). Samci disponují na rozdíl od samic burzou s laterálními laloky a spikuly (Kuchai *et al.* 2012).



Obr. 1: *Haemonchus contortus* A – tělo samice; B - tělo samce; C – vulva samice; D – burza se spikuly; E – zakončení samice; F – vajíčko (Kuchai *et al.* 2012)

Dospělé vlasovky žijí ve slezu (abomasu), kde jsou přichyceny ke sliznici. Z vajíček se za příznivých podmínek vyvíjejí larvy až do stadia L3, které je infekční pro hostitele alimentární cestou. Zprávy o výskytu vlasovky u člověka jsou ojedinělé (Jíra 1998).

2.1.1.2 Rezistentní kmeny

Z hlediska citlivosti na anthelmintika lze rozlišit několik kmenů vlasovky slézové. Kmen IRE (Inbred Resistant Edinburgh) je vysoce rezistentní na IVM a částečně rezistentní na benzimidazoly. Kmen WR (White River) se vyznačuje mírnou rezistencí na levamisol z řad imidazothiazolů, vysokou rezistencí na benzimidazoly a IVM (Yilmaz *et al.* 2017), jedná se o multirezistentní izolát získaný z Jižní Afriky (Van Wyk *et al.*

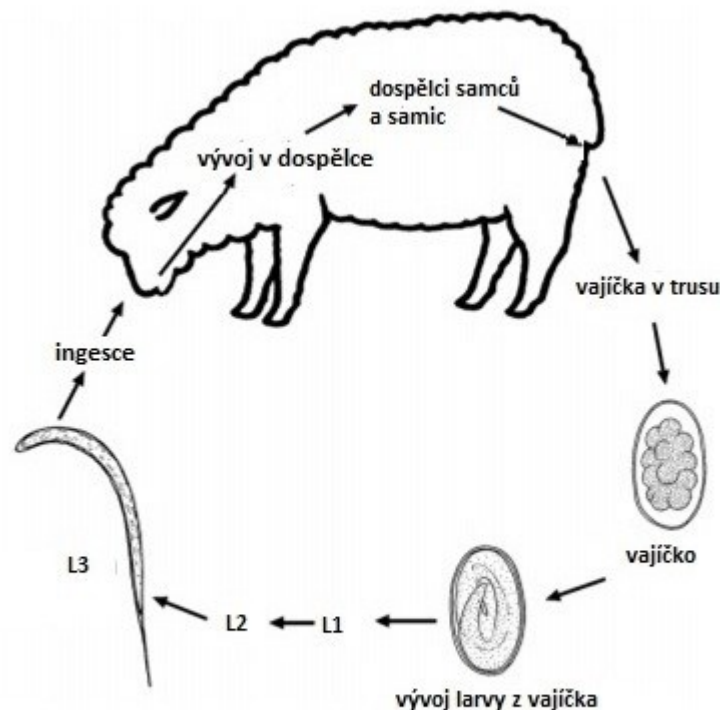
1980). Citlivý kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) je odvozený od citlivého izolátu SE (Susceptible Edinburgh) a byl izolován z terénu ještě před zavedením benzimidazolových léčiv (Roos *et al.* 2004). Rezistentní IRE kmen se vyvinul z ISE po kontaktu s anthelmintiky. Při *ex vivo* studii (Stuchlíková *et al.* 2018) se ukázalo, že 10-72 % podaných anthelmintik dospělcům *H. contortus* bylo metabolizováno během 24 hodin a větší metabolizace byla zaznamenána u dospělců z kmene IRE než ISE, což může znamenat, že zvýšený metabolismus by mohl přispívat k rozvoji rezistence. Porovnáním metabolických přeměn albendazolu, flubendazolu a rikobendazolu u ISE a IRE kmenů se zjistila větší schopnost rezistentních IRE deaktivovat anthelmintika. Příčinou může být větší exprese enzymů 1. a 2. fáze biotransformace. Bylo zjištěno, že do metabolismu benzimidazolů u vlasovek se zapojují enzymy obou fází (Stuchlíková *et al.* 2018).

Rezistence vlasovek na benzimidazoly byla již zaznamenána po celém světě. Výskyt velkého množství různých rezistentních kmenů ukazuje na genetickou heterogenitu a na schopnost vlasovek reagovat na selektivní tlak vytvářený chemoterapeutiky (Roos *et al.* 2004).

2.1.1.3 Vývojový cyklus

Dospělci žijí ve slezu hostitele, zatímco samičky produkují vajíčka, která odcházejí stolicí hostitele. Z vajíček se nejprve vyvine první larvální stádium L1. Postupným svlékáním a vývojem se přes stádium L2 dostává až do stádia L3. Toto stádium je infekční a může být spaseno spolu s trávou hostitelem. Po pozření L3 putuje do slezu hostitele a vyvíjí se do stádia L4 (Laing *et al.* 2013). Do 21 dní od samotného pozření larválního stádia se pak již hlístice může začít rozmnožovat (Gilleard 2013). S porovnáním ostatních hlístic z řádu Strongylida se *H. contortus* vyznačuje také extrémní plodností (Coyne a Smith 1992). Samička je schopna produkovat až 10 000 vajíček denně (Laing *et al.* 2013). Larvy L3 zůstávají životaschopné při teplotách 15-22°C i několik měsíců s minimálním úmrtím v populaci (Gilleard 2013). L4 stádium a dospělci u hostitele pak způsobují hemorhagické gastritidy, hypoproteinémie a anémie (Laing *et al.* 2013). Nejrychleji se larvální stádia vyvíjejí za vlhkých a teplých podmínek, larvy jsou navíc schopny zastavit vývoj při nevhodných podmínkách jako jsou dlouhé zimy (Waller *et al.* 2004). Schopnost zastavit vývoj a přežít nepříznivé podmínky významně pomohla k celosvětovému rozšíření tohoto parazita (Laing *et al.* 2013). Tento fenomén se nazývá hypobióza a je typický pro rody *Haemonchus* a *Teladorsagia*.

K rozvoji infekce dále přispívá kontaminace pastviny larvami L3 a výskyt jehňat na pastvě, jejichž imunitní systém není ještě plně vyvinutý (Roeber *et al.* 2013).



Obr. 2: Životní cyklus gastrointestinálních hlístic řádu Strongylida (Roeber *et al.* 2013, upraveno)

2.2 Hemonchózy

Intenzita a rozvoj infekce závisí na mnoha podmínkách: množství červů v trávicím traktu hostitele, zdraví a stav imunitního systému, podmínky v okolním prostředí (typ pastviny, klima), stresu a stravě. Nejvíce infikovaná jsou pak mladá zvířata s méně vyvinutým imunitním systémem a ty, která se pohybují v prostředí vysoce kontaminovaném L3 larvami. Nejvíce patogenní jsou larvy L4 způsobující anémii, která se projevuje obvykle do dvou týdnů. Dalšími akutními příznaky jsou edémy, černě zbarvená stolice, snížená produkce vlny a úbytek svalů. Mezi chronické příznaky patří úbytek hmotnosti a snížený příjem potravy (Roeber *et al.* 2013). Zaživačí potíže jsou důsledkem patogenního mechanismu *H. contortus*, který spočívá v přímém napadení a poškození žaludeční mukózy hostitele. Poškozením parietálních buněk žaludeční mukózy dochází ke snížení produkce HCl a zvýšení pH slezu. Zvýšené pH může být také

důsledkem sekrece amoniových iontů z parazita, aby nedošlo k poškození kutikuly působením trávicích enzymů hostitele (Angulo-Cubillán *et al.* 2007). V invazi do tkání pomáhají vlasovce cysteinové proteinasy, které jsou aktivní ve velkém rozsahu pH. Proteasy slouží k hydrolýze peptidických vazeb a k degradaci kolagenu i elastinu, tím pomáhají proniknout skrz mukózní vrstvu slezu (Dzik 2006). Anémie a s ní spojená ztráta hemoglobinu mohou být důsledkem odsávání krve, způsobující úbytek krve 0,05 ml na jednoho červa za den (Tak *et al.* 2014).

Na rozšíření infekcí způsobených hlísticemi mají největší vliv klimatické podmínky a léčba anthelmintiky v dané oblasti. Nakažené ovce se zejména vyskytují v oblastech se sezónními dešti (Roeber *et al.* 2013). Nejvíce jsou hemonchózou postiženy ovce v oblastech s průměrnou měsíční teplotou 18°C a 50 mm srážek (Waller a Chandrawathani 2005). Proto má *H. contortus* největší patogenitu ve vlhkých tropech a subtropích, ale je schopen se adaptovat i na horší podmínky, což jej spolu s jeho rezistencí na anthelmintika řadí mezi významné parazity (Waller *et al.* 2004).

2.3 Léčba hemonchóz

Paraziti hospodářských zvířat způsobují významné chovatelské a finanční ztráty v zemědělství (Roeber *et al.* 2013). Na léčbu helmintóz neexistuje efektivní vakcína, jejich léčba a profylaxe je vázaná na anthelmintika, která eliminují parazity z hostitele skrz různé mechanismy účinku (Taman a Azab 2014). Hemonchóza představuje 15 % ze všech gastrointestinálních infekcí malých hospodářských zvířat (Fawzi *et al.* 2015). V Brazílii patří rod *Haemonchus* mezi parazity nejvíce ovlivňující hospodářská zvířata (Jaeger a Carvalho-Costa 2017). Jako možná ochrana proti hemonchóze v podobě imunoprofylaxe se jevíly přírodní proteiny z *H. contortus* (Fawzi *et al.* 2015). Např. v Austrálii byla v menší míře využívána vakcinace přírodním antigenem *H. contortus* pod názvem Barbervax (González-Sánchez *et al.* 2018). Tyto proteiny redukovaly exkreci vajíček, ale pro jejich získání bylo bohužel nutné infikovat zvířata dospělými červy (Fawzi *et al.* 2015). Efektivní léčba hemonchóz proto potřebuje více kontrolních systémů jako je podávání anthelmintik či rotace pastvy (González-Sánchez *et al.* 2018). Rotace pastvy spočívá v setrvání na určité části pastvy 2-3 dny, následuje přesun na další část, přičemž návrat na startovní část pastvy bude po 30 dnech (Waller a Chandrawathani 2005). Dalším užitečným kontrolním systémem by mohla být právě vakcinace. Je známo, že v přírodních a experimentálních podmínkách dochází u ovcí

k rozvoji rezistence na parazita zejména po reinfekci. Vysokou míru rozvoje imunity v experimentálních podmínkách zaznamenala vakcinace s antigeny larev L3 a dospělci *H. contortus*. Použití těchto vakcín má ale stále značné nevýhody jako počet nutných dávek (5 - 6), omezená doba trvání ochrany a nutnost předchozí infekce zvířat pro získání nativního proteinu (González-Sánchez *et al.* 2018). Poslednímu problému je možno se vyhnout použitím podobného, ale rekombinantního proteinu z *H. contortus* (Fawzi *et al.* 2015). Vakcinace jak nativním tak rekombinantním proteinem prokázaly významnou redukci v exkreci vajíček a poškození slezu hostitele hlísticí *H. contortus*. Vakcinace by mohla jednou hrát důležitou roli v boji proti infekcím *H. contortus*, ale stále je ještě potřeba zlepšit časový harmonogram podávání či proces produkce pomocí rekombinace (González-Sánchez *et al.* 2018).

Hlavním přístupem v redukci hemochózy je proto použití anthelmintik (Fawzi *et al.* 2015). Anthelmintika jsou v některých případech velmi efektivní, ale také velmi drahá. (Roeber *et al.* 2013). Kvůli špatnému managementu chovu, masivnímu a nekontrolovatelnému podávání anthelmintik došlo k rozšíření rezistentních kmenů vlasovek (Kaplan a Vidyashankar 2012). Určitý stupeň rezistence u hlístic byl již zaznamenán u většiny anthelmintik a lze předpokládat, že díky masivní distribuci anthelmintik se bude vyvíjet selektivní tlak ve prospěch rezistentních alel (Geary 2012, González-Sánchez *et al.* 2018).

3. ANTHELMINTIKA

Mechanismus účinku anthelmintik je různý: inhibice transportu, modulace iontových kanálů, ovlivnění nervového systému a inhibice příjmu potravy (Köhler 2001). K léčbě nematodózy se používá celá řada preparátů, nicméně mezi dominantní skupinu chemoterapeutik patří benzimidazoly. Zasahují β -tubulin a mikrotubuly parazita (Volf *et al.* 2007). Mezi rutinně podávaná anthelmintika proti hlísticím, parazitujícím na hospodářských zvířatech, patří mimo benzimidazoly, makrocyclické laktony a imidazothiazoly, také novější monepantel (aminoacetonitrilový derivát) (Roeber *et al.* 2013).

3.1 Benzimidazoly

Primární mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik je založen na interakci s cytoskeletárním β -tubulinem, který je spolu s α -tubulinem hlavní součástí

mikrotubulů (Jaeger a Carvalho-Costa 2017). Interakce způsobuje inhibici polymerace tubulinu a ztrátu cytoplasmatických mikrotubulů, navíc u některých červů byla zaznamenána i porucha příjmu glukózy a deplece glykogenu (Taman a Azab 2014). Díky inhibici polymerace mikrotubulů, dojde k inhibici transportu sekrečních váčků a vylití jejich obsahu s trávicími enzymy. Tento děj byl pozorován u vlasovek při použití flubendazolu, kdy došlo k inhibici transportních váčků a vylití jejich obsahu v cytoplazmě (Köhler 2001). Benzimidazolová anthelmintika mají jen minimum vedlejších účinků u člověka, ale dlouhodobé užívání může poškodit játra a kostní dřeň. Navíc u albendazolu se předpokládá teratogenita a embryotoxicita (Taman a Azab 2014). Benzimidazolová anthelmintika jsou ale široce využívána zvláště ve veterinární medicíně. Jejich časté používání vede k vytváření selekčního tlaku a vzniku rezistence (Jaeger a Carvalho-Costa 2017). Rezistenci hlístic na benzimidazoly je možno určit pomocí PCR (Coles *et al.* 2006). Předpokládá se, že bodová mutace v genu pro β -tubulin, je spojena se vznikem rezistence (Roeber *et al.* 2013).

Albendazol je nejdůležitější anthelmintikum z benzimidazolů proti hlísticím u zvířat i lidí (Vokřál *et al.* 2013b). Jeho antiparazitická aktivita nezávisí pouze na afinitě k β -tubulinu, ale také na farmakokinetice a tkáňové distribuci v hostiteli (Alvarez *et al.* 2000). Farmakokinetiku ovlivňuje exprese a aktivita enzymů, metabolizujících xenobiotika. Tyto proteiny slouží jako efektivní ochrana před potenciální hrozbou v podobě léčiva nebo jiného xenobiotika. Enzymy metabolizující léčiva jsou také přímo spjaty s lékovou rezistencí v hlísticích (Matoušková *et al.* 2016). U savců podléhá albendazol enzymové přeměně, sulfoxidaci, za účasti CYP. Kromě CYP, hlístice *H. contortus* disponují i dalšími enzymy, chránící je před nežádoucím účinkem anthelmintik, např. katalasa má antioxidační aktivitu a chrání hlístici před oxidačním stresem. Albendazolu se *H. contortus* brání pomocí UDP-glukuronosyltransferasy, jejíž aktivita je větší u rezistentních kmenů než u ISE kmenů a může proto přispívat k rezistenci na anthelmintika (Vokřál *et al.* 2013b).

3.2 Makrocyclické laktony

Jsou to sloučeniny zahrnující skupinu avermektinů (např. IVM a doramektin) a novější milbemyciny (např. moxidectin). Jedná se o produkty mikroorganismů rodu *Streptomyces*. Při studiu metabolismu IVM u savců se jako hlavní metabolizující enzymy ukázaly cytochromy P450 (Vokřál *et al.* 2013a). Způsobují paralýzu somatických svalů

červa, inhibují funkci hltanu a nedochází proto k dalšímu příjmu potravy. Jejich působení je zprostředkováno vazbou na chloridové kanály ovlivňované glutamátem (GluCl), specifické pro bezobratlé. IVM funguje jako agonista a otevírá kanály, to vyústí v ireverzibilní tok chloridových iontů, hyperpolarizaci buněčné membrány a svalovou paralýzu (Köhler 2001, Wolstenholme *et al.* 2004). Za rezistenci na makrocyklické laktony u *H. contortus* jsou zodpovědné lékové přenašeče P-glykoproteiny (P-gp). Jedním z ligandů P-gp je i IVM, funkce P-gp je proto důležitá při odstranění makrocyklických laktónů z buněk parazita. Proto lze zvýšenou expresi genů kódujících P-gp považovat za marker rezistence na makrocyklické laktony (Prichard 2001).

3.3 Aminoacetonitrilové deriváty (AADs)

Aminoacetonitrilové deriváty jsou vysoce aktivní proti gastrointestinálním hlísticím, včetně rezistentních kmenů. Vyznačují se aminoacetonitrilovým jádrem s různými aryloxy skupinami. Jako nejvíce účinný z této skupiny se ukázal monepantel (AAD 1566) s nízkou toxicitou u savců a dobře tolerovaný u ovcí, kdy i při vyšší dávkách bylo pozorováno minimum vedlejších účinků (Kaminsky *et al.* 2008). Monepantel vykazoval dobrou účinnost proti širokému spektru gastrointestinálních hlístic ovcí, včetně kmenů rezistentních na benzimidazoly a makrocyklické laktony. Monepantel účinkuje jako modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů u mnoha druhů hlístic. U *H. contortus* působí jako modulátor těchto receptorů a způsobuje hyperkontrakci svalů, vedoucí k jejich paralýze (Abongwa *et al.* 2018). Monepantel je aktivní složkou anthelmintika pod obchodním názvem Zolvix®, byl poprvé distribuován v roce 2009. První rezistence byla ale zaznamenána již dva roky po uvedení na trh (Van den Brom *et al.* 2015).

3.4 Budoucnost léčby helmintóz

Vzhledem ke stálé absenci účinných vakcín je distribuce chemoterapeutik neustále na vzestupu a spolu s nimi stoupá i alarmující množství rezistentní parazitů. Strategie založená na anthelmintikách může být řešením pro infekci, ale na rozdíl od vakcín nezabrání reinfekci, která může nastat i do dvou týdnů po vyléčení. Naproti tomu vakcinace zabraňuje rozšíření infekce a snižuje možnost přenosu patogena (Geary 2012). Pochopení vzniku rezistence u parazitických hlístic je naprosto klíčové pro efektivní používání anthelmintik a objevení markerů, podle kterých by bylo možno

rezistence sledovat. Tyto znalosti lze také využít pro navrhování nových chemoterapeutik a pro jejich lepší zacílení (James *et al.* 2009). Pochopení neurobiologických pochodů díky motolici *Schistosoma mansoni* pomohlo určit cíl, dle kterého by se mohl vývoj nových léků zaměřit. Těmito cíli jsou neurotransmitery a receptory nervového systému parazitických hlístic. Neurotransmitery a receptory zodpovídají za kontrolu důležitých funkcí jako je reprodukce, pohyb nebo příjem potravy. Vyznačují se navíc rapidním terapeutickým efektem a odezvou ihned od podání (Taman a Azab 2014).

Pro úspěšný boj s parazity je klíčové znát také genom parazita, určený jeho sekvencí. Následným porovnáním sekvencí lze najít rozdíly v organismu, které mohou významně přispět k poznání mechanismů rezistence, metabolismu anthelmintik, objevení nových potenciálních cílů budoucí terapie a rozvoji vakcín (Matoušková *et al.* 2016).

4. REZISTENCE

Mechanismy rezistence a jejich vývoj jsou intenzivně zkoumány, protože výskyt rezistentních původců byl zjištěn prakticky u všech dříve účinných léčiv ze skupiny anthelmintik, antibiotik či antimykotik. Rezistentní populace vzniká, pokud se rozmnoží skupina jedinců, kteří jsou schopni přežít určitou koncentraci léčiva (Skálová *et al.* 2011). Definice rezistence je popisována na základě úspěšnosti a selhání léčby léčivem. Nastává v momentě, kdy se u vnímavé populace ukáže pokles účinnosti léku a organismus se stane tolerantní. Rezistence je kompletní, pokud přestane být účinná i maximální dávka léku, která by už neměla být organismem tolerována. Vyskytuje se v populaci, která je nositelem genu spojeného s rezistencí. Rozdílná manifestace často komplikuje její detekci u parazitů, kteří tvoří rozsáhlé populace a mají vysoký stupeň genetické variability. Studie provedené na rakovinných buňkách prokázaly, že rezistence může nastat dědičnými změnami – genetickými (mutace, delece) a epigenetickými (metylace genu v promotorové oblasti může vést ke snížení transkripce proapoptotických genů a k rezistenci nádorových buněk vůči signálům smrti) (James *et al.* 2009).

Genetické změny u červů jsou identifikovány zejména na základě SNPs (jednonukleotidových polymorfismů). SNP jsou základem genetické rozmanitosti populace. Vedou k substituci aminokyselin v cílovém proteinu pro léčivo a způsobí tak snížení jeho účinku. Populace *H. contortus* je důkazem rychlého nárůstu vyselektovaného rezistentního druhu. Většina experimentů prokázala vztah rezistentní populace a specifické mutace, nejvíce u benzimidazolů. Například rezistence na benzimidazoly je

spojena s mnoha SNPs v genu, který kóduje jejich cílový protein β -tubulin. SNP má ale jen menší roli v rezistenci, důležité jsou i mechanismy způsobené efluxními pumpami nebo cytochromy (James *et al.* 2009).

Rezistence v organismu je zapříčiněna změnou ve farmakokinetice nebo farmakodynamice léčiva. Farmakokinetické mechanismy zabraňují vstupu léčiva do buňky, zrychlují, zefektivňují jeho deaktivaci nebo usnadňují jeho eliminaci. Jsou zprostředkovány enzymy metabolizujícími léčiva (biotransformační enzymy a transportní proteiny). Mezi farmakodynamické mechanismy rezistence patří změna struktury receptorů, popř. zvýšení množství cílových molekul, na které léčivo účinkuje. Tyto mechanismy pomáhají některým jedincům v populaci tolerovat vysoké dávky, které by za normálních okolností nebyli schopni přežít (Jaeger a Carvalho-Costa 2017, Matoušková *et al.* 2016).

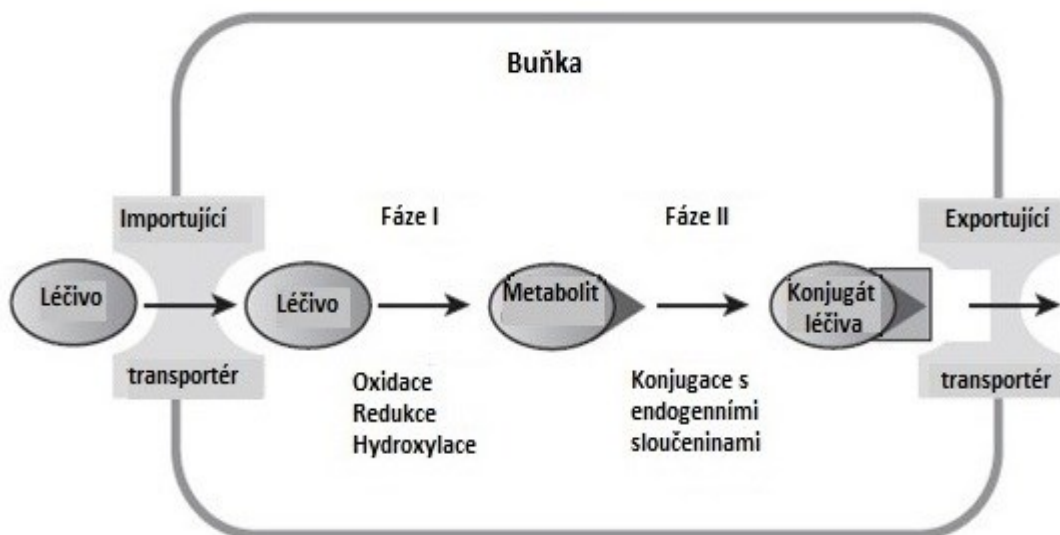
4.1 Enzymy metabolizující xenobiotika

Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik zajišťují enzymy metabolizující xenobiotika (XME), zahrnující biotransformační enzymy a transportéry. Xenobiotika jsou látky, které nemají fyziologickou funkci, neslouží jako zdroj energie, ani jako prekurzory endogenních látek. Jsou to cizorodé látky přírodního nebo syntetického původu jako aromatické látky, rostlinné metabolity, ale zejména léčiva (Cvilink *et al.* 2009). Biotransformace xenobiotik, sloužící k detoxikaci nebezpečných látek, má obvykle dvě fáze. První fáze zahrnuje procesy oxidace, redukce a hydrolýzy, kdy jsou v molekule odhaleny nebo do ní zabudovány hydrofilní skupiny. Druhá fáze je konjugace produktů první fáze s vhodnou endogenní sloučeninou (Matoušková *et al.* 2016). Ke konjugaci může sloužit glutathion, glukuronová kyselina, aminokyselina nebo sulfát. Jako třetí fáze metabolismu xenobiotik se označuje aktivní transport metabolitů a konjugátů přes membránu. Enzymy biotransformací přeměňují xenobiotika na hydrofilnější sloučeniny, které se snadněji vyloučí (Cvilink *et al.* 2009).

Do první fáze biotransformace patří CYP, flavinové monooxygenasy, peroxidasy, monoaminoxidasy a další enzymy oxidující xenobiotika, ale i reduktasy (dehydrogenasy) a hydrolasy. Konjugaci s glukuronovou kyselinou zajišťují UDP-glukuronosyltransferasy. Elektrofilní sloučeniny jsou konjugovány s glutathionem za účasti glutathion-S-transferas (GST). Aromatické aminy a hydroxylaminy mohou podléhat acetylaci N-acetyltransferasou (NAT). Sulfonaci katalyzují sulfottransferasy

(SULT). Pokud hydrofilní konjugát není schopen projít lipofilní membránou, je transportován např. pomocí ABC transportérů, mezi které patří i P-gp, důležitý pro eflux (Cvilink *et al.* 2009).

Proces metabolismu xenobiotika v organismu ilustruje následující schéma:



Obr. 3: Schéma metabolismu xenobiotik (Matoušková *et al.* 2016, upraveno)

Nejprve dojde ke vstupu xenobiotika do buňky, následuje první fáze biotransformace, poté může pokračovat druhá fáze tj. konjugace. Nakonec dojde k vyloučení xenobiotika (Matoušková *et al.* 2016).

4.2 Enzymy metabolizující xenobiotika u hlístic

Hlístice mají enzymy jak první tak i druhé fáze zejména ze třídy GST (Cvilink *et al.* 2009). U všech enzymů je ale velká mezidruhová variabilita, která znemožňuje zobecnění a extrapolaci dat získaných u jednoho druhu hlístic na ostatní druhy (Laing *et al.* 2013, Cvilink *et al.* 2009)

Expresí enzymů hlístic se liší u jednotlivých pohlaví, stejně jako je tomu u savců. Tento předpoklad byl potvrzen kvalitativním a semikvantitativním porovnáním metabolismu anthelmintik. Ukázaly se značné rozdíly v metabolismu u obou pohlaví *H. contortus*. U samic bylo zaznamenáno více metabolitů než u samců, převážně se jednalo o N-glykosidy (Stuchlíková *et al.* 2018).

V následujících kapitolách budou probrány enzymy, kterými jsem se zabýval ve své diplomové práci.

4.2.1 Cytochromy P450 (CYP)

CYP katalyzují oxidaci endogenních a exogenních sloučenin. Fungují jako terminální oxidasy přijímající elektrony z NADPH-CYP-reduktasy, cytochromu b5 a cytochromu b5-reduktasy. Monooxygenasová aktivita pak spočívá ve schopnosti vázat vzdušný kyslík, rozštěpit ho a jeden kyslíkový atom zabudovat do molekuly substrátu, druhý do molekuly vody (Kotze 1997, Skálová *et al.* 2011). Kromě zmiňované aktivity mohou mít také katalytickou funkci jako oxytransferasy nebo reduktasy. Oxytransferasová aktivita byla popsána u *H. contortus*, a spočívá v přenosu kyslíku z jednoho substrátu na jiný (Cvilink *et al.* 2009).

Dlouho dobu se předpokládalo, že hlístice CYP postrádají. Díky pokroku v genetické analýze se prokázala jejich existence u *Caenorhabditis elegans*, *H. contortus* a dalších červů (Cvilink *et al.* 2009). U hlístic mají CYP funkci oxygenas i reduktas. U *H. contortus* a *C. elegans* se oxiduje CYP albendazol na albendazolsulfoxid. Monepantel se u *H. contortus* metabolizuje na sulfonové metabolity (Matoušková *et al.* 2016). Vyšší exprese a monooxygenasová aktivita CYP byla zaznamenána u larválních stádií *H. contortus* L1 a L3 více než u dospělců (Kotze 1997). Předpokládá se, že větší exprese je důsledkem vystavení volně žijících larválních stádií množství environmentálních toxinů a k detoxikaci těchto exogenních sloučenin je tedy potřeba vyšší aktivity CYP. Může to být také zvýšenými nároky na metabolismus díky endogenním toxinům a sloučeninám důležitých pro vlastní rozvoj (Laing *et al.* 2015).

4.3 Transportéry xenobiotik

Transport je třetí fází metabolismu xenobiotik. Zprostředkovávají ho membránově vázané proteiny, které rozdělujeme na dva hlavní typy: transportéry importující (uptake) a exportující (efluxní) xenobiotika (Cvilink *et al.* 2009). Membránové efluxní transportéry chrání organismus před externími toxickými sloučeninami a lze je rozdělit celkem do pěti rodin, přičemž transportéry hrající důležitou roli v lékové rezistenci jsou hlavně ABC transportéry (P-gp) (Matoušková *et al.* 2016).

Transportéry lze také rozdělit na základě toho, v jaké formě přijímají energii nutnou k transmembránovému transportu substrátů na primární, sekundární a terciární. Podle tohoto kritéria jsou ABC transportéry považovány za primární, získávající energii nutnou k transportu hydrolýzou ATP. Ostatní transportéry získávají energii z kotransportu nebo antiportu iontů a jiných látek, které tvoří na membráně gradient. Gradient vzniká

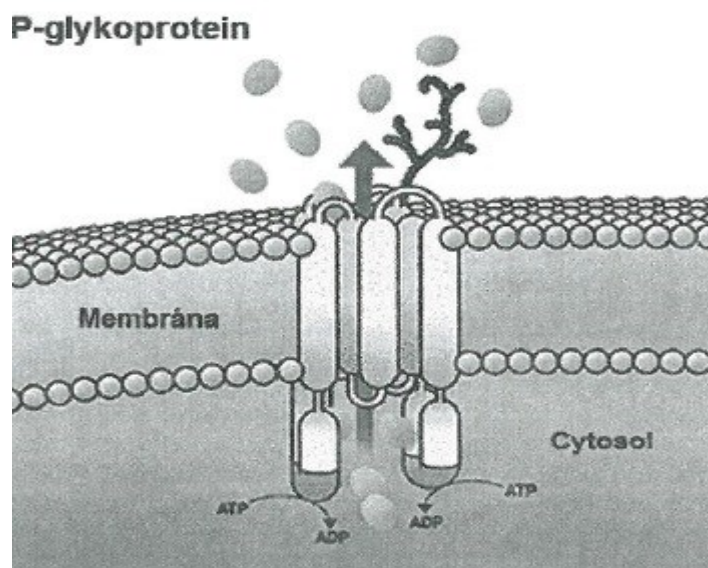
primárním transportérem, který k funkci potřebuje ATP. U sekundárních transportérů je potřeba jen jeden gradient, terciární transportéry potřebují dva gradienty (Skálová *et al.* 2011).

4.3.1 ABC transportéry

ABC transportéry jsou nejrozšířenější exportní proteiny. Poprvé byly popsány u bakterií, ale vyskytují se téměř ve všech buňkách. Typický ABC transportér je složen z transmembránových a nukleotid-vázajících domén (Leprohon *et al.* 2011). Jsou považovány za primární transportéry, získávající energii nutnou k transportu hydrolyzou ATP. Transportují substrát proti gradientu transportované látky. Některé ABC transportéry jsou lokalizovány apikálně (P-gp), jiné jsou na basolaterální membráně (např. u epiteliálních buněk enterocytů a hepatocytů) (Skálová *et al.* 2011). Jejich substrátem jsou jak lipofilní xenobiotika, procházející skrz membránu, tak i hydrofilní metabolity a konjugáty, tvořené biotransformačními enzymy (Cvilink *et al.* 2009). Nacházejí se u mnoha druhů helmintů jako *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Haemonchus contortus*, *Caenorhabditis elegans* a pravděpodobně přispívají k lékové rezistenci těchto organismů (Leprohon *et al.* 2011). Farmakokinetiku léčiv nejvíce ovlivňuje P-gp z rodiny ABC transportérů (Cvilink *et al.* 2009).

4.3.1.1 P-glykoprotein (P-gp)

Jedná se o efluxní pumpu integrovanou do membrány, zodpovědnou za transport lipofilních substancí včetně mnoha léků. Rezistence díky P-gp byla zaznamenána u helmintů, savců i protozoí. P-gp zprostředkovává aktivní jednosměrný transport léků z buňky, které do ní pronikly pasivní difuzí, a jeho exprese je indukována rovněž léky (Kerboeuf *et al.* 2003). Dle klinických studií mohou některé sloučeniny inhibovat P-gp nescificky, např. blokátor kalciových kanálů verapamil, který je substrátem P-gp (Wessler *et al.* 2013).



Obr. 4: Trojrozměrná simulace P-gp (Skálová *et al.* 2011)

Informace o struktuře a funkci ABC transportérů jsou u parazitických hlístic omezeny. Efluxní pumpy P-gp ale hrají důležitou roli v rezistenci na makrocyclické laktony. V těle parazitů jsou P-gp rozptýleny a jejich exprese se může lišit v různých stádiích vývoje. U *H. contortus* se P-gp 2 nachází v hltanu a hlavových neuronech, P-gp 9.1 v rozmnožovací soustavě samic (David *et al.* 2018). Navíc data získaná (Godoy *et al.* 2016) potvrdila expresi P-gp 9.1 v děloze rezistentního kmene *H. contortus*, kde by ji tento transportér mohl chránit před paralytickým účinkem avermektinů, které by znemožňovaly uvolnění vajíček z dospělých samic. Exprese P-gp byla dále zaznamenána i v exkreční soustavě (David *et al.* 2018). Přesná lokalizace všech P-gp transportérů u *H. contortus* ale zůstává zatím nejasná.

5. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda jsou nízké dávky anthelmintika IVM schopny ovlivnit expresi vybraných genů u samců a samic dospělců kmene ISE *H. contortus*.

Dílčí úkoly zahrnovaly:

1. Zjistit vliv nízkých koncentrací IVM na změnu exprese vybraných CYP
2. Zjistit vliv nízkých koncentrací IVM na změnu exprese vybraných P-gp
3. Ze zjištěných výsledků vytipovat CYP a P-gp, jejichž zvýšená exprese by mohla přispívat k lékové rezistenci *H. contortus*

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Biologický materiál, vybavení, chemikálie

6.1.1 Biologický materiál

Zdravá, parazity nezatížená jehňata byla orálně infikována L3 larvami *H. contortus*. Chov infikovaných jehňat probíhal za speciálních podmínek na farmě v Hoříněvsi, ve východních Čechách. Podmínky chovu byly v souladu s požadavky Ministerstva Zemědělství a všechny experimenty probíhaly v souladu etické komise Farmaceutické fakulty. K infekci byl použit citlivý kmen ISE. Po sedmi týdnech od infekce byla jehňata usmrcena jateční pistolí a vykrvěním. Poté z nich byl vyjmut slez, který byl následně transportován do laboratoře. Dospělé hlístice byly ze slezu separovány za použití agarové metody. Dospělci byli následně roztříděni v Petriho miskách na samce a samice podle výše uvedených morfologických znaků, odlišných pro obě pohlaví. Následovalo rozdělení po 10 jedincích od každého pohlaví do jednotlivých jamek na 24-jamkové destičce a jejich kultivace v médiu s léčivem rozpuštěným v DMSO nebo pouze s DMSO bez léčiva v případě kontrolních vzorků. Koncentrace DMSO v médiu byla 0,1 %. Po 4, 12 a 24 hodinové inkubaci s různými koncentracemi léčiv následovalo přenesení hlístic do mikrozkušavek s 0,5 ml TriReagentu a zamrazení na -80°C v hlubokomrazícím boxu.

6.1.2 Chemikálie

DNasa I, New England Biolabs

Diethylpyrokarbonát (DEPC), Sigma-Aldrich

Dithiotreitol (DTT), Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich

Ethanol 99 %, Sigma-Aldrich

Chloroform, Sigma-Aldrich

Isopropanol, Sigma-Aldrich

Ivermektin (IVM)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

Náhodné hexamery, Generi Biotech

Primery (GAPDH, NCBP, CYP, P-gp), Generi Biotech

qPCR Core Kit for SYBR Green I – xCEED Biotech

Reverzní transkriptasa: ProtoScript II – New England BioLabs

Redestilovaná voda

Směs dNTPs, Eurogentec

TRI Reagent, Molecular Research Center

6.1.3 Přístroje

Automatické pipety, Eppendorf

Blokový inkubátor – Thermomixer Comfort 5355, Eppendorf

Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus

Homogenizér kuličkový – FastPrep24, M. G. P.

Laminární box – UVC/T-AR, BioSan

PCR cyklér – MJ mini, Bio – Rad

Přístroj na Real-Time PCR – QuantStudio 6, Applied Biosystems

Spektrofotometr – NanoDrop 2000, Thermo Science

Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

6.2 Postup

6.2.1 Izolace RNA

Po rozmrazení vzorků s hlísticemi rozříděnými dle pohlaví a různé doby expozice anthelmintiku, následovalo jejich zcentrifugování a přenesení do laminárního boxu,

který je určen pouze pro izolaci RNA. Práce v laminárním boxu umožňuje eliminovat styk vzorku s všudypřítomnými RNAsami, který by vedl k jejich znehodnocení.

Do každé zkumavky byla dávkovačem přidána jedna odměrka skleněných kuliček a jedna kovová kulička. Před vlastní homogenizací se v hlubokomrazícím boxu vychladil držák homogenizátoru. Vzorky byly homogenizovány 3 min s třepáním 50 m/s. Homogenizace přispěla k rozrušení tkáně. Homogenát se nechal odstát při teplotě laboratoře 5 min a přidalo se 100 μ l chloroformu. Následným třepáním po dobu 15 s v ruce vzniklo ve zkumavce rozhraní dvou vrstev. Po dvou minutovém odstátí za laboratorní teploty byly vzorky 15 minut stáčeny ve vychlazené centrifuze na 4°C při 12 000 g. Centrifugací ve vzorku vznikly dvě fáze: horní vodní s RNA a spodní organická. Horní fáze byla přenesena pipetou do nové 1,5 ml mikrozkuavky. Při tomto procesu nesmělo dojít ke styku špičky pipety s mezifází, protože by hrozila kontaminace genomovou DNA. Následné přidání 250 μ l isopropanolu k vodní fázi a jemné promíchání vysráželo RNA a usnadnilo další izolaci. Po 10 min odstátí při laboratorní teplotě se vzorky stočily v centrifuze na 12 000 g, 10 min a teplotě 4°C.

Vzorky se do centrifugy umístily všechny otevíráním směrem do středu, aby bylo jasné, kde lze předpokládat výskyt pelety RNA, aby nedošlo k jejímu nechtěnému odsátí během následujícího kroku, pokud by byla neviditelná. Mezitím byl naředěn 75 % ethanol z absolutního, pomocí DEPC vody. Po následné centrifugaci se opatrným odlitím odstranil supernatant a výsledná peleta se omyla 0,5 ml naředěného ethanolu. Překlápěním v ruce se vzorky zamíchaly a opět stočily na 5 min v centrifuze nastavené na 7500 g při 4°C, umístěné opět otevíráním směrem do středu. Následovalo opatrné odlití supernatantu a odsátí zbytků pomocí skleněné pipety s úzkým koncem. Výsledná peleta se sušila na vzduchu v boxu 6-10 min, dokud nebylo zřetelné její gelovatění (zprůhledňování). Ušchlé pelety byly rozpuštěny v DEPC vodě, její množství se odvíjelo od pohlaví izolovaných hlístic. U samců se použilo 20 μ l DEPC vody a u samic 30 μ l DEPC vody. Následovalo zamíchání na vortexu, stočení a odstátí vzorků, po kterém se míchání a stočení zopakovalo. Vzorky byly uloženy do boxu s ledem a připravily se instrumenty pro měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem.

6.2.2 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem

Koncentrace získané RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop. Před vlastním měřením se změřil slepý vzorek v podobě 2 μ l redestilované vody.

Poté se změřila koncentrace ve 2 μl každého vzorku. Z přístroje lze také zjistit kontaminaci proteiny podle poměru absorbancí při 260 nm, odpovídající absorbanci DNA a 280 nm, která odpovídá absorbanci proteinů. Hodnota poměru by měla v ideálním případě být větší než 1,8. Rovněž lze zjistit z poměru absorbancí při 260 nm a 230 nm kontaminaci fenolem. Hodnota by se měla v ideálním případě blížit 2.

6.2.3 Úprava DNAsou

DNasa I je enzym, selektivně štěpící pouze DNA, čímž dojde k odstranění případné kontaminace vzorků genomovou DNA. Izolované vzorky obsahují různá množství RNA, proto bylo nutné, před použitím DNasy, standardizovat vzorky na jednotnou koncentraci RNA. Koncentrace RNA z Nanodropu je v $\text{ng}/\mu\text{l}$. Dále bylo potřeba vypočítat, jaké množství izolovaného vzorku bude obsahovat 4 μg RNA a kolik vody je potřeba doplnit do celkového objemu 26 μl .

Tab. 1: Výpočet množství RNA vzorků a vody

	[ng/ μl]	4 μg RNA v [μl]	H ₂ O do 26 μl	Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
ISE KF1	753,3	5,3	20,7	0,1
ISE KF2	1106,2	3,6	22,4	0,1
ISE KF3	1008,6	4,0	22,0	0,1
ISE IVM F1	1328,8	3,0	23,0	0,1
ISE IVM F2	1209,5	3,3	22,7	0,1
ISE IVM F3	1194,8	3,3	22,7	0,1
ISE KM1	712,0	5,6	20,4	0,1
ISE KM2	360,0	11,1	14,9	0,1
ISE KM3	385,0	10,4	15,6	0,1
ISE IVM M1	1000,0	4,0	22,0	0,1
ISE IVM M2	726,0	5,5	20,5	0,1
ISE IVM M3	460,0	8,7	17,3	0,1

Do označených 0,5 ml zkumavek byla nejdříve pipetována DEPC voda a poté množství izolovaného materiálu, odpovídající 4 μg RNA. Takovýto vzorek byl připravený pro použití DNasy.

Následovalo připravení mastermixu, kdy na každý vzorek bylo potřeba 4 μl . Mastermix se připravoval z 1 μl DNasy a 3 μl pufru. Ke vzorkům se vždy připočítal jeden vzorek navíc jako rezerva, pro případ nechtěných ztrát v důsledku ulpívání kapaliny na stěně zkumavky. Směs se poté smíchala na vortexu a byla rozdělena do každé

zkumavky s RNA. Následovala inkubace vzorků ve stolním inkubátoru vyhřátém na 37°C po dobu 25 minut s třepáním 500 rpm. Po mírném stočení vzorků se ke každému z nich přidalo 1,5 µl 0,1M EDTA a nechaly se inkubovat 10 minut při 75°C, aby došlo k inaktivaci DNasy. K jednotlivým vzorkům bylo poté přidáno 8,5 µl DEPC vody, byly promíchány na vortexu a stočeny. Výsledná koncentrace takto ošetřené RNA odpovídala 0,1 µg/µl a objem každého výsledného vzorku odpovídal 40 µl. Po úpravě DNasou následovala reverzní transkripce. Pokud reverzní transkripce nenásledovala ihned, nechaly se vzorky zamrazit na -80°C v mrazícím boxu.

6.2.4 Reverzní transkripce

Klíčem procesu reverzní transkripce je enzym reverzní transkriptasa, který přepisuje primární sekvenci nukleotidů RNA do struktury DNA. Získané molekuly cDNA jsou bez rizika rychlé degradace. Nezbytnou podmínkou pro funkci enzymu je vždy přítomnost primeru, který je komplementární k templátové RNA a od kterého startuje samotný proces reverzní transkripce, přidáváním deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTPs) do nově vznikající cDNA (Beránek 2016).

Proces reverzní transkripce se provedl se vzorky RNA o koncentraci 0,1 µg/µl, získaných z výše uvedených postupů. Nejprve se připravila směs RNA a primerů. Do 0,2 ml eppendorf zkumavek bylo napipetováno vždy 5 µl RNA ředěné na 0,1 µg/µl z každého vzorku a do jednotlivých zkumavek bylo přidáno 1 µl náhodných hexamerů jako primerů. Směsi se připravily ve dvou sadách – jedna na reverzní transkripci a jedna na noRT kontrolu, takzvaně bez přidání reverzní transkriptasi do vzorků v další fázi postupu. Vzory bez reverzní transkriptasi sloužily jako kontrola, jestli nebyla izolovaná RNA kontaminována genomovou DNA. Po zamíchání na vortexu byly směsi RNA a primerů vloženy do PCR cykléru. Zahříváním došlo k denuraci RNA a tím se umožnilo nasednutí primerů. Následně byly vzorky mírně stočeny a vloženy do boxu s ledem.

Během zahřívání se připravily dvě sady mastermixů – pro reverzní transkripci, označované jako RT a pro kontrolu, označované jako noRT, ve kterých byla reverzní transkriptasa nahrazena vodou. Pro každý vzorek se vždy připravil mastermix z obou sad. Reagencie pro každou sadu mastermixů se připravovaly s připočtením jednoho vzorku navíc – z důvodu možných ztrát při pipetování.

Připravené mastermixy se po promíchání na vortexu a stočení, rozpipetovaly po 14 μl z jedné i druhé sady mastermixů k jednotlivým vzorkům. K jednomu vzorku se tedy pipetovalo 14 μl RT mastermixu a k totožnému vzorku v druhé eppendorf zkumavce se přidalo 14 μl noRT mastermixu. Konečný objem jednoho vzorku byl po přidání mastermixu 20 μl .

Tab. 2: Složky pro reverzní transkripci

Reagencie mastermixu pro:	1 vzorek RT [μl]	1 vzorek noRT [μl]
Pufr	4	4
DTT	2	2
dNTPs	2	2
RT	0,5	-
H ₂ O	5,5	6

Následovalo promíchání 20 μl vzniklé směsi mastermixu se vzorkem na vortexu, stočení a opětovné vložení zpět do cykléru. Na cykléru byly nastaveny teplotní změny v daných intervalech.

Po vyjmutí z cykléru se do každé směsi vzorku přidalo 80 μl redestilované vody, čímž se připravená cDNA zředila pětkrát a snížila se tím možná chyba z pipetování většího množství templátu při následné PCR reakci.

Takto připravená cDNA může být uchovávána při -20°C .

6.2.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerasová řetězová reakce je amplifikační metoda. Na základě znalosti sekvence DNA, která má být amplifikována se syntetizují dva oligonukleotidy, každý z nich je komplementární k sekvenci jednoho řetězce dvoušroubovice na opačných koncích amplifikovaného úseku. Oligonukleotidy plní funkci primerů a ohraničují amplifikovaný segment. DNA polymerasa syntetizuje v přítomnosti dNTPs z obou primerů nové řetězce. Samotná technika je založena na použití speciální DNA polymerasy z termofilní bakterie (např. Taq DNA polymerasy z bakterie *Thermus aquaticus*). Tato polymerasa je schopna snést i vysoké teploty, nenedaturovat na rozdíl od samotné molekuly DNA a lze ji opakovaně použít i při několika cyklech následujících za sebou (Alberts *et al.* 2005).

PCR reakce probíhají v termocykléru dle tříteplotního profilu. Nejprve dojde k zahřátí na teplotu denaturace DNA a k jejímu následnému rozvolnění na jednořetězce. Následuje hybridizace primerů s DNA (tzv. *annealing*) za snížené teploty. Opětovné zvýšení teploty v posledním kroku umožní polymerase, díky přítomnosti dNTPs, zdvojit počet přítomných řetězců (tzv. *elongace*). Opakováním denaturace, *annealingu* a *elongace* vznikají nové templáty pro další reakce a v podmínkách *in vitro* tak získává PCR svůj cyklický charakter. Nové řetězce se při PCR amplifikují geometrickou řadou. Efektivitu polymerace ovlivňuje struktura templátové DNA, složení reakční směsi, teplotní profil PCR a tvorba nespecifických produktů (Beránek 2016).

6.2.6 Real-time PCR

Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) vychází z klasické PCR. Reakční směs je obohacena buď o fluoreskující interkalační látky nebo o fluorescenční sondy, které při PCR hybridizují ke vznikajícím amplikonům. K emisi fluorescence dochází pouze pokud je v reakční zkumavce amplifikován templát DNA. Světelné kvantum zachycené na detektoru by mělo být přímo úměrné množství fluorescenčního substrátu, navázaného na DNA v průběhu tvorby amplikonu. Tvorbu produktů lze na rozdíl od klasické PCR sledovat v průběhu procesu „v reálném čase“ a elektroforetická detekce produktů se neprovádí.

Amplifikační reakce probíhá v termocykléru vybaveném zdrojem záření (laser) a detektorem (fotonásobič), který po filtraci optického paprsku zaznamená fluorescenci jako počet dopadajících fotonů. Reakční směs se pipetuje do mikrotitračních destiček a počet paralelně vyšetřovaných vzorků bývá od 24 do několika tisíců (Beránek 2016).

6.2.6.1 Kvantifikace pomocí PCR v reálném čase

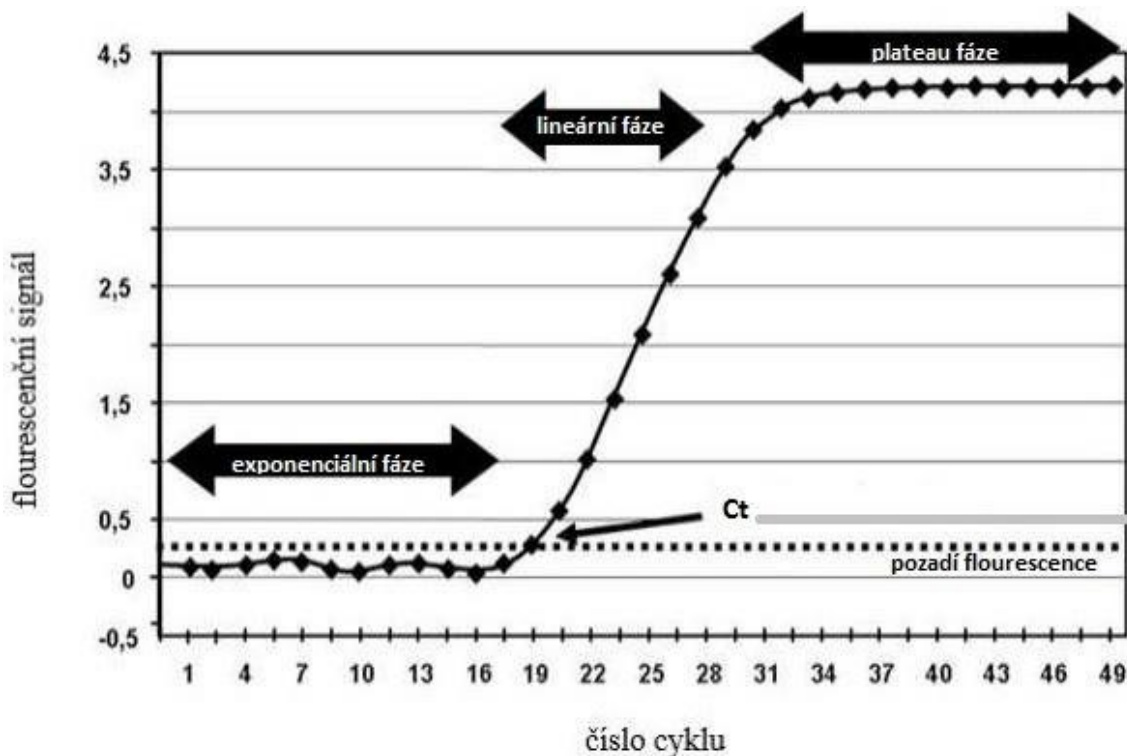
Metodou real-time PCR lze poměrně přesně kvantifikovat vstupní množství vyšetřovaného templátu. Kvantifikace může být absolutní nebo relativní. K absolutní kvantifikaci slouží kalibrační vzorky o známé koncentraci DNA, z nich se získá nelineární kalibrační závislost. Absolutní kvantifikace nezohledňuje ztráty extrakcí nukleových kyselin, pipetováním nebo reverzní transkripcí. U relativní kvantifikace se výsledek vztahuje na referenční gen, který se amplifikuje spolu s vyšetřovaným genem. Referenční neboli housekeeping gen musí mít ve sledovaném typu buněk konstantní expresi, neovlivněnou experimentálními ani environmentálními podmínkami daného systému. Slouží k minimalizaci kvantifikačních chyb způsobených rozdílným

počátečním množstvím vzorků, kvalitou nukleových kyselin nebo jinou účinností syntézy cDNA (Prada-Arismendy a Castellanos 2011, Beránek 2016).

6.2.6.2 Průběh qPCR

Křivka získaná při real-time PCR zahrnuje několik fází. Počáteční tzv. background fázi, kdy dochází k postupnému růstu DNA, ale množství DNA je zatím malé, proto vznikající specifická fluorescence nepřesahuje nespecifickou fluorescenci pozadí. Následuje fáze exponenciálního růstu, kdy množství amplifikované DNA narůstá a intenzita fluorescence přesáhne úroveň pozadí. V této fázi se provádí kvantifikace templátové DNA (Prada-Arismendy a Castellanos 2011). Cyklus kdy amplifikační křivka poprvé překoná výšku specifické fluorescence úroveň meze detekce (threshold – mez detekce) se nazývá cyklus prahu (Ct - cycle of threshold). Čím více templátové DNA je v reakční směsi, tím rychleji se překoná mez detekce a dosáhne se exponenciální fáze reakce. Tedy čím více bude templátové DNA, tím menší bude hodnota Ct (Beránek 2016). Během lineární fáze dochází ke zpomalení reakce a nárůst produktu je lineární. Poslední fází je plateau fáze, kdy dochází k vyčerpání reagensů, amplifikace zde již probíhá velmi málo a míra fluorescence neodpovídá množství DNA (Prada-Arismendy a Castellanos 2011).

Amplifikační křivky mají na ose x vyznačený počet reakčních cyklů a na ose y je fluorescenční signál po korekci pozadí, zachycený na detektoru (R_n). Pokud bylo při real-time PCR použito přidané pasivní referenční barvivo, na jehož vlnovou délku lze normalizovat signál z detektoru a odstranit tak optické rozdíly mezi jamkami, vliv pipetovacích chyb a omezit kolísání intenzity světelného toku během amplifikace, vyznačuje se na ose y ΔR_n (Beránek 2016).



Obr. 5: Fáze real-time PCR (Prada-Arismendy a Castellanos 2011, upraveno)

6.2.6.3 Použití qPCR

V předkládané diplomové práci se použila metoda qPCR pro zjištění změn v genové expresi samčích i samičích enzymů *H. contortus* CYP 1, CYP 3, CYP 7 a transportérů P-gp 1, P-gp 9.1, P-gp 11 a P-gp 16. Jako referenční housekeeping geny se použily geny pro GAPDH a NCBP (jaderný čepičku vázající protein), které umožnily relativní kvantifikaci. Housekeeping geny zajistí, že odchylka v množství DNA po amplifikaci nebude způsobena rozdílným množstvím DNA, které vstoupilo do reakce. Všechny vzorky, po různých dobách inkubace, by měly obsahovat stále stejné množství referenčních genů, bez změn v jejich expresi.

Pro správný průběh PCR jsou důležité primery, které po nasednutí na DNA ve fázi annealingu, ohraničí amplifikovaný úsek a umožní práci DNA polymerasy. V této práci se primery reverse a forward, naředily každý na koncentraci 5 μM a smíchaly. Primery se dále smíchaly s qPCR kitem, což je směs fluorescenčního substrátu SYBR green I, dNTPs, pufru a DNA polymerasy.

SYBR Green I patří mezi interkalační látky, vázající se na dvouvláknovou DNA. Fluorescence po navázání roste. Denurací se látka z vlákna uvolňuje. Mezi nevýhody

interkalačních barviv patří nespecifičnost, fluorescence zvyšují jakékoli nespecifické produkty (Beránek 2016).

DNA polymerasa při své činnosti spotřebovává dNTPs a syntetizuje z nich nová vlákna. Pro funkci polymerasy je nutný reakční pufr, který vytváří vhodné pH, optimální množství $MgCl_2$ iontů a redestilovaná voda, bez DNAs i RNAs. Směs primerů spolu s redestilovanou vodou a qPCR kitem představuje mastermix.

Mastermix byl připraven podle Tab. 3 pro každý cílový a referenční gen. Vzorky genů byly stanovovány v duplikátech. K celkovému množství mastermixu se připočítaly vždy 3 vzorky navíc, přičemž jeden z nich sloužil jako negativní kontrola a dva byly připočteny navíc kvůli možné chybě v pipetování. Na jeden vzorek připadalo 15 μ l mastermixu. Pro přípravu 12 vzorků bylo potřeba množství mastermixu vynásobit 27.

Tab. 3: Obsah mastermixu

Počet reagensií pro jeden vzorek [μ l]	
Redestilovaná voda	4,20
qPCR kit	10,00
Forward primer (5 μ M) + Reverse primer (5 μ M)	0,8

Následně se hotová směs mastermixu rozmíchala na vortexu a stočila, aby se předešlo nechtěným ztrátám, způsobených ulpíváním vzorku na stěně zkumavky. Mastermix se rozpipetoval do PCR stripů. PCR stripy byly předem pečlivě rozvrženy, aby vzorky v duplikátu byly pod sebou a poslední jamku obsadila negativní kontrola. Pro každý vzorek včetně negativní kontroly se do jamky stripu pipetovalo 15 μ l mastermixu. Poté se přidalo 5 μ l ředěné cDNA k již napipetovanému mastermixu v jamce. Za účelem předejít případné kontaminaci byly mastermix a ředěná cDNA pipetovány každý na opačný konec jamky ve stripu. Do poslední jamky stripu, kde byla negativní kontrola, se pipetovala redestilovaná voda místo vzorku.

Stripy byly zavíčkované fólií a stočeny na centrifuze, aby došlo k dokonalému promísení mastermixu a cDNA nebo vody (v případě negativní kontroly).

Tab. 4: Znázornění rozmístění vzorků na PCR destičce pro jednu testovanou koncentraci IVM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	FK1	FK2	FK3	FI1	FI2	FI3						
b	FK1	FK2	FK3	FI1	FI2	FI3						
c	MI1	MI2	MI3	MK1	MK2	MK3						
d	MI1	MI2	MI3	MK1	MK2	MK3	NK					

FK – kontrolní vzorky samic, FI – samice ovlivněné IVM, MK – kontrolní vzorky samců, MI – samci ovlivnění IVM, NK – negativní kontrola

Vzorky samců i samic se testovaly vždy v duplikátech. V poslední jamce se testovala i negativní kontrola, která eliminuje falešnou pozitivitu výsledku, způsobenou dimery primerů nebo kontaminací. Testovaly se vzorky kmene ISE po inkubaci s IVM po 4, 12 a 24 hod.

Dle schématu v Tab. 4 byly v duplikátu testovány geny pro CYP 1, CYP 3, CYP 7, P-gp 1, P-gp 9.1, P-gp 11, P-gp 16 i referenční geny pro GAPDH a NCBP. Kontroly noRT, pro vyloučení případné kontaminace DNA při izolaci se testovaly stejným způsobem.

Po vložení stripu do PCR cykléru a spuštění příslušného programu, začne vlastní PCR reakce. Reakce probíhá v několika fázích, které se opakují po dobu 40 cyklů.

Na konci amplifikačního procesu se provedla analýza křivky tání (melting curve analysis). Teplota tání je teplota, při které existuje nukleová kyselina ve formě jedno- i dvouřetězce ve vzájemném poměru 1:1 (Beránek 2016). Detekce flourescenčního signálu je monitorována při postupném zvyšování teploty. Nejprve dojde k ochlazení vzorku na 60°C po dobu 1 min. Následuje postupné zvyšování teploty o 0,5°C za 5 s až do 95°C. Zvyšováním teploty dochází k postupnému rozvolnění dvouvláknové DNA, interkalační látka se uvolňuje a flourescenční signál postupně klesá. V ideálním případě je největší pokles flourescence zaznamenán jen v úzkém teplotním rozmezí.

Výše uvedeným postupem byly nejprve otestovány referenční geny kódující GAPDH a NCBP. Tyto geny byly vybrány na základě studie (Lecová *et al.* 2015), kde se ukázaly jako vhodní kandidáti pro studium genové exprese dospělců *H. contortus*. Poté následovalo otestování vlastních genů. Po jednotlivých genech se vždy provedla analýza křivky tání, čímž se zkontrolovalo, že nevznikají nechtěné produkty. Přítomnost takového produktu by se projevila dalším píkem na křivce. U negativní kontroly se zkoumala pravidelnost linie, tedy že u ní nedošlo k žádné amplifikaci, která by značila

možnou přítomnost kontaminanty. Pozornost se věnovala hlavně rozdílu vzdáleností jednotlivých Ct mezi duplikáty. Ct pro jednotlivé geny v duplikátu se nesmí lišit více než o 0,5. V opačném případě se jedná o chybu v pipetování nebo o špatné naředění primeru.

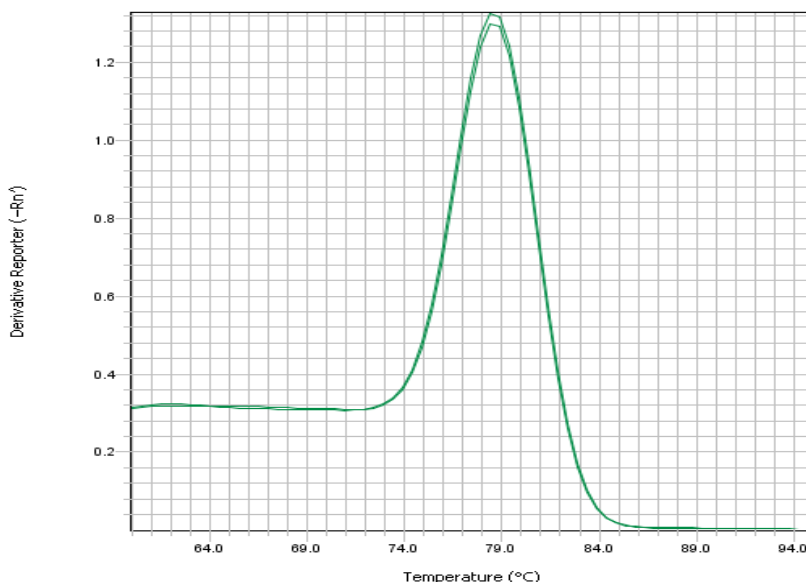
Pokud nedošlo k žádné komplikaci, přistoupilo se k vlastní analýze genů pro CYP a P-gp. Testované vzorky ovlivněné IVM byly vždy rozděleny dle pohlaví na samičí a samčí. Každý vzorek byl testován v duplikátu a ve třech kopiích. U všech vzorků po qPCR se zkontrolovala Ct hodnota, negativní kontrola a provedla se analýza křivky tání.

Získaná data byla statisticky vyhodnocena Ing. Petrou Matouškovou Ph.D. pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (two way anova) a graficky zpracována spolu s Mgr. Pavlínou Kellerovou v programu GraphPad Prism 6.0.

7. VÝSLEDKY

7.1 Zhodnocení dat naměřených pomocí qPCR

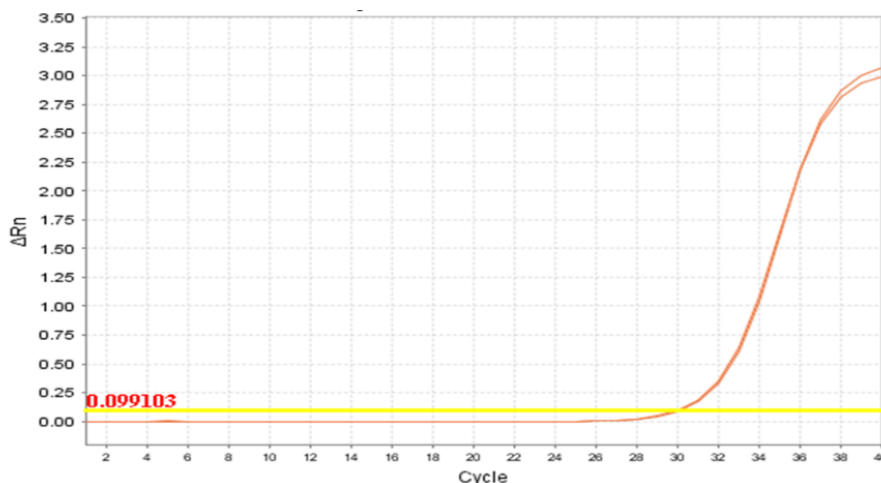
U použité interkalační látky SYBR Green I existuje riziko jejího navázání na dimery primerů, čímž může dojít k falešnému zvýšení množství DNA templátu. Po dokončení qPCR reakce se proto kontrolovala křivka tání, na které lze dle jejího průběhu zjistit tvorbu specifických a nespecifických produktů. Derivací křivky tání se rovnou odečetl vzniklý vrchol píku, představující teplotu tání. Křivka s jedním vrcholem znamená tvorbu jen specifického produktu, více vrcholů pak značí o přítomnosti nespecifických produktů.



Obr. 6: Správný průběh křivky tání duplikátu

Pro dosažení větší přesnosti kvantifikace byly vzorky stanovovány v duplikátech. Rozptyl jednotlivých Ct hodnot vzorků v rámci jednoho duplikátu, který nepřesahoval 0,5, byl považován za přijatelný. Pokud byl rozptyl větší (způsobený nepřesným pipetováním, špatným promícháním nebo nízkou kvalitou vzorku) bylo nutné měření provést znovu.

Pozornost se věnovala také negativní kontrole, u které nedošlo k žádné amplifikaci. To znamenalo absenci případné kontaminanty a data se mohla dále zpracovávat.



Obr. 7: Esovitá amplifikační křivka se správnými Ct hodnotami duplikátu (Ct hodnoty se nachází v průsečíku křivky s threshold linií)

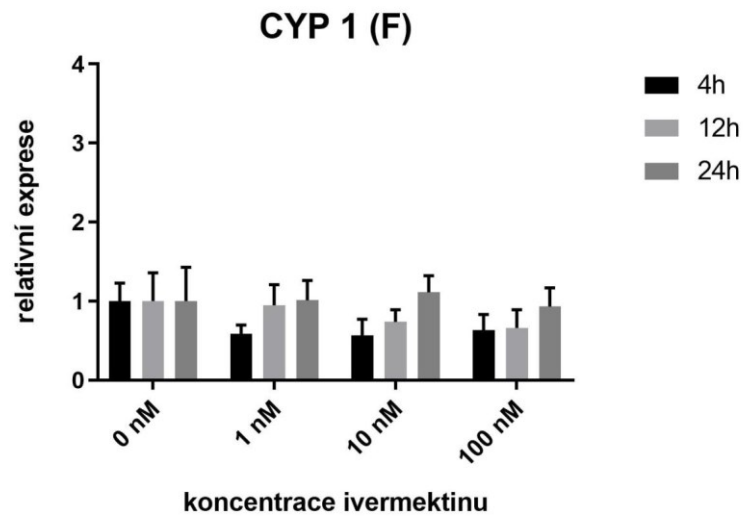
Spolu s cílovými geny, se testovala exprese i dvou genů referenčních, které umožnily relativní kvantifikaci DNA. Data byla odečtena z programu QuantStudio 6 Flex Software a zhodnocena v programu Microsoft Excel. Provedl se výpočet dle rovnice $2^{-\Delta Ct}$. Přičemž ΔCt je rozdíl průměrných Ct hodnot z duplikátu a referenčních genů.

Expresie vybraných genů byla stanovována u vlasovek kmene ISE, které byly exponovány nízkým koncentracím IVM – 1, 10 a 100 nM. Samci a samice byli inkubováni zvlášť. Každá sada vzorků pro jedno pohlaví zahrnovala všechny tři testované koncentrace a kontrolu, neovlivněnou žádným anthelmintikem. Každá koncentrace, včetně kontroly, se stanovovala v triplikátech. Doba inkubace vlasovek s IVM byla 4, 12 a 24 hodin pro obě pohlaví a všechny sledované koncentrace.

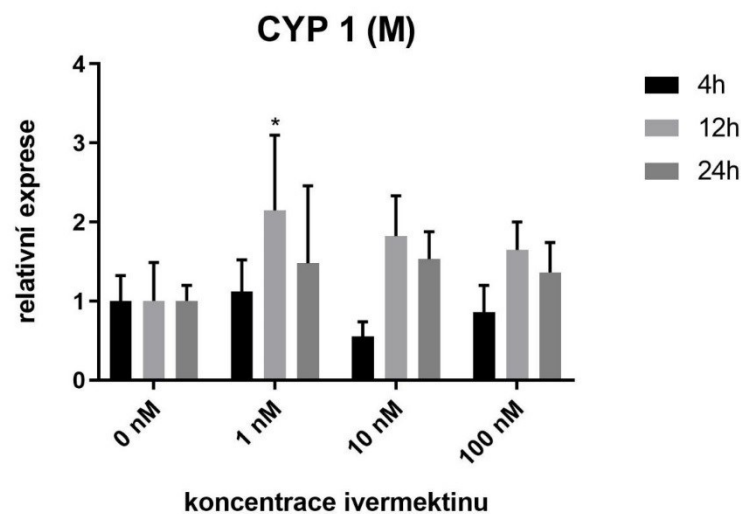
Vlasovky neovlivněné IVM (kontrolní vzorky) byly inkubovány za stejných podmínek v médiu, které obsahovalo pouze rozpouštědlo IVM (DMSO). Expresie testovaných genů ve vlasovkách exponovaných IVM byla vztažena k expresi naměřené v kontrolních vzorcích, u nichž byla nastavena na hodnotu 1. Tím se umožnilo grafické znázornění rozdílů v expresi vyvolanými kontaktem vlasovek s IVM.

Statisticky signifikantní změna v expresi je v grafu označena hvězdičkou. Rozptyl v měření v rámci každého triplikátu pro danou koncentraci, včetně kontroly, je v grafu vyznačen jako směrodatná odchylka.

7.2 Vliv ivermektinu na expresi vybraných genů pro CYP

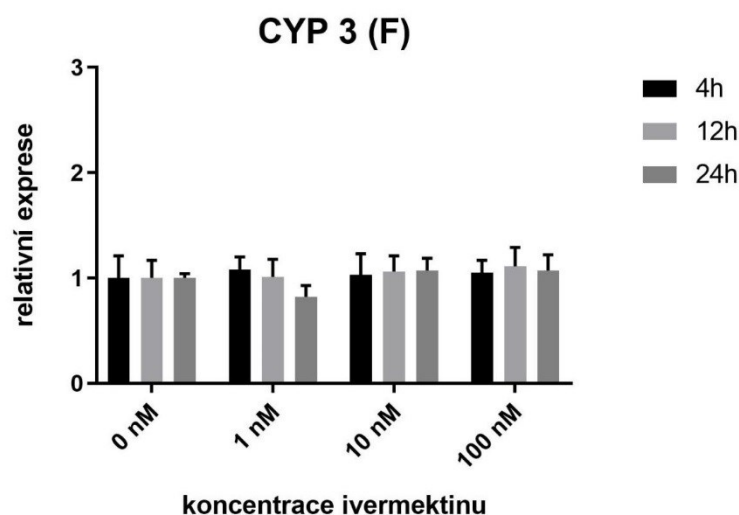


Obr. 8: Expres CYP 1 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin.

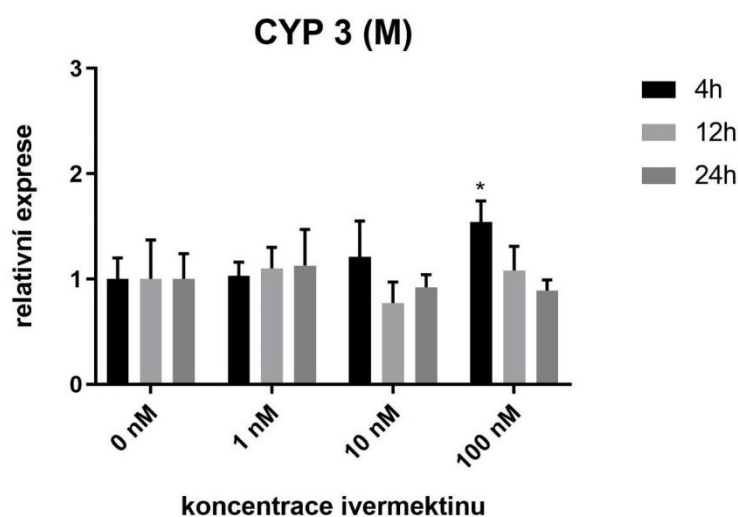


Obr. 9: Expres CYP 1 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin.

V grafu na Obr. 8 a Obr. 9 je znázorněna samčí a samičí expres CYP 1 u vlasovek, ovlivňovaných nízkými dávkami IVM. Z uvedeného grafu je zřejmá indukce u samců po 12 hodinách ovlivňování 1 nM IVM. Naopak expres samičích genů zůstává bez změny.

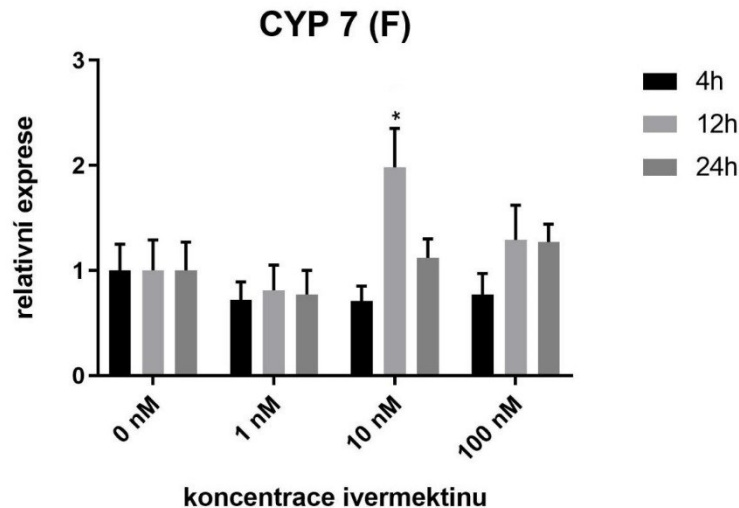


Obr. 10: Expresa CYP 3 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

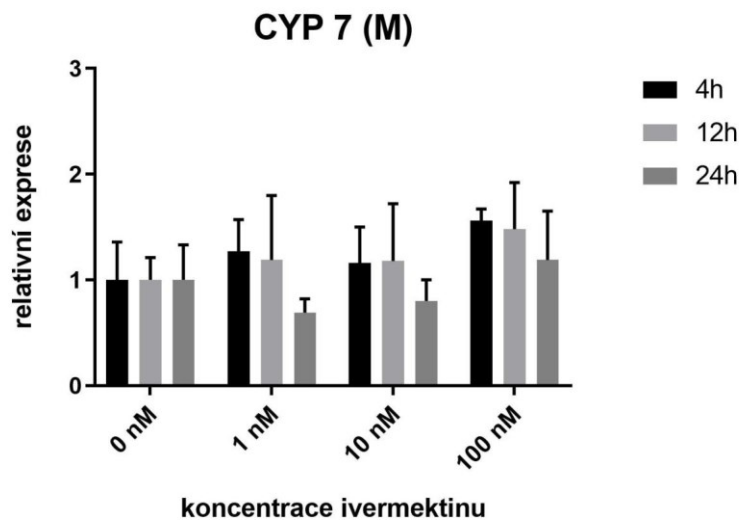


Obr. 11: Expresa CYP 3 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Porovnání exprese CYP 3 u samců a samic vlasovek exponovaných IVM je prezentováno na Obr. 10 a Obr. 11. Jak je patrné, IVM v nízkých dávkách neovlivňoval expresi CYP 3 u samic. Indukce CYP 3 u samců nastala po 4 hodinách inkubace se 100 nM IVM.



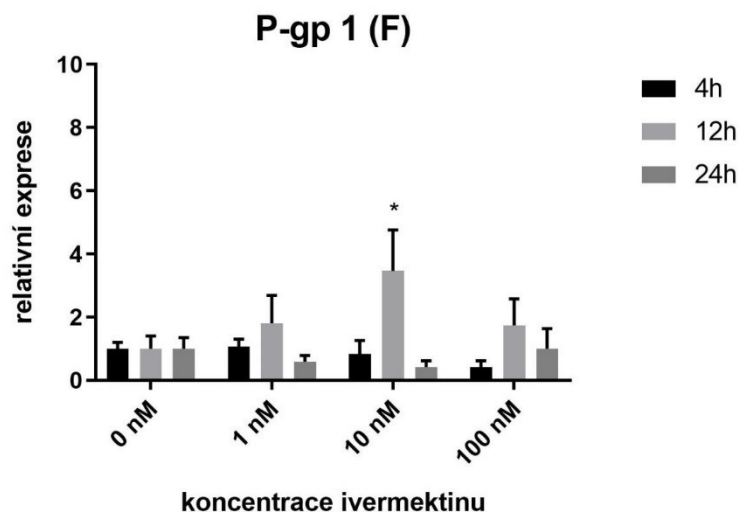
Obr. 12: Expresa CYP 7 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin



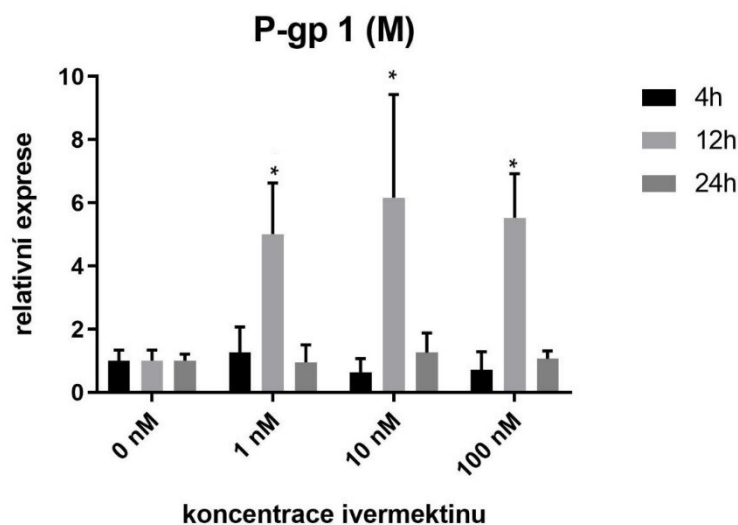
Obr. 13: Expresa CYP 7 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Rozdíl v expresi CYP 7 u samců a samic vlasovek, vystavených nízkým koncentracím IVM, je znázorněn na Obr. 12 a Obr. 13. Nízké dávky IVM nemají vliv na expresi CYP 7 u samců. Naopak u samic se po 12 hodinách inkubace s 10 nM IVM projevuje indukce.

7.3 Vliv ivermektinu na expresi vybraných genů pro P-gp

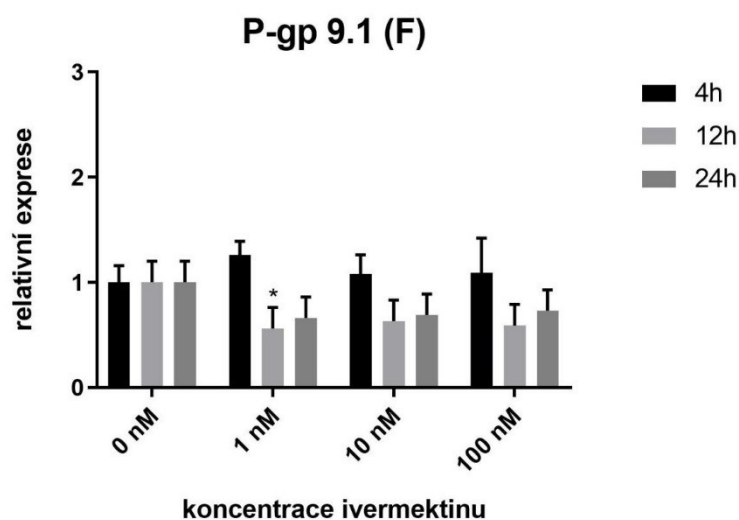


Obr. 14: Expres P-gp 1 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

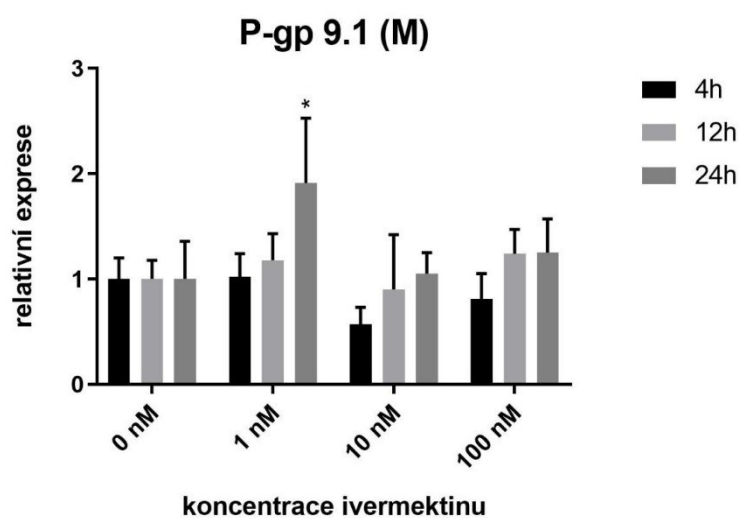


Obr. 15: Expres P-gp 1 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Obr. 14 a Obr. 15 ukazují změnu exprese P-gp 1 samců a samic vlasovek, vystavených IVM. Samice zvýšily svoji expresi po 12 hodinách inkubace s 10 nM IVM. Významná indukce nastává i u samců ovlivňovaných 1, 10 a 100 nM IVM po dobu 12 hodin.

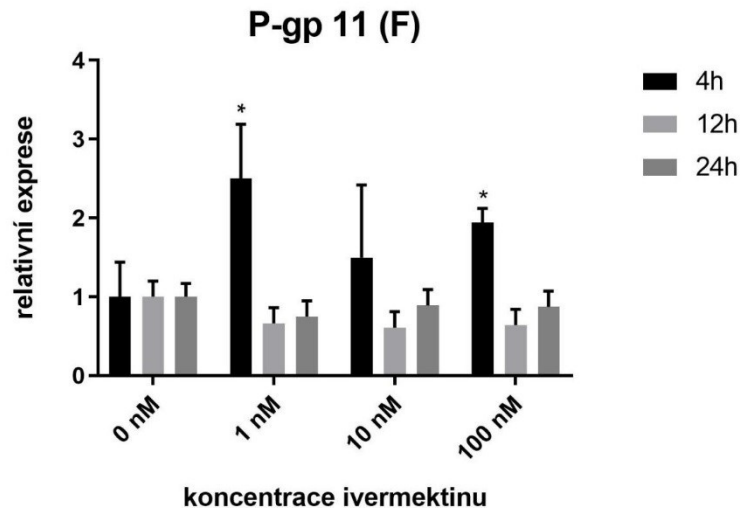


Obr. 16: Expresa P-gp 9.1 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

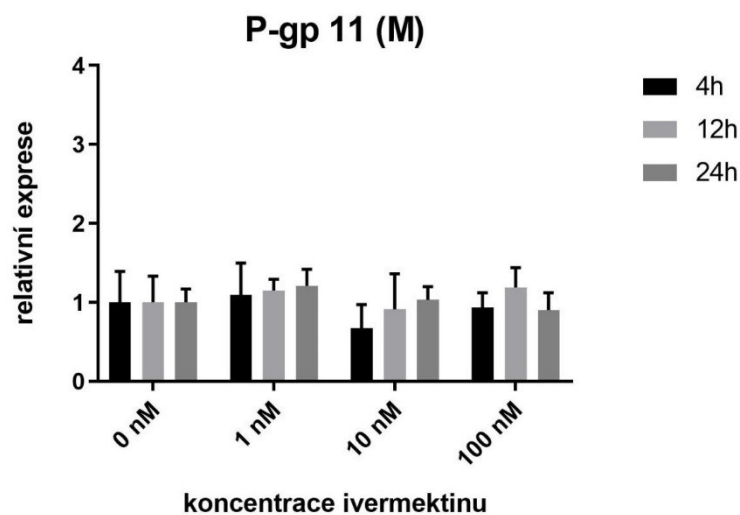


Obr. 17: Expresa P-gp 9.1 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Změny v expresi samčích a samičích transportérů P-gp 9.1 vlasovky, po inkubaci s IVM, jsou představovány na Obr. 16 a Obr. 17. Je zde evidentní inhibice u samic, ovlivňovaných 12 hodin 1 nM IVM. K indukci P-gp 9.1 dochází u samců po jejich ovlivňování 1 nM IVM po dobu 24 hodin.

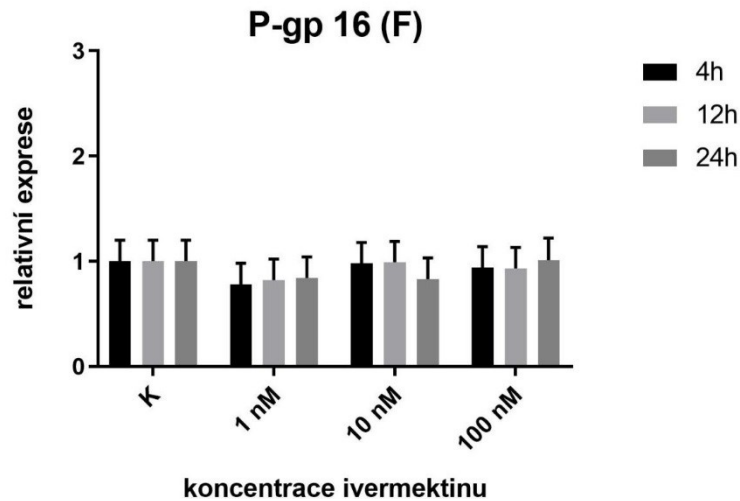


Obr. 18: Expresa P-gp 11 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

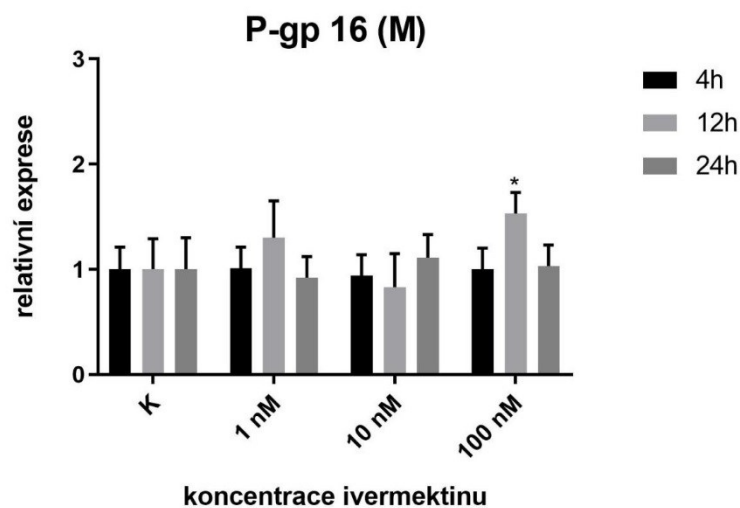


Obr. 19: Expresa P-gp 11 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Na Obr. 18 a Obr. 19 je uvedena změna v expresi samčích a samičích enzymů P-gp 11 u vlasovek, po jejich ovlivnění IVM. Indukce samičích P-gp 11 nastává po 4 hodinové inkubaci s 1 nM a 100 nM IVM. U samců nedošlo ke změně exprese P-gp 11 vlivem nízkých dávek IVM.



Obr. 20: Expresa P-gp 16 u samic (F) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin



Obr. 21: Expresa P-gp 16 u samců (M) vlasovek kmene ISE inkubovaných s IVM (0, 1, 10, 100 nM) po dobu 4, 12 a 24 hodin

Obr. 20 a Obr. 21 znázorňují změnu exprese enzymu P-gp 16 u samic a samců, vystavených IVM. Indukce P-gp 16 nastala u samců po 12 hodinovém ovlivňování 100 nM IVM. U samic se exprese enzymu nezměnila.

8. DISKUZE

Snaha o vývoj lepších vakcín je stále brzděna komplikacemi, které představuje hlavně jejich efektivní produkce. Proto veterinární medicína bojuje s hlísticemi po celém světě zejména prostřednictvím anthelmintik (González-Sánchez *et al.* 2018). Mezi běžně a často používaná antiectoparazitika pro léčbu helmintóz a profylaxi ovcí patří IVM. Jako zástupce skupiny makrocyclických laktonů s biosyntetickým původem působí proti vývojovému i dospělým stádiím hlístic, které mohou způsobit nemalé ztráty v chovech hospodářských zvířat.

Pravděpodobně právě díky masivní distribuci anthelmintik došlo k nárůstu rezistence. Neustálý nárůst rezistence na avermektiny je celosvětový problém. V Evropě je v porovnání s ostatními kontinenty nárůst rezistence pomalejší a hrozí zde zejména import rezistentních kmenů spolu s živými zvířaty (Kaplan a Vidyashankar 2012). Podle genetických studií je rezistence na IVM u *H. contortus* dominantní, patrně díky velké genetické rozmanitosti a výskytu polymorfismů (Wolstenholme *et al.* 2004, Prichard 2001).

Jedním z možných mechanismů, které přispívají k rozvoji lékové rezistence, jsou systémy enzymů a transportérů, které chrání organismus před negativním vlivem xenobiotik. Enzymy tato xenobiotika přeměňují na polárnější metabolity, které se lépe vylučují. Z enzymů první fáze biotransformace jsou nejvýznamnější CYP. Zatímco u savců jsou tyto enzymy dobře zmapovány, u ostatních organismů jsou informace o CYP pouze částečné (Cvilink *et al.* 2009, Skálová *et al.* 2011). CYP u dospělců kmene ISE *H. contortus* studovali (Laing *et al.* 2015) a prokázali v genomu této hlístice množství genů pro CYP. Rovněž byly u *H. contortus* nalezeny geny pro enzymy druhé fáze biotransformace (např. UDP-glukuronosyltransferasy) a lékové transportéry (např. P-gp) (Matoušková *et al.* 2018).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda u vlasovky slézové po kontaktu s nízkými dávkami anthelmintik dochází ke změně exprese vybraných CYP a P-gp. Jako anthelmintikum byl zvolen IVM ve velmi nízkých, netoxických dávkách, které mají simulovat množství reziduálního léčiva z exkrementů léčených ovcí, vyskytujícího se v přirozeném prostředí jejich pastvy. Předpokládá se, že část léčiva podaná infikovaným ovcím se skrze jejich exkrementy dostává do půdy, pak do rostlin a jejich následnou konzumací infikovanými ovcemi se parazité dostávají do kontaktu s velmi nízkými koncentracemi anthelmintik.

Ke studiu exprese enzymů byla využita metoda qPCR, pomocí které se sledovala exprese vybraných genů pro CYP a P-gp. Pracovalo se s dospělými červy citlivého kmene ISE. V práci (Stuchlíková *et al.* 2018) se prokázalo se, že exprese enzymů u vlasovky je rozdílná u samic a samců. Proto v našich experimentech byly vlasovky před samotným ovlivněním rovněž nejprve roztříděny dle pohlaví. K ovlivnění dospělců vlasovek byly použity koncentrace IVM 1, 10 a 100 nM a inkubace trvala po dobu 4, 12 a 24 hodin. Po inkubaci byly vlasovky zamrazeny v roztoku TriReagent a následně z nich byla vyizolována RNA.

V první části naší práce jsem se zaměřili na CYP. Z genů pro CYP byla sledována exprese genů označených jako CYP 1, CYP 3, CYP 7.

Vlivem nízkých dávek IVM došlo ke zvýšení exprese CYP 3 u samců po 4 hodinové inkubaci, CYP 1 samců a CYP 7 samic po 12 hodinových inkubacích. Jelikož po 24 hodinovém ovlivňování k žádným signifikantním změnám v expresích nedošlo a exprese ostatních genů CYP samic a samců byla totožná s kontrolami, mohlo by se ve všech třech případech jednat o reakci na stres, která se v našem případě projevila do 12 hodin. Zajímavé je zjištění, že indukční účinek IVM je zcela jiný u samců a samic, což je pravděpodobně dáno i velmi odlišnou konstitutivní expresí jednotlivých CYP u obou pohlaví. Nicméně zvýšení exprese CYP vlivem IVM je velmi malé a pravděpodobně toxikologicky nevýznamné. Navíc studie (Vokřál *et al.* 2013a) ukázala, že *H. contortus* není schopný biotransformovat IVM. Ze všech těchto zjištění je pravděpodobné, že zvýšená exprese CYP nepřispívá k rezistenci vlasovek na toto léčivo.

Stejným způsobem jsme v druhé části práce sledovali změny v expresi genů pro P-gp. ABC transportéry jsou totiž zahrnuty v transportu strukturálně odlišných xenobiotik a hrají důležitou roli v rezistenci u savců, bakterií i parazitů. U savců je P-gp zodpovědný za odstraňování IVM z buněk. Předpokládá se, že v rezistenci helmintů na IVM hrají P-gp významnou roli (David *et al.* 2018, Wolstenholme *et al.* 2004, Prichard 2001). Již dříve (Xu *et al.* 1998) ukázal, že zvýšená exprese P-gp může vést k rezistenci na IVM, jelikož je jeho substrátem. U dospělců vlasovky slézové byla dále pozorována exprese P-gp 16 a podle (Godoy *et al.* 2015) je možný aktivní transport avermektinů pomocí této pumpy.

V naší studii jsme sledovali expresi genů pro P-gp 1, P-gp 9.1, P-gp 11, P-gp 16. V případě genu pro P-gp 1 došlo po ovlivňování IVM u obou pohlaví k signifikantní indukci po 12 hodinách inkubace. U P-gp 11 se signifikantní indukce projevila jen u samic a to po 4 hodinách inkubace, s následným poklesem na původní hladinu. U samců

v případě genu P-gp 11 nedošlo ke změně v žádném čase inkubace. Je tedy evidentní, že IVM zvyšuje expresi P-gp 1 a P-gp 11 u samic. IVM indukuje P-gp 1 i u samců, naopak na samčí P-gp 11 nemá vliv. U samic po 12 hodinách ovlivňování 1 nM IVM došlo k snížení exprese P-gp 9.1, ale u samců po 24 hodinách inkubace s 1 nM IVM se exprese P-gp 9.1 zvýšila. To naznačuje možný protichůdný vliv IVM na obě pohlaví.

Na samičí transportér P-gp 16 neměl IVM vliv. Projevila se ale indukce u samců po 12 hodinovém ovlivňování 100 nM IVM. To by mohlo přispět k tvrzení (Godoy *et al.* 2015) a aktivní transport avermektinů by mohl být uskutečnitelný pomocí tohoto přenašeče. Ovšem k lepšímu potvrzení by bylo vhodné měření zopakovat.

Z uvedených výsledků vyplývá indukční účinek IVM na expresi genů kódujících P-gp u kmene ISE *H. contortus*. Ukázala se také rozdílná exprese studovaných enzymů v závislosti na pohlaví. IVM i ve velmi nízkých koncentracích indukoval hned několik isoform P-gp. Vzhledem k tomu, že zvýšená aktivita P-gp přispívá k účinnějšímu efluxu IVM z těla vlasovek, mohl by tedy kontakt *H. contortus* s nízkými dávkami léčiva přispívat ke snížení citlivosti vlasovek vůči IVM.

Měření byla provedena pouze jednou, zejména u některých přenašečů je vidět rostoucí tendenci exprese, proto by bylo vhodné provést měření opakovaně, čímž by se dosáhlo lepší průkaznosti a případného potvrzení naměřených dat. Nejvíce změn v expresi také nastává mezi 4 a 12 hodinovými inkubacemi, proto by bylo účelné se v dalších studiích věnovat právě této inkubační době.

Výsledky předkládané diplomové práce mohou být použity jako odrazový můstek v dalším studiu rozvoje rezistence u vlasovky slézové. Například by bylo přínosné otestovat změny v expresi genů pro námi studované P-gp přenašeče s nízkými koncentracemi i jiných anthelmintik, které jsou také substráty P-gp. Rovněž by bylo zajímavé, přímo krmit ovce (infikované *H. contortus*) rostlinami, které by obsahovaly nízkou koncentraci konkrétního anthelmintika.

9. ZÁVĚR

1. Z testovaných isoformů CYP byla významná změna relativní exprese po kontaktu dospělců *H. contortus* s nízkými dávkami IVM zjištěna u CYP 3, CYP 1 samců a CYP 7 samic. Exprese ostatních CYP zůstala v porovnání s kontrolami beze změny.
2. Indukční efekt nízkých dávek IVM se ukázal u genů pro P-gp 1, P-gp 9.1, P-gp 16 samců a P-gp 11, P-gp 1 samic. IVM nevyvolal změny exprese genů pro samčí P-gp 11 a samičí P-gp 16.
3. K nejvíce signifikantním změnám v relativní expresi došlo u P-gp 1, kde největší změna v expresi vyvolaná IVM dosahovala u samců 5-ti a u samic 2,5 násobku exprese kontrolního vzorku. Lze usuzovat, že zvýšená exprese efluxního transportéru P-gp 1 by mohla přispívat k navození lékové rezistence u *H. contortus*.

10. SEZNAM ZKRATEK

ABC transportéry	ATP binding cassette transportéry
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementární vlákno DNA
C _t	cyklus prahu
CYP	cytochromy P450
DEPC	diethylpyrokarbonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
GAPDH	glyceraldehyd-3-fostát dehydrogenasa
ISE	Inbred Susceptible Edinburgh, citlivý kmen <i>Haemonchus contortus</i>
IVM	ivermektin
noRT	kontrolní mastermix bez reverzní transkriptasi
NCBP	nuclear cap - binding protein
PCR	polymerase chain reaction
P-gp	P-glykoprotein
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RT	mastermix s reverzní transkriptasou
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
UDP	uridin difosfát
XME	enzym metabolizující xenobiotika

11. POUŽITÉ ZDROJE

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005) *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Espero Publishing, Ústí nad Labem, ISBN 80-902-9062-0.
- Abongwa M., Marjanovic D. S., Tipton J. G., Zheng F., Richard J. M., Trailovic S. M., Robertson A. P. (2018) Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *International Journal for Parasitology*, vol. 8, 36 - 42
- Alvarez L. I., Imperiale F. A., Sánchez S. F., Murno G. A., Lanusse C. E. (2000) Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, vol. 94, 75 - 89
- Angulo-Cubillán, Francisco J., Leticia G.-C., Cuquerella M., Alunda J. M. (2007) *Haemonchus contortus*-sheep relationship. Review. *Revista Científica*, vol. 17, 577 - 587
- Basyoni M. A., Rizk M. A. (2016) Nematodes ultrastructure: complex systems and processes. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, vol. 40, 1130 - 1140
- Beránek M. (2016) *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. 1. vyd. Karolinum, Praha, ISBN 978-80-246-3224-7
- Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., Von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M. A., Vercruysse J. (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, vol. 136, 167 - 185
- Coyne M. J., Smith G. (1992) The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naive and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *International Journal for Parasitology*, vol. 22, 315 - 325
- Cvilink V., Lamka J., Skálová L. (2009) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*, vol. 41, 8 - 26
- David M., Lebrun Ch., Duguet T., Talmon F., Beech R., Orłowski S., André F., Prichard R. K., Lespine A. (2018) Structural model, functional modulation by ivermectin and

tissue localization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-13. *International Journal for Parasitology*, vol. 8, 145 - 157

Dzik J. M. (2006) Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*, vol. 53, 33 - 64

Fawzi E. M., González-Sánchez M. E., Corral M. J., Alunda J.M., Cuquerella M. (2015) Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Veterinary Parasitology*, vol. 211, 54 - 59

Gatongi P. M., Prichard R. K., Ranjan S., Gathuma J. M., Munyua W. K., Cheruiyot H., M. E. Scott. (1998) Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Veterinary Parasitology*, vol. 77, 49 - 61

Geary T. G. (2012) Are new anthelmintics needed to eliminate human helminthiases? *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 25, 709 - 717

Gilleard J. S. (2013) *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*, vol. 140, 1506 - 1522

Godoy P., Che H., Beech R. N., Prichard R. K. (2015) Characterization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 204, 11 - 15

González-Sánchez M. E., Cuquerella M., Alunda J. M. (2018) Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLoS One*, vol. 13, 1 - 12

Jaeger L. H., Carvalho-Costa F. A. (2017) Status of benzimidazole resistance in intestinal nematode populations of livestock in Brazil: A systematic review. *BMC Veterinary Research*, vol. 13, 358

James C. E., Hudson A. L., Davey M.W. (2009) Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*, vol. 25, 328 - 335

Jíra J. (1998) *Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci*. 1. vyd. Galén, Praha, ISBN 80-85824-82-5.

Kaminsky R., Gauvry N., Weber S. S., Skripsky T., Bouvier J., Wenger A., Schroeder F.,

- Desaules Y., Hotz R., Goebel T., Hosking B. C., Pautrat F., Wieland-Berghausen S., Ducray P. (2008) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, vol. 103, 931 - 939
- Freeman A. S., Nghiem C., Li J., Ashton F. T., Guerrero J., Shoop W. L., Schad G. (2003) Amphidial structure of ivermectin-resistant and susceptible laboratory and field strains of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, vol. 110, 217 - 226
- Kaplan R. M., Vidyashankar N. A. (2012) An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, vol. 186, 70 - 78
- Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminsky R., Von Samson-Himmelstjerna G. (2003) P - glycoprotein in helminths: Function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 22, 332 - 346
- Kiontke K., Fitch H. A. (2013) Nematodes. *Current Biology*, vol. 23, 862 - 864
- Köhler P. (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, vol. 31, 336 - 345
- Kotze, A. C. (1997) Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *International Journal for Parasitology*, vol. 27, 33 - 40
- Kuchai J. A., Ahmad F., Chishti M. Z., Tak H., Ahmad J., Ahmad S. a Rasool M. (2012) A Study on Morphology and Morphometry of *Haemonchus Contortus*. *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 44, 1737 - 1741
- Laing R., Bartley D. J., Morrison A. A., Rezansoff A., Martinelli A., Laing S. T., Gilleard S. J. (2015) The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, vol. 45, 243 - 251
- Laing R., Taisei K., Martinelli A., Isheng J. T., Beech R. N., Redman E., Holroyd N., Bartley D. J., Beasley H., Britton C., Curran D., Devaney E., Aude G., Hunt M., Jackson F., Johnston S. L., Kryukov I., Keyu II, Morrison A. A., Reid A. J., Sargison N., Saunders G. I., Wasmuth J. D., Wolstenholme A., Berriman M., Gilleard J. S., Cotton A. J. (2013) The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*, vol. 14, 1 - 16

- Lecová L., Růžičková M., Laing R., Vogel H., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Vokřál I., Skálová L., Matoušková P. (2015) Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 201, 123 - 127
- Leprohon P., Légaré D., Ouellette M. (2011) ABC transporters involved in drug resistance in human parasites. *Essays In Biochemistry*, vol. 50, 121 - 144
- Matoušková P., Lecová L., Laing R., Dimunová D., Vogel H., Raisová Stuchlíková L., Nguyen L. T., Kellerová P., Vokřál I., Jiří Lamka J., Szotáková B., Várady M., Skálová L. (2018) UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology*, vol. 8, 420 - 429
- Matoušková P., Vokřál I., Lamka J., Skálová L. (2016) The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, vol. 32, 481 - 491
- Meradi S., Cabaret J., Bentounsi B. (2016) Arrested development of abomasal trichostrongylid nematodes in lambs in a steppe environment (North-Eastern Algeria). *Parasite*, vol. 39, 1 - 6
- Prada-Arismendy J., Castellanos J. E. (2011) Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombio Medica*, vol. 42, 243 - 258
- Prichard R. K. (2001) Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, vol. 17, 445 - 453
- Roeber F., Jex A. R., Gasser R. B. (2013) Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. *Parasites and Vectors*, vol. 6, 1 - 17
- Roos M. H., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra J. G., Lenstra J. A. (2004) Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, vol. 34, 109 - 115
- Skálová L. (2011) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. vyd. Karolinum, Praha, ISBN 978-80-246-1917-0

- Sofronic-Milosavljevic L., Ilic N., Pinelli E., Gruden-Movsesijan A. (2015) Secretory products of trichinella spiralis muscle larvae and immunomodulation: Implication for autoimmune diseases, allergies, and malignancies. Journal of Immunology Research, vol. 2015, 1 - 14
- Smrž J. (2013) Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů. 1. vyd. Karolinum, Praha, ISBN 978-80-246-2258-3
- Stuchlíková Raisová L., Matoušková P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Sečkařová A., Dimunová D., Nguyen L. T., Várady M., Skálová L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. International Journal for Parasitology, vol. 8, 50 - 58
- Tak I. R., Shoaib A. D., Shafi Dar J., Ganai B., Fayaz A. (2014) A Brief Study of Morphology of *Haemonchus contortus* and its Hematophagous Behaviour. Global Veterinaria, vol. 13, 960 - 965
- Taman A., Azab M. 2014. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. Parasitology Research, vol. 113, 2425 - 2433
- Van Den Brom R., Moll L., Kappert C., Vellema P. (2015) *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. Veterinary Parasitology, vol. 209, 278 - 280
- Van Wyk J., Gerber H. A., Groenveld H. T. (1980) A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar : Large-scale application. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, vol. 47, 147 - 158
- Vokřál I., Jedličková V., Jirásko R., Stuchlíková L., Bártíková H., Skálová L., Lamka J., Holčapek M., Szotáková B. (2013a) The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). Parasitology, vol. 140, 361 - 367
- Vokřál I., Jirásko R., Stuchlíková L., Bártíková H., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Skálová L. (2013b) Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. Veterinary Parasitology, vol. 196, 373 - 381
- Volf P., Horák P. (2007) Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Triton, Praha, ISBN 978-80-

7387-008-9.

Waller P. J., Chandrawathani P. (2005) *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. Tropical biomedicine, vol. 22, 131 - 137

Waller P. J., Rudby-Martin L., Ljungström B. L., Rydzik A. (2004) The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. Veterinary Parasitology, vol. 122, 207 - 220

Wessler J. D., Grip L. T., Mendell J., Giugliano R. P. (2013) The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. Journal of the American College of Cardiology, vol. 61, 2495 - 2502

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

Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R., Prichard R. (1998) Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. Molecular and Biochemical Parasitology, vol. 91, 327 - 335

Yilmaz E., Ramünke S., Demeler J., Krücken J. (2017) Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. International Journal for Parasitology, vol. 7, 362 - 369