UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

ZMĚNY V EXPRESI BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V HLÍSTICÍCH OVLIVNĚNÝCH ALBENDAZOLEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Bc. Karolína Štěrbová

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové Ph.D. za poskytnutí zajímavého tématu, odborný dohled nad vypracováním této práce a především za přátelský a vždy optimistický přístup.

Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi CSc., doc. Ing. Petře Matouškové Ph.D. a všem ostatním, kteří se podíleli na zajišťování biologického materiálu a přípravě primerů.

Mé veliké děkuji patří Mgr. Pavlíně Kellerové za vysvětlení metod, nespočet konzultací a za její nadšení a nekonečnou trpělivost.

Děkuji.

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

V Hradci Králové

ABSTRAKT
Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Karolína Štěrbová
Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová Ph.D.
Název diplomové práce: Změny v expresi biotransformačních enzymů v hlísticích ovlivněných albendazolem

Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) je vysoce patogenní parazitární hlístice, napadající gastrointestinální systém přežvýkavců. Nemoc, kterou způsobuje, se nazývá dle svého původce hemonchóza. Při dlouhodobé infekci dochází k rozvoji anémie, ztrátě hmotnosti hostitele a mnohdy i k úhynu. K léčbě se používají syntetická antiparazitická léčiva, tzv. anthelmintika. Celosvětovým problémem je rozvoj rezistence vůči všem dosud dostupným anthelmintikům. Důvodem je nejspíše časté a neopodstatněné podávání anthelmintik hospodářským zvířatům a expozice parazitů sub-letálním dávkám. Předkládaná práce je zaměřena na studium mechanismu vývoje resistence u vlasovek vůči albendazolu, anthelmintiku ze skupiny benzimidazolů. Mechanismem přispívajícím ke vzniku rezistence by mohla být zvýšená exprese některých biotransformačních enzymů.

V této práci byl sledován vliv albendazolu na expresi vybraných genů u dospělců *H. contortus* z kmene ISE (Inbread Susceptible Edinburgh). Červi byli izolováni ze slezu jehňat a vystaveni třem různým koncentracím albendazolu (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM) po dobu 4 či 12 hodin. Pomocí kvantitativní PCR byla změřena exprese vybraných genů kódujících biotransformační enzymy z rodiny cytochromu P450 (CYP) a UDP-glukosyltransferas (UGT). Výsledky byly normalizovány pomocí referenčního genu GAPDH a vztaženy ke kontrole (0 μM ABZ). Signifikantní změny vyvolané albendazolem byly zaznamenány v expresi CYP i UGT. Obě pohlaví se lišila jak v konstitutivní expresi genů, tak v jejich odezvě na albendazol. Protože nejvíce byla zvýšena exprese UGT367A1, mohl by se tento enzym podílet na rezistenci vlasovek na albendazol.

ABSTRACT
Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Karolína Štěrbová

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

Title of diploma thesis: Changes in expression of biotransformation enzymes in nematodes affected by albendazole

Barber´s pole worm (*Haemonchus contortus*) is highly pathogenic parasitic nematode, which assaults gastrointestinal system of small ruminants. Disease. Which caused is named by the agent haemonchoses. Long-term infection leads to develop of anaemia, lose weight of host and often even death. For treatment of this disease, synthetic antiparasitic drugs called anthelmintics are used. However, worldwide problem is growth of resistance against all used anthelmintics. Cause of this problem is probably common and unreasonable using of anthelmintics and the exposure of the parasites to sub-lethal doses. This thesis is focused on study of the mechanisms of resistance of barber´s pole worm to albendazole, anthelmintic belonging to benzimidazoles group. The increased expression of biotransformation enzymes could contribute to resistance development.

In our study, the influence of albendazole on expression of selected genes in adults of *H. contortus* from the ISE (Inbread Susceptible Edinburgh) strain was studied. Worms were isolated from the sheep´s abomasum and exposed to three different concentration of albendazole (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM). The incubations lasted 4 or 12 hours. Expression of the selected genes of cytochromes P450 (CYP) and UDP-glukosyltransferases (UGT) were analysed by quantitative PCR. The results were normalized by reference gene GAPDH and related to control (0 μM ABZ). Significant albendazole-induced differences were observed in the expression of CYPs and UGTs. Both sexes differed in the constitutive expression of genes as well as in the response to albendazole. As the most upregulated gene was UGT367A1, this enzyme might be related to resistance of barber´s pole worms to albendazole.

Obsah

1. ÚVOD 8

2. TEORETICKÁ ČÁST 9
2.1 Helminti 9
2.1.1 Hlístice (Nematoda) 9
2.2 Helmintózy 13
2.2.1 Hemonchóza 13
2.2.2 Léčba 14
2.3 Biotransformace 17
2.3.1 Enzymy první fáze biotransformace 17
2.3.2 Enzymy druhé fáze biotransformace 18
2.3.3 Transportéry xenobiotik 19
2.3.4 Metabolismus anthelmintik 19
2.4 Rezistence 21
2.4.1 Mechanismus rezistence 22

3. CÍL PRÁCE 23

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 24
4.1 Biologický materiál, přístrojové vybavení, chemikálie a reagencie 24
4.1.1 Biologický materiál 24
4.1.2 Chemikálie a reagencie 24
4.1.3 Technické vybavení 25
4.1.4 Pracovní pomůcky 25
4.2 Pracovní postupy 25
4.2.1 Izolace dospělců *H. contortus* z biologického materiálu 25
4.2.2 Inkubace s léčivem 26
4.2.3 Izolace RNA 27
4.2.4 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem 28
4.2.5 Ošetření DNasou I 29
4.2.6 Reverzní transkripce 32
4.2.7 Kvantitativní PCR (qPCR) 33
4.3 Statistická analýza 37

5. VÝSLEDKY 38
5.1 Exprese vybraných genů 38

6. DISKUSE 48

7. ZÁVĚR 51

8. POUŽITÉ ZKRATKY 52

9. SEZNAM TABULEK 54

10. SEZNAM OBRÁZKŮ 54

11. SEZNAM GRAFŮ 55

12. POUŽITÁ LITERATURA 56

13. PŘÍLOHY 60

1. ÚVOD

Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) je vysoce patogenní parazit, napadající gastrointestinální systém přežvýkavců. Vajíčka tohoto parazita jsou vylučována spolu se stolicí hostitele, dále se vyvíjejí v infekční larvu, která je následně pozřena spolu s potravou.

Dospělci žijí ve slezu a živí se sáním krve, čímž narušují fyziologický stav hostitele. Onemocnění je nazváno dle svého původce hemonchóza. Jedná se o vážnou infekci, která se vyznačuje poškozením sliznic trávicího traktu, otoky, úbytkem hmotnosti a bledými sliznicemi vlivem nedostatečné kompenzace krevních ztrát. Bohužel se toto onemocnění projevuje i po ekonomické stránce, např. ztrátou užitkovosti zvířat.

K léčbě jsou využívána syntetická antiparazitární léčiva, tzv. anthelmintika, nejčastěji ze skupiny benzimidazolů, imidazothiazolů a makrocyklických laktonů. Problémem jejich užívání je kontaminace životního prostředí, nežádoucí účinky na jiné organismy a především vznik rezistence.

Rozvoj rezistence je zapříčiněn častým a nesprávným užíváním anthelmintik a vystavením parazitů sub-letálním dávkám. Jedná se bezpochyby o závažný problém, který ohrožuje zdraví zvířat a nekontrolovatelné šíření infekce. Znalost mechanismů vzniku rezistence je klíčová pro další opatření v boji proti hemonchóze. Jedním z faktorů napomáhajících ke vzniku rezistence mohou být i změny exprese genů kódujících biotransformační a transportní enzymy. S rozvojem molekulární genetiky a biologie máme možnost tyto geny detailněji zmapovat, odhalit jejich role v metabolismu, sledovat změny v expresi po ovlivnění léčivem a možnou souvislost se vznikem rezistence.

Tato diplomová práce se pokusila zodpovědět otázku, zda vystavení dospělců *H. contortus* sub-letálním dávkám albendazolu může posílit obranný systém hlístice a tím přispět k rozvoji lékové rezistence.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Helminti

Helminti jsou skupinou parazitických červů, zástupců kmenů plochých hlístů (Plathelminthes), oblých hlístů (Nemathelminthes) a vrtějšů (Acanthocephala). Řadí se mezi organismy nejvíce přizpůsobené parazitickému způsobu života (Horák a Scholz 1998).

2.1.1 Hlístice (Nematoda)

Hlístice jsou velice rozmanitou skupinou parazitů napadajících nejen obratlovce, ale i bezobratlé či rostliny. V důsledku toho je odlišné i přizpůsobení jednotlivých skupin k parazitickému způsobu života.

Morfologie

Tělo hlístů je protáhlé, válcovité a nesegmentované. Nejčastěji bývá bílé barvy, tmavé zbarvení je dáno přítomností vajíček či potravy, jako například krve ve střevě. Povrch těla tvoří kutikula, která má nejen ochranou funkci, ale také působí proti tlaku tělních tekutin a udržuje vnější tvar těla. Skládá se především z proteinů a malého množství lipidů. Pod kutikulou se nachází hypodermis, mající u dospělců charakter syncytia, tvořící čtyři tzv. hypodermální lišty. Dorzální a ventrální lišta je spojena s nervovým systémem. Pod hypodermis se nachází podpovrchová svalovina, tvořená podélnými svalovými vlákny (Baron 1996, Horák a Scholz 1998, Zoologie pro veterinární mediky [online]).

Trávicí soustava

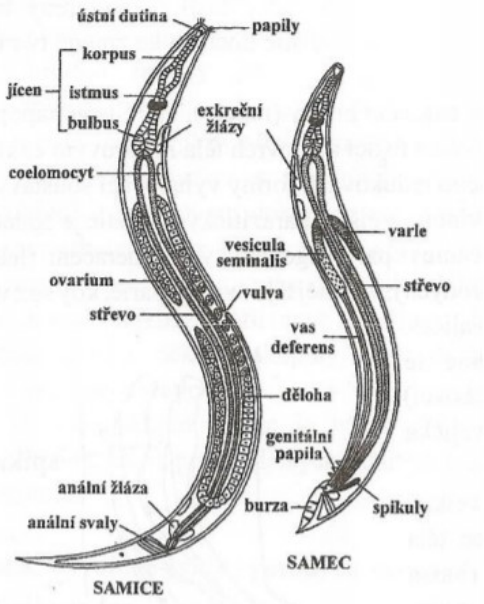
Pseudocoel je tělní dutina vyplněná tekutinou, nahrazující oběhovou soustavu. V ní je volně uložena trávicí soustava a pohlavní orgány, přirostlé pouze ke svým vývodům. Trávicí soustava je úplná, tvořená ústním aparátem, hltanem, střevem a análním otvorem. Stavba úst a hltanu je určující pro další klasifikaci helmintů. K trávení potravy dochází v lumenu střeva a intracelulárně ve střevním epitelu (Baron 1996, Horák a Scholz 1998, Zoologie pro veterinární mediky [online]).

Vylučovací soustava

Vylučovací soustavu tvoří žláznaté exkreční buňky (renety), které jsou napojeny na exkreční kanálky (chordy) vyúsťující do exkrečního sinu a nepárovým exkrečním pórem z těla. Vylučovací systém je vždy více či méně spojen se systémem sekrečním. Sekreční žlázy mají významnou funkci v osmoregulaci, iontové regulaci, antikoagulaci, sekreci proteáz, acetylcholinu a dalších látek (Baron 1996, Horák a Scholz 1998).

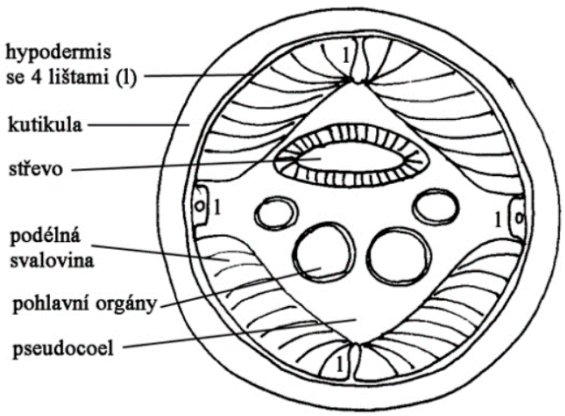
Nervová soustava

Nervová soustava hlístic se skládá z nervového prstence kolem hltanu a dvou nervových trubic uložených terminálně na výběžcích epidermis. Hlavová část hlístice je opatřena řadou nervových zakončení. V kutikule se nachází řada žláz s předpokládanou senzorickou funkcí. Tzv. amfidy se nacházejí po stranách hlavové části, fazmidy naopak na kaudálním konci těla. Dle jejich přítomnosti či absence se hlístice dělí do dvou hlavních skupin, Phasmida a Aphasmida. U většiny nervových buněk nebylo prokázáno používání akčního potenciálu, amplifikace přenosu ani přítomnost Schwannových buněk, přesto se nervový signál přenáší na poměrně velkou vzdálenost (Horák a Scholz 1998).



Obrázek 2 - Základní morfologie hlístic

Roberts a Janovy 2009, upraveno



Obrázek 1 - Příčný řez hlísticí

Zoologie pro veterinární mediky [online]

Svalová soustava

Svalovina u hlístic je uložena pod kutikulou a vrstvou hypodermis. Je složena z jedné vrstvy podélných svalových vláken. Jednotlivé svalové buňky se skládají z kontraktilní části přichycené ke kutikule a nekontraktilní části obsahující jádro a cytoplazmatický výběžek, který umožňuje spojení s výběžky dalších svalových buněk a přijímá tak signál z neuronů. Pohyb těla hlístic je umožněn kontrakcí svalových skupin jedné strany těla a současně relaxací svalových skupin na protilehlé části. Hlístice se tedy nemohou plazit jako kroužkovci, ale pohybují se vlněním či mrskáním. Stahy svaloviny též nahrazují střevní peristaltiku (Horák a Scholz 1998 Zoologie pro veterinární mediky [online]).

Pohlavní soustava

Většina parazitických hlístic je odděleného pohlaví s pohlavním dimorfismem. Samčí soustavu tvoří nepárové varle, velká a malá ejakulatorní žláza a vývody vyúsťující do kloaky. Na zadním konci těla se nachází kopulační burza a přídatné kopulační struktury, sloužící mimo jiné k druhové identifikaci. Samičí soustava se skládá většinou ze dvou vaječníků, trubicovité dělohy a svalnaté vaginy vyúsťující ve vulvu (Baron 1996, Horák a Scholz 1998).

Spermie jsou u hlístic obvykle amébovitého případně tyčovitého tvaru a nemají akrosom ani axonemu. Uvnitř se nachází membránová organela (fibrózní tělísko), která slouží jako zásobárna cytoskeletárních proteinů. Spermie se pohybují pomocí panožek. Oocyty hlístic jsou tvořeny třemi vrstvami – vnitřní lipidovou, střední chitino-proteinovou a vnější lipoproteinovou. Ze stěn dělohy je tvořen vnější obal vajíčka obsahující lipoproteiny a glykosaminoglykany (Horák a Scholz 1998).

Vývojový cyklus

Vývojový cyklus zahrnuje tvorbu gamet, jejich spojení v zygotu a následný růst embrya, larválních stádií až k dospělci. Hlístice mohou mít cyklus buď přímý (monoxenní) či nepřímý (heteroxenní). Přímý vývojový cyklus probíhá bez účasti mezihostitele. Vajíčka se dostávají do prostředí jako součást trusu hostitele, kde se při vhodných teplotních a vlhkostních podmínkách dále vyvíjí až po infekční larvu. Ta se do těla hostitele dostane buď perorálně, u některých zástupců i perkutánně bodavým hmyzem. Hlístice s nepřímým vývojem (biohelminti) potřebují ke svému vývoji

mezihostitele. Nejčastěji se jedná o bezobratlé živočichy (kroužkovci, korýši, hmyz a další), kteří pozřou vajíčka či larvy 1. stádia a v jejich těle dochází k vývoji až po infekční larvu. Konečný hostitel se nakazí pozřením mezihostitele či volných infekčních larev. Výhodou nepřímého cyklu je možnost dlouhodobého přežívání larev v mezihostiteli při nepříznivých podmínkách přenosu (Horák a Scholz 1998, Ryšavý et al. 1982).

2.1.1.1 Vlasovka slézová

Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) se řadí do třídy hlístic (Nematoda), podtřídy Secernentea (Phasmidea) a čeledi Trychostrongyloidae (Horák, Scholz 1998). Jejich tělo je kryto kutikulou, která plní ochranou funkci vůči trávicím enzymům hostitele. Samci jsou menší, na obou koncích těla zúžení. Jejich hlavním rysem je kopulační burza na konci těla. Samice měří 17–30 mm, jsou aktivnější a na pohled spirálovitě pruhované. To je dáno bílými vaječníky, které jsou obtočeny kolem střeva naplněného krví. (Dyk et al. 1962, Sendow 2003).

H. contortus je vysoce patogenní gastrointestinální parazit, jehož hostitelem jsou přežvýkavci, převážně ovce, kozy a zvěř (Hoberg a Zarlenga 2016). Přenáší se orální cestou z kontaminované pastviny. Vajíčka jsou vylučována hostitelem spolu se stolicí. Po 14-17 hodinách se vyvine uvnitř vajíčka larva prvního stupně (L1), která poté prodělá dvojí svlékání a stává se invazivní (L3). Larva třetího stupně je schopna migrace a vylézá na vrcholky stébel trav, nejčastěji ráno a večer, čímž se dostává spolu s potravou do těla hostitele. Invazivní larva se poté přichytí na sliznici slezu a za 14-21 dní dospívá (Dyk et al. 1962, Preston et al. 2016). Samice je schopna vyprodukovat 5000 až 10000 vajíček za den (Sendow 2003).

Larvy prvního a druhého stupně (L1 a L2) se živí bakteriemi v trusu. Larvy třetího stupně a dospělci parazitují ve slezu a v tenkém střevě hostitele, kde se živí krví (Dyk et al. 1962, Sendow 2003).

H. contortus je velmi rozšířený parazit vyskytující se od vlhkých tropických oblastí až po chladné mírné podnebí, čemuž napomohl především obchod se zvířaty a jeho vysoká genetická přizpůsobivost. Rychlost mutace této hlístice je až desetkrát vyšší než u obratlovců (Prichard 2001). Narušuje sliznici slezu a způsobuje gastritidu, anémie, vysokou morbiditu zvířat a významné ekonomické ztráty (Sutherland a Scott 2010).

2.2 Helmintózy

Helmintóza je infekce způsobená parazitickými červy. Jedná se o celosvětový zdravotní problém v oblasti lidí i zvířat (Getachew et al. 2007), zejména v chudých tropických a subtropických oblastech (Taman a Azab 2014). K infekci může dojít perorálně kontaminovanou vodou a potravou či perkutánně. Příznaky se liší v závislosti na lokaci infekce a druhu parazitického červa, mezi běžné však patří bolest břicha, průjem, podvýživa, únava, zvětšená játra a slezina, pneumonitida, anémie, obstrukce střev, zvracení, lymfedém a další. (Manke et al. 2015). Za nejnebezpečnější se považují infekce způsobené nematodami, které napadají gastrointestinální trakt a plíce (shrnuto v Zajíčková et al. 2020).

2.2.1 Hemonchóza

Hemonchóza je infekce způsobená parazitem *H. contortus*. Po narušení slezu se na sliznici vyskytují bělavé plaky, s postupem času může dojít k narušení žaludečních žláz, slizniční hyperplázii, mastocytóze, petechiálnímu krvácení a metaplázii hlenových buněk (AL-Zubaidy et al. 1987). Při dlouhodobé infekci dochází k rozvoji anémie vlivem nedostatečné kompenzace krevních ztrát. Nedostatek červených krvinek a hemoglobinu způsobuje letargii a bledé sliznice. Deficit plazmatických proteinů, zodpovědných za udržování onkotického tlaku, vyvolává submandibulární a obličejové otoky (Allonby a Urquhart 1975, Zajac 2016). Hemonchóza není doprovázena průjmem, hostitel má zachovalou chuť k jídlu, ale ztrácí na hmotnosti, což může vést až k naprosté vyhublosti. Také dochází ke ztrátě užitkovosti a snížení obsahu mléčného tuku (Ježková 2017).

2.2.2 Léčba

Kontrola parazitárních onemocnění u zvířat zatím stále závisí na používání syntetických antiparazitických léčiv (Lanusse 2018). Anthelmintika jsou určena k léčbě helmintóz, váží se na specifická místa a způsobují nestabilitu, spastickou paralýzu či smrt parazita (Idris 2019). Masivní používání těchto léčiv vede k rozšíření rezistence parazitů, zároveň způsobuje kontaminaci životního prostředí a nežádoucí účinky na necílové organismy.

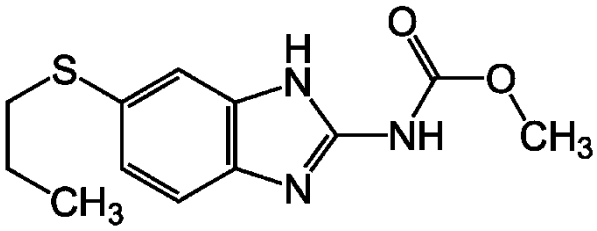
Dle zaměření na třídu parazita rozlišujeme anthelmintika na antitrematoda, anticestoda a antinematoda. Vybraná léčiva z poslední zmíněné skupiny slouží k léčbě hemonchóz. Lze je rozdělit do několika skupin dle struktury a mechanismu účinku, a to na benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyklické laktony a léčiva ostatních chemických struktur (Lamka a Ducháček 2014).

2.2.2.1 Benzimidazoly

Benzimidazolová léčiva byla uvedena na trh poprvé v roce 1961 (James et al. 2009). Mechanismus jejich účinku spočívá v zabránění polymerace mikrotubulů parazita. Mikrotubuly jsou součástí cytoskeletu a hrají významnou roli v transportu různých struktur a látek uvnitř buňky. Skládají se z dimerových podjednotek, tvořených proteiny A-tubulin a B-tubulin. Vazba léčiva na specifické místo B-tubulinu způsobí rozvinutí tohoto proteinu. Jeho abnormální konformace inhibuje další polymeraci tubulinových podjednotek v dělících se buňkách, což má za následek postupné vyčerpání energetických rezerv a ochranných faktorů, inhibici vylučování odpadních látek, a nakonec smrt parazita (Aremu et al. 2012, Maddison 2008, MSD Veterinary manual [online], Prichard 2008). Co se týče přežvýkavců jsou benzimidazoly nejúčinnější, pokud procházejí skrze bachor. Ten působí jako rezervoár léčiva a prodlužuje tak jeho dobu působení (MSD Veterinary manual [online]). Za nejúčinnější ze skupiny benzimidazolů se považuje oxfendazol, fenbendazol, albendazol a jejich proléčiva, jelikož mají nejdelší biologický poločas. Zvyšuje se tak jejich účinnost vůči larvám i dospělým hlísticím (Maddison 2008).

2.2.2.1.1 Albendazol

Albendazol je jedním s nejčastěji používaných širokospektrálních léčiv pro léčbu a prevenci helmintóz. Pro lidské užití byl schválen v roce 1982 (Bloom et al. 2013) a je velmi rozšířen především v rozvojových zemích (Taman a Azab 2014). V České republice se využívá k léčbě nematodóz, trematodóz i cestodóz u ovcí a turu domácího (Lamka a Ducháček 2014). Má vermicidní, ovicidní a larvicidní účinek. Jedná se o léčivo relativně nerozpustné ve vodě. Perorální absorpce u skotu činí přibližně 50 % (Bloom et al. 2013). Kromě léčby helmitóz je ABZ používán při globální eliminaci lymfatické filariózy (Gyapong et al. 2005), k léčbě hydatidních onemocnění a neurocysticerkóz (Garcia 2008).



Obrázek 3 - Vzorec albendazolu

Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Albendazol

2.2.2.2 Imidazothiazoly

Imidazothiazolová léčiva byla uvedena na trh v roce 1970 a řadí se mezi nikotinová anthelmentika (James et al. 2009). Působí jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů. Jejich cholinomimetická aktivita stimuluje ganglia v somatických svalových buňkách, depolarizaci membrán a vstup vápenatých iontů do sarkoplazmatického retikula. Důsledkem toho je trvalá svalová kontrakce a spastická paralýza hlístice. (MSD Veterinary manual [online], Taman a Azab 2014). K léčbě hemonchóz u ovcí se z této skupiny léčiv využívá Levamisol (Lamka a Ducháček 2014).

2.2.2.3 Makrocyklické laktony

Makrocyklické laktony jsou produkty nebo deriváty půdních organismů patřících do rodu Streptomyces. Jedná se o hydrofobní sloučeniny, které jsou bez ohledu na způsob podání distribuovány po celém těle, přičemž se koncentrují zejména v tukové tkáni (MSD Veterinary manual [online]). Poprvé byly uvedeny na trh v roce 1981 (James et al. 2009). Makrocyklické laktony působí na glutamátem řízené chloridové kanály, které se vyskytují pouze u bezobratlých živočichů. Zde interagují s kyselinou

gamaaminomáselnou (GABA), dochází k otevření kanálu a přílivu chloridových iontů. To má za následek paralýzu hltanu, těla a svalů dělohy hlístic (MSD Veterinary manual [online], Prichard 2001, Taman a Azab 2014). Komerčně dostupné makrocyklické laktony jsou primárně vylučovány stolicí.

K léčbě hemonchóz se používá nejvýznamnější léčivo této skupiny – Ivermektin, dále Doramektin a Eprinomektin (Lamka a Ducháček 2014).

2.2.2.4 Amino-acetonitrilové deriváty

Amino-acetonitrilové deriváty jsou syntetické sloučeniny s vysokou účinností proti gastrointestinálním hlísticím a vyznačují se nízkou molekulovou hmotností. Vazbou na podjednotku nikotinových acetylcholinových receptorů spouštějí nekontrolovatelný tok iontů a depolarizaci svalových buněk. To má za následek nevratnou paralýzu hlístice. Jediným komerčně dostupným derivátem je monepantel. (MSD Veterinary manual [online], Rufener 2009).

2.3 Biotransformace

Tělo se zbavuje cizorodých látek pomocí biotransformačních reakcí a transportních procesů. Biotransformační reakce se dělí na dvě fáze - konverzi a konjugaci. Konverze zahrnuje oxidační, redukční a hydrolytické reakce, které vedou buď k vložení nebo odkrytí hydrofilních skupin ve struktuře xenobiotika. Při druhé fázi reaguje xenobiotikum či jeho metabolit s endogenní sloučeninou, aby došlo ke snížení jeho biologické aktivity a snadnější eliminaci. Transport xenobiotika a jeho metabolitů je někdy označován jako třetí fáze (Matoušková et al. 2016, Skálová et al.2017).

U *H. contortus* byly prokázány enzymy účastnící se metabolismu xenobiotik i proteiny transportující léčivo. Působí jako obranné mechanismy proti toxinům vytvářených hostitelem a zároveň chrání před vlastními odpadními metabolity (Lanusse et al. 2018). Zároveň napomáhají snižovat účinek anthelmintických léčiv přeměnou na méně biologicky aktivní metabolity (Matoušková et al. 2016). Významné rozdíly v metabolismu byly zaznamenány i mezi pohlavími tohoto parazita. (Stuchlíková et al. 2018).

2.3.1 Enzymy první fáze biotransformace

2.3.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou nejdůležitější enzymy podílející se na xenobiotickém, ale i eobiotickém metabolismu. Jedná se o hemoproteiny vyskytující se v široké škále isoforem v prokaryotních i eukaryotních organismech. Cytochromy P450 mají převážně monooxygenasovou aktivitu, ale mohou působit i jako peroxidasy či reduktasy (Matoušková et al. 2016, Skálová et al.2017).

Co se hlístic týče, byly CYP nejvíce zkoumány u *Caenorhabditis elegans*. Předchozí studie potvrzují, že se podílejí na metabolismu xenobiotik i u *H. contortus*. Rozdílná exprese CYP byla zaznamenána v různých životních stádiích, nejvíce však v larválním stádiu. Současné znalosti konstitutivní a anthelmintiky indukované exprese CYP u *H. contortus* jsou však stále nedostatečné a vyžadují další studie (Kellerová et al. 2019, Matoušková et al. 2016).

2.3.1.2 Reduktasy

Biotransformace xenobiotik pomocí reduktas se vyskytuje méně často než oxidace. Ovšem některé sloučeniny (např. aldehydy, ketony, peroxidy, ...) jsou metabolizovány právě pomocí redukčních enzymů. Ty se rozdělují do tříd na reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR), reduktasy/dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem a aldo-ketoreduktasy (AKR). U helmintů je těchto genů přítomno relativně velké množství (Matoušková et al. 2016, Skálová et al.2017).

2.3.2 Enzymy druhé fáze biotransformace

2.3.2.1 Glutathion-S-transferasy

Glutathion-S-transferasy (GST) hrají klíčovou roli ve II. fázi biotransformace. Jejich hlavní funkcí je umožnění konjugace elektrofilních sloučenin s glutathionem (Matoušková et al. 2016, Skálová et al.2017).

U helmintů se GST podílejí na detoxikaci lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin produkovaných oxidačním stresem. Taktéž umožňují navázat glutathion na xenobiotické sloučeniny, včetně anthelmintik (Matoušková et al. 2016).

2.3.2.2 UDP-glukosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) spadají pod další enzymy II. fáze biotransformace. Katalyzují tzv. glukuronidaci, kovalentní vazbu hexosových zbytků na lipofilní částice, za účelem zvýšení jejich polarity. Dárcem cukru může být např. UDP-glukuronová kyselina, u hmyzu převládá UDP-glukosa. Glukuronidace a glykosylace jsou převládající reakce katalyzované UGT (Matoušková et al. 2016, Skálová et al. 2017).

U *H. contortus* bylo identifikováno 31 genů, které by mohli mít funkci UGT. Jejich rozmístění na chromozomech je velmi nerovnoměrné, většina z nich je však lokalizována na čtvrtém chromozomu. Všechny identifikované metabolity anthelmintik byly konjugáty glukosy nebo jiné hexosy, proto je velice pravděpodobné, že donorem cukru u *H. contortus* je UDP-glukosa spíše než UDP-glukuronová kyselina (Matoušková et al. 2016, Matoušková et al. 2018). Některé studie naznačují, že by mohly být UGT zapojeny do vzniku rezistence na léčiva (Kotze et al. 2014). U hmyzu *Plutella xylostella* byla prokázána spojitost s rezistencí u genu UGT2B17 (Li et al. 2017).

2.3.3 Transportéry xenobiotik

Transportéry jsou proteiny, které přenášejí látky přes lipidové membrány. Lékové efluxní transportéry umožňují přenos xenobiotik a chrání tak organismus před vnějšími toxickými sloučeninami včetně léčiv. Můžeme je rozdělit do pěti rodin na ATP-vazebné kazetové transportéry (ABC), transportéry více léčiv a extrakcí toxických sloučenin (MATE), transportéry superrodiny hlavních zprostředkovatelů (MFS), transportéry dělení (RND) a malé transportéry multidrogové rezistence (SMR) (Matoušková et al. 2016).

Efluxní transportéry byly popsány i u *H. contortus*. Konkrétně bylo identifikováno několik genů pro P-glykoproteinové transportéry s významnými změnami hladin exprese během všech životních stádií červa (Issouf 2014, Kellerová et al. 2019).

2.3.4 Metabolismus anthelmintik

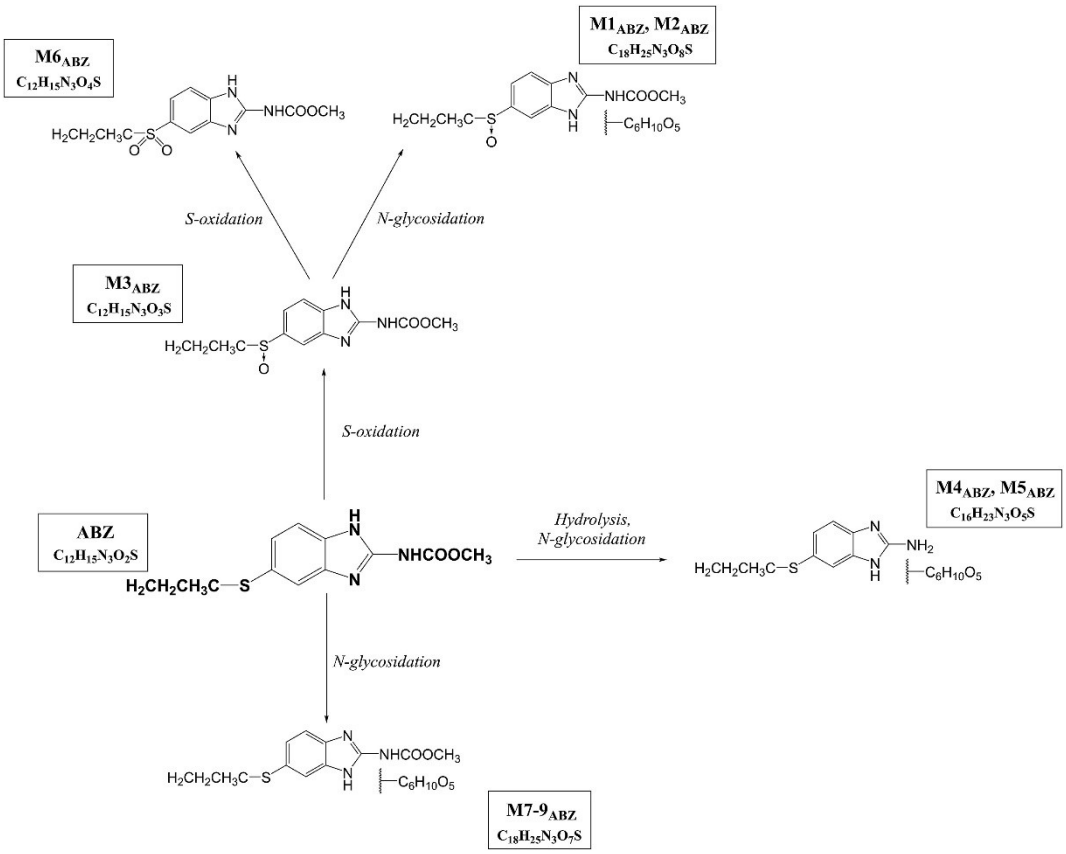
Mezi metabolismem anthelmintik u hlístů a savců jsou veliké rozdíly. Obecně mají hlísti omezenou schopnost metabolizovat xenobiotika, tudíž u nich bylo identifikováno méně metabolitů. Naopak některé anthelmintické biotransformace hlístů nejsou přítomny u savců. Za přeměnu anthelmintik jsou zodpovědné enzymy metabolizující xenobiotika. Ty obvykle mění jejich polaritu, usnadňují distribuci a eliminaci z těla a hrají významnou roli v jejich účinnosti (Lanusse et al. 2018, Matoušková et al. 2016).

U *H. contortus* bylo taktéž prokázáno, že je schopna metabolizovat anthelmintika. V předchozích studiích byla zjištěna přítomnost glykosylovaných metabolitů. Rezistentní kmen oproti citlivému kmenu *H. contortus* vykazoval výraznější glykosilaci a větší schopnost snížit biologickou aktivitu anthelmintik (Matoušková et al. 2018, Stuchlíková et al. 2018).

2.3.4.1 Metabolismus albendazolu

Metabolismus albendazolu u *H. contortus* byl zmapován již v přechozích studiích. V I. fázi biotransformace byl albendazol pomocí oxidačních reakcí metabolizován nejprve na albendazol sulfoxid (ABZ-SO) a poté na albendazol sulfon (ABZ-SO_2). Kromě S-oxidace proběhla i hydrolýza postranního řetězce karbamátu. Ve II. fázi biotransformace došlo k N-glykosidaci samotného albendazolu i jeho metabolitů, ovšem není jisté, zda se jednalo o navázání glukosy či jiné hexosy. Taktéž bylo prokázáno, že

původní léčivo bylo účinnější než vzniklé sulfoxidové metabolity a sulfony byly prakticky neaktivní. I co se týče albendazolu studie ukazují, že rezistentní kmen *H. contortus* metabolizuje toto léčivo s vyšším účinkem než kmen citlivý (Lanusse et al. 2018, Stuchlíková et al. 2018).



Obrázek 4 - Metabolismus albendazolu u H. contortus

Zdroj: Stuchlíková et al. 2018

2.4 Rezistence

Rezistence na léčiva je bezesporu jeden z největších problémů dnešní doby týkající se také parazitárních onemocnění hospodářských zvířat. Navzdory slibným pokusům stále nejsou k dispozici nechemické prostředky a kontrola parazitárních onemocnění je závislá na používání syntetických antiparazitárních léčiv. Nadměrné používání a nesprávné postupy aplikace však vedly k terapeutickým selháním a rozsáhlému rozvoji rezistence (Lanusse et al. 2018).

Schopnost parazitů vyvinout si rezistenci na léčiva je vysoká. Několik studií potvrdilo, že hlístice vykazují různé stupně rezistence vůči všem anthelmintikům. Rozvoj rezistence je zapříčiněn nejspíše častým a neopodstatněným podáváním anthelmintik hospodářským zvířatům a expozicí parazitů sub-letálním dávkám antiparazitik, která může vést k přizpůsobení jejich obranného systému prostřednictvím změn exprese biotransformačních a transportních proteinů (Kellerová et al. 2019, Leathwick a Besier 2014). S vývojem rezistence u hlístic jsou spojovány i enzymy cytochromu P450 a UDP-glykosyltrasnferasy (Kellerová et al 2019, Matoušková et al. 2018, Vokřál et al. 2013).

Znalost genetiky nematod a mechanismů rezistence je klíčová pro vývoj nových anthelmintik (Prichard 2008). Zpomalení vývoje rezistence lze dosáhnout střídáním pastvin, vhodnou výživou, podáním různých druhů anthelmintik, vhodným dávkováním a dalšími doporučeními pro chov (Ruano et al. 2017).

H. contortus má velmi vysokou tendenci k rozvoji rezistence. Již nyní vykazuje odolnost vůči všem hlavním třídám anthelmintických léčiv, včetně benzimidazolů, imidazothiazolů, makrocyklických laktonů i amino-cetonitrilů. V mnoha případech se rezistence objevila do deseti let po zavedení léčiva na trh (Kotze a Prichard 2016).

Studie Stuchlíkové et al. (2018) ukázala, že některé metabolické biotransformační procesy mohou být dalším faktorem přispívajícím ke vzniku rezistence. *H. contortus* z rezistentního kmene IRE vykazoval větší biotransformační aktivitu I. i II. fáze oproti citlivému kmeni ISE (Stuchlíková et al. 2018). I další studie poukazují na zvýšenou S-oxidaci albendazolu či silnější glykosidaci léčiva v rezistentních kmenech *H. contortus* (Stuchlíková et al. 2018, Vokřál et al. 2012, 2013).

2.4.1 Mechanismus rezistence

Mechanismus rezistence na léčivo může být farmakodynamický nebo farmakokinetický. První typ rezistence zahrnuje snížení množství cílových molekul nebo změnu jejich struktury, což má za následek snížení účinnosti léčiva. Mezi druhý typ rezistence můžeme zařadit veškeré mechanismy založené na působení biotransformačních enzymů metabolizujících xenobiotika, které jsou zodpovědné za snížení absorpce, inaktivaci a zrychlení eliminace léčiva (Skálová et al. 2017, Stuchlíková et al. 2015).

V souvislosti s rezistencí byl u *H. contortus* pozorován výskyt jednonukleotidových polymorfismů. Jedná se o deleci nebo substituci aminokyseliny v cílovém proteinu vázajícím léčivo. V případě rezistence na benzimidazoly se jedná o změnu ve třech kodonech (167, 198, 200), která mění trojrozměrnou strukturu β-tubulinového proteinu a snižuje tak afinitu léčiva k vazebnému místu (Citace: Kotze and Prichard, 2016).

Za odolnost vůči více lékům (multi-drug resistence) je zodpovědný mimo jiné i P-glykoprotein. Jedná se o transportní protein, který zajišťuje přepravu lipofilních látek přes membrány. V souvislosti s rezistencí napomáhá snižovat účinek léčiva tak, že snižuje jeho množství, které se dostává k cílovému místu (Kotze and Prichard, 2016, Kellerová 2019).

Součástí cytotoxicity léčiva může být vylučování volných radikálů. Někteří parazité jsou schopni uvolňovat antioxidanty, např. glutathion, díky kterým snižují cytotoxický účinek léčiva a napomáhají tak vzniku rezistence. Tento mechanismus byl potvrzen i u *H. contortus*, kdy byla pozorována zvýšená hladina glutathion-S-transferasy po podání Cambendazolu (Kawalek et al. 1984).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo sledování změn v expresi vybraných genů kódujících biotransformační enzymy cytochromy P450 (CYP) a UDP-glukosyltransferasy (UGT) u dospělců *H. contortus* kmene ISE po inkubaci se sub-letálními dávkami albendazolu.

Dílčími úkoly bylo:

- Izolovat a roztřídit dospělce *H. contortus* dle pohlaví
- Ovlivnit dospělce albendazolem (ABZ) po dobu 12 či 24 hodin
- Izolovat RNA a stanovit relativní expresi jednotlivých CYP a UGT v kontrolních dospělcích a v dospělcích ovlivněných ABZ (0,01 μM, 0,1 μM a 1 μM) pomocí qPCR
- Porovnat expresi CYP a UGT u samců a samic
- Zpracovat výsledky a učinit závěry

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál, přístrojové vybavení, chemikálie a reagencie

4.1.1 Biologický materiál

Zdravá jehňata, stará 3-4 měsíce, byla infikována perorální suspenzí obsahující asi 6000 larev třetího stádia (L3) parazita *H. contortus*. Pro tuto studii byl vybrán kmen ISE (Inbred susceptible-Edinburgh; MHco3), citlivý na anthelmintika. Zvířata byla chována v akreditovaných stájích Zemědělské společnosti Býšť ve vnitřních boxech z důvodu prevence před nákazou jinými gastrointestinálními parazity. Pátý týden od nákazy byl odebrán trus na kontrolu rozsahu infekce. Po sedmi týdnech byla jehňata omráčena a zabita. Následně byl odebrán slez obsahující dospělce *H. contortus*. Se všemi zvířaty bylo zacházeno v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. ve znění pozdějších předpisů a dle Vyhlášky č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat.

4.1.2 Chemikálie a reagencie

albendazol – Sigma-Aldrich

dimethyl sulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich

DNasa I pufr – New England BioLabs

DNasa I – New England BioLabs

dithiotreitol (DTT) – New England BioLabs

ethylendiamintetraacetát (EDTA) – Sigma-Aldrich

ethanol – Sigma-Aldrich, 99%

expoziční medium RPMI-1640 (modifikované) – Sigma-Aldrich

chloroform – Sigma-Aldrich

isopropanol – Sigma-Aldrich

náhodné hexamery – Generi Biotech

primery (1 referenční (housekeeping) gen pro GAPDH, 8 genů pro cytochromy P450 a 31 genů pro UGT) – Generi Biotech

qPCR Xceed SG Mix – Institute of Applied Biotechnologies

reverzní transkriptáza (RT): Protoscript® II – New England BioLabs

RT pufr: ProtoScript II – New England BioLabs

směs deoxynukleotidů (dNTPs) – Eurogentec

TriReagent®– Molecular Research Centre

4.1.3 Technické vybavení

Automatické pipety – Eppendorf

Blokový inkubátor – Eppendorf

Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus, Thermo Scientific

Hlubokomrazicí box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific

Kuličkový homogenizér – FastPrep 24 5G, MP Biomedical

Laminární box – UVC/T-AR, BioSan

Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific

PCR cyklér – MJ mini, Bio-Rad

Přístroj pro Real Time PCR – 384 - jamkový PCR termocyklér; QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR system, Applied Biosystems

Spektrofotometr – NanoDrop ND-1000 UV – VIS Spektrofotometr, Thermo Fisher Scientific

Vortex – BioSan

4.1.4 Pracovní pomůcky

Laboratorní sklo, pinzeta, PCR destičky, pipety, plastové zkumavky, mikrozkumavky, pipetovací špičky, rukavice, stojany na mikrozkumavky, kuličky kovové a keramické, skleněné Pasteurovy pipety, nádoba na led, buničina, mrazicí stojánky na mikrozkumavky, pipety na malé objemy.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Izolace dospělců *H. contortus* z biologického materiálu

Dospělci *H. contortus* byly získáni ze slezu infikovaných jehňat pomocí agarové metody (Van Wyk et al. 1980). Poté byly roztříděny dle morfologických znaků na samce a samice. Třídění probíhalo na černém pozadí, kde je pouhým okem možno vidět nápadné červenobílé pruhování samic, obmotání střeva naplněného krví a bílými vaječníky.

Samice jsou delší, širší i aktivnější než samci. Kontrola morfologie byla provedena pomocí binokulárního mikroskopu. Samice byly identifikovány dle vulvy ve střední či koncové části těla, samci pomocí kopulační burzy na konci těla.

4.2.2 Inkubace s léčivem

Ihned po roztřídění dospělců byla provedena inkubace s léčivem. Na jeden vzorek byl použit vždy 1 ml expozičního media RPMI-1640 a 1 µl zásobního roztoku albendazolu ředěný 100 % DMSO. Finální koncentrace ABZ ve vzorku činila 0,01 µM, 0,1 µM a 1 µM. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze expoziční medium RPMI-1640 a 0,1 % DMSO. Do takto připravených směsí bylo vloženo 10 samičích dospělců či 15 samčích dospělců a inkubace probíhala při 37 °C 4 h nebo 12 h. Po uplynutí kultivační doby byli červi přeneseni do 1 ml TriReagentu®, zkumavky řádně označeny a vloženy do mrazícího boxu na – 80 °C.

Tabulka 1 - Rozložení vzorků pro inkubaci

F1 Kontrola	F1 1 µM	F1 0,1 µM	F1 0,01 µM	M1 Kontrola	M1 1 µM	M1 0,1 µM	M1 0,01 µM
F2 Kontrola	F2 1 µM	F2 0,1 µM	F2 0,01 µM	M2 Kontrola	M2 1 µM	M2 0,1 µM	M2 0,01 µM
F3 Kontrola	F3 1 µM	F3 0,1 µM	F3 0,01 µM	M3 Kontrola	M3 1 µM	M3 0,1 µM	M3 0,01 µM
F4 Kontrola	F4 1 µM	F4 0,1 µM	F4 0,01 µM	M4 Kontrola	M4 1 µM	M4 0,1 µM	M4 0,01 µM

F1 až F3 – Female (samice), duplikáty

M1 až M3 – Male (samci), duplikáty

Kontrola – 0 µM ABZ

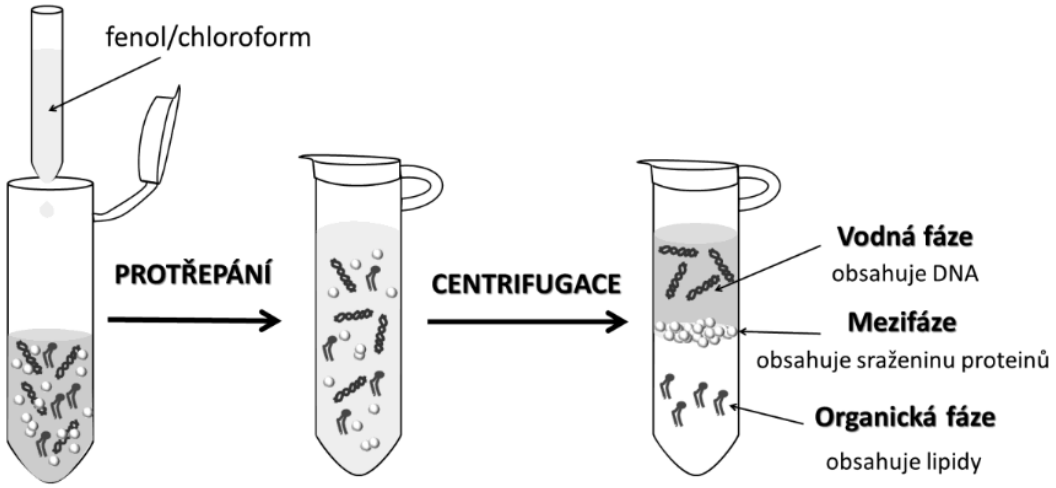
4.2.3 Izolace RNA

Principem této metody je selektivní izolace celkové RNA z dospělců *H. contortus*. Jelikož je RNA velice náchylná na působení RNasy, vyskytující se volně v prostředí, je třeba pracovat v laminárním boxu k tomu určenému a v rukavicích.

Zmrazené vzorky červů byly po inkubaci přeneseny do laminárního boxu a rozmraženy. Do zkumavek byly přidány malé keramické kuličky a jedna větší kovová kulička. Vzorky byly vloženy do kuličkového homogenizátoru na 3 minuty při 50/s, aby došlo k jejich rozmělnění. Následně se vzorky nechaly stát 5 minut při laboratorní teplotě.

K následné izolaci RNA byla použita fenol-chloroformová extrakce. Principem je oddělení bílkovin od lipidů pomocí chloroformu, který je nemísitelný s vodou (Kočárek 2007).

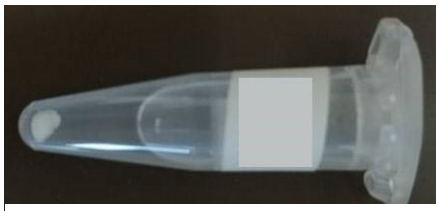
Po přidání 200 µl chloroformu ke každému vzorku bylo třeba 15 sekund třepat v ruce, aby došlo k důkladnému promísení a oddělení fází při následném tříminutovém stání. Pro důkladné oddělení byly vzorky přeneseny do vychlazené centrifugy (4 °C) a stočeny po dobu 15 minut při 12 000 g. Tím došlo k vytvoření dolní organické fáze obsahující chloroform a lipidy, prstence vysrážených proteinů oddělujícího obě vrstvy a horní vodné fáze obsahující RNA. Ta byla následně přenesena pomocí pipety do nové zkumavky v objemu minimálně 400 µl. V tomto kroku je důležité nedotýkat se mezifáze či dolní organické fáze, jinak by mohlo dojít ke kontaminaci RNA.



Obrázek 5 - Rozdělení fází po centrifugaci

Zdroj: http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuka/materialy/Leiden.pdf

K přepipetované vodní fázi bylo přidáno 500 µl isopropanolu a po důkladném promíchání na vortexu se vzorky nechaly stát 10 minut při laboratorní teplotě. Po následné centrifugaci 10 minut při 12 000 g došlo k vysrážení RNA a vytvoření pelety na dně zkumavky.



Obrázek 6 – Peleta

Zdroj: foto – Karolína Štěrbová

Nakonec byl použit 1 ml čerstvě naředěného 75 % ethanolu z absolutního ethanolu a DEPC vody. Tento krok slouží k odstranění sražených krystalů anorganických solí (Kočárek 2007). Vzorek byl promíchán v ruce a stočen 5 minut při 7 500 g. Následně byl odstraněn supernatant skleněnou pipetou s vytaženým koncem pro důkladnější odsátí kapek bez porušení pelety, které schly na vzduchu přibližně 10 minut. Vzhledem k velikosti pelety a předpokládanému množství RNA bylo k samičím dospělcům přidáno 30 µl DEPC vody a k samčím dospělcům pouze 20 µl DEPC vody.

Po důkladném promíchání byly vzorky v závislosti na dalším postupu uloženy na led či zmraženy při – 80 °C.

4.2.4 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem

Množství izolované RNA a její čistota byly měřeny pomocí spektrofotometru: NanoDrop ND-1000 UV. Proces je založen na základě měření absorbance při vlnové délce 260 nm, při které vykazují nukleové kyseliny své absorpční maximum, naopak absorpčnímu maximu bílkovin odpovídá vlnová délka 280 nm. Poměrem hodnot A_{260}/A_{280} je možno zjistit míru kontaminace vzorku proteiny. V ideálním případě by se hodnoty znečištění měly pohybovat v rozmezí 1,8 – 2,0. Pokud je výsledný poměr nižší než 1,75, jedná se o vysokou kontaminaci proteiny či organickými látkami (Kočárek 2007, Slabý et al. 2015). Taktéž je možno změřit míru kontaminace chloroformem, použitým v předchozím kroku, a to poměrem vlnových délek A_{260}/A_{230}.

4.2.5 Ošetření DNasou I

Tento krok slouží k odstranění nechtěné kontaminace genomovou DNA. Přečištění izolované RNA se provádí pomocí endonukleázy DNasa I, která nespecificky štěpí genomovou DNA a vytváří jednořetězcové zlomy v dsDNA. (Slabý et al. 2015). Vychází z koncentrace RNA, změřené pomocí Nanodropu. Celý postup probíhal v laminárním boxu a rukavicích.

Do předem připravených a označených zkumavek byla napipetována naředěná RNA na 4 µg na vzorek v DEPC H_2O dle tabulky 2 a 3 a vše bylo pomocí špičky pipety důkladně promícháno. Ke každému vzorku byly přidány 4 µl mastermixu obsahující enzym DNasa I a DNasa pufr v poměru 1:3.

Poté byly vzorky důkladně promíchány na vortexu, krátce stočeny na minicentrifuze a přeneseny do stolního inkubátoru na 25 minut při 37 °C s třepáním nastaveným na 500rpm. V tomto kroku došlo ke štěpení případné genomové DNA ve vzorku.

Následně bylo ke každému vzorku přidáno 1,5 µl 0,1M EDTA, dále byly promíchány a inkubovány 10 minut při 75 °C. Takto došlo k inaktivaci DNasy I.

Po ukončení inkubace byly vzorky ihned přeneseny na led a naředěny DEPC H_2O tak, aby výsledná koncentrace RNA v každém vzorku činila 0,1 µg/µl. Po důkladném promíchání byly vzorky v závislosti na dalším postupu uloženy na led či zmraženy při – 80 °C.

Tabulka 2 - Koncentrace vzorků ovlivněných ABZ po dobu 4 hodin

Vzorek	původní koncentrace [ng/µl]	4 µg RNA [µl]	H_2O do 26 µl [µl]
F1 kontrola	1396,01	2,9	23,1
F2 kontrola	1185,78	3,4	22,6
F3 kontrola	1166,39	3,4	22,6
F4 kontrola	1391,35	2,9	23,1
F1 0,01 µM ABZ	1468,19	2,7	23,3
F2 0,01 µM ABZ	1744,26	2,3	23,7
F3 0,01 µM ABZ	1201,89	3,3	22,7
F4 0,01 µM ABZ	1048,56	3,8	22,2
F1 0,1 µM ABZ	1808,83	2,2	23,8
F2 0,1 µM ABZ	1207	3,3	22,7
F3 0,1 µM ABZ	1643	2,4	23,6
F4 0,1 µM ABZ	806	5,0	21,0
F1 1 µM ABZ	1423	2,8	23,2
F2 1 µM ABZ	1120	3,6	22,4
F3 1 µM ABZ	872,97	4,6	21,4
F4 1 µM ABZ	1347,06	3,0	23,0
M1 kontrola	424,11	9,4	16,6
M2 kontrola	600,98	6,7	19,3
M3 kontrola	444,74	9,0	17,0
M4 kontrola	399,90	10,0	16,0
M1 0,01 µM ABZ	794,05	5,0	21,0
M2 0,01 µM ABZ	754,15	5,3	20,7
M3 0,01 µM ABZ	674,25	5,9	20,1
M4 0,01 µM ABZ	707,15	5,7	20,3
M1 0,1 µM ABZ	611,90	6,5	19,5
M2 0,1 µM ABZ	386,68	10,3	15,7
M3 0,1 µM ABZ	329,60	12,1	13,9
M4 0,1 µM ABZ	532,50	7,5	18,5
M1 1 µM ABZ	296,98	13,5	12,5
M2 1 µM ABZ	772,37	5,2	20,8
M3 1 µM ABZ	608,31	6,6	19,4
M4 1 µM ABZ	465,98	8,6	17,4

Tabulka 3- Koncentrace vzorků ovlivněných ABZ po dobu 12 hodin

Vzorek	původní koncentrace [ng/µl]	4 µg RNA [µl]	H_2O do 26 µl [µl]
F1 kontrola	886,60	4,5	21,5
F2 kontrola	884,48	4,5	21,5
F3 kontrola	994,33	4,0	22,0
F4 kontrola	889,05	4,5	21,5
F1 0,01 µM ABZ	1034,50	3,9	22,1
F2 0,01 µM ABZ	963,58	4,2	21,8
F3 0,01 µM ABZ	1204,50	3,3	22,7
F4 0,01 µM ABZ	1125,60	3,6	22,4
F1 0,1 µM ABZ	1432,20	2,8	23,2
F2 0,1 µM ABZ	931,41	4,3	21,7
F3 0,1 µM ABZ	984,29	4,1	21,9
F4 0,1 µM ABZ	1048,80	3,8	22,2
F1 1 µM ABZ	1165,00	3,4	22,6
F2 1 µM ABZ	1062,90	3,8	22,2
F3 1 µM ABZ	1506,60	2,7	23,3
F4 1 µM ABZ	1021,10	3,9	22,1
M1 kontrola	231,09	17,3	8,7
M2 kontrola	220,10	18,2	7,8
M3 kontrola	322,84	12,4	13,6
M4 kontrola	281,69	14,2	11,8
M1 0,01 µM ABZ	551,67	7,3	18,7
M2 0,01 µM ABZ	381,90	10,5	15,5
M3 0,01 µM ABZ	352,27	11,4	14,6
M4 0,01 µM ABZ	320,12	12,5	13,5
M1 0,1 µM ABZ	671,94	6,0	20,0
M2 0,1 µM ABZ	571,51	7,0	19,0
M3 0,1 µM ABZ	849,88	4,7	21,3
M4 0,1 µM ABZ	824,26	4,9	21,1
M1 1 µM ABZ	647,18	6,2	19,8
M2 1 µM ABZ	427,73	9,4	16,6
M3 1 µM ABZ	564,21	7,1	18,9
M4 1 µM ABZ	---	---	---

4.2.6 Reverzní transkripce

Pomocí reverzní transkriptázy je k jednořetězcové sekvenci RNA naamplifikována komplementární DNA v PCR cykléru. Tento krok byl proveden samostatně pro vzorky inkubované 4 hodiny a 12 hodin.

Nejprve byly vzorky rozmraženy, zamíchány pomocí vortexu a stočeny na minicentrifuze. Následně byl do každé 0,2 ml mikrozkumavky pipetován 1 µl náhodných hexamerů a 5 µl RNA o koncentraci 0,1 µg/µl. Tato směs byla promísena špičkou pipety a přenesena do PCR cykléru, kde byly vzorky zahřívány 5 minut na 65 °C.

Poté byly vzorky přeneseny zpět do laminárního boxu pomocí mrazícího stojánku na mikrozkumavky. K ochlazeným vzorkům bylo přidáno 14 µl mastermixu dle tabulky 4. Vždy byl počítán jeden vzorek navíc, z důvodu pipetovací chyby či ulpívání mastermixu na stěnách zkumavky. Celkový objem v každé zkumavce činil 20 µl.

Tabulka 4 – Rozpis jednotlivých reagencií použitých pro reverzní transkripci

	1 vzorek [µl]	33 vzorků [µl]
DEPC H_2O	5,5	181,5
RT pufr	4	132
DTT	2	66
dNTPs	2	66
RT	0,5	16,5
Celkem	14	462

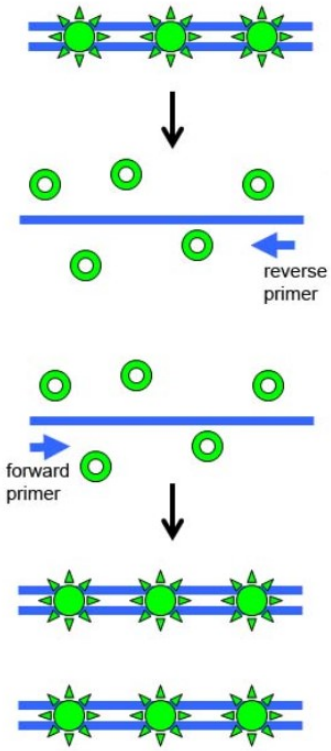
Takto připravené vzorky byly důkladně zamíchány na vortexu a stočeny v minicentriguze. Následně byly přeneseny zpět do PCR cykléru, který byl nastaven na následující fáze – I) zahřátí 10 minut na 25 °C (nasednutí primerů na jednotlivé řetězce RNA); II) zahřátí 50 minut na 42 °C (syntéza komplementárního řetězce DNA (cDNA) dle templátu RNA za působení enzymu reverzní transkriptázy); III) zahřátí 5 minut na 80 °C (denaturace reverzní transkriptázy).

Po reakci byl každý vzorek 10 x naředěn 180 µl ddH_2O a uchován v mrazícím boxu při -20 °C. Vzorky byly takto připraveny k analýze pomocí qPCR.

4.2.7 Kvantitativní PCR (qPCR)

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda využívaná mimo jiné i pro analýzu genové exprese, což je umožněno amplifikací specifického úseku nukleové kyseliny. Principem metody je několikanásobná syntéza určitého úseku DNA vymezeného primery (Kočárek 2007, Slabý et al. 2005).

U tradiční metody PCR se výsledný produkt detekuje až po ukončení posledního cyklu. Naopak je tomu u kvantitativní PCR neboli PCR v reálném čase, která stanovuje tvorbu produktu v průběhu celé reakce. Vzorek je uvnitř termocykléru ozařován excitačním UV zářením, které přímo indukuje fluorescenci. Speciální detektor měří míru fluorescence v průběhu celé reakce a výsledky převádí do počítače. Koncentrace fluorescenčního barviva přímo odpovídá množství vzniklého amplikonu (Logan at al. 2009). V tomto případě byly použity nespecifické sondy SYBR Green, které nasedají na dvouřetězce DNA a výrazně tak zvyšují emisi fluorescence, která odpovídá množství dsDNA v reakci (obrázek 7).



Obrázek 7 - Sondy SYBR Green

Zdroj: https://labguide.cz/sybergreen/sybr-green/

Kvantitativní PCR výrazně urychluje vyšetření DNA, která by jinak vyžadovala elektroforézu a detekci amplikonu na gelu. Využívá se při stanovení přesného množství vstupní templátové DNA, identifikaci delecí či amplifikací některých genů a v neposlední řadě ke sledování genové exprese (Kočárek 2007, LabGuide.cz [online]).

Teplota tání

Při použití nespecifických sond, jako již výše zmíněný SYBR GREEN, je vhodné sledovat křivku tání, která může odhalit tvorbu nespecifických produktů, např. primer-dimerů. Teplota tání je definována jako teplota, při které dojde k denaturaci právě u poloviny dsDNA řetězců za vzniku ssDNA. Čím vyšší je teplota tání, tím specifičtější je vazba primerů na tepmlát (Logan at al. 2009).

Amplifikační křivka

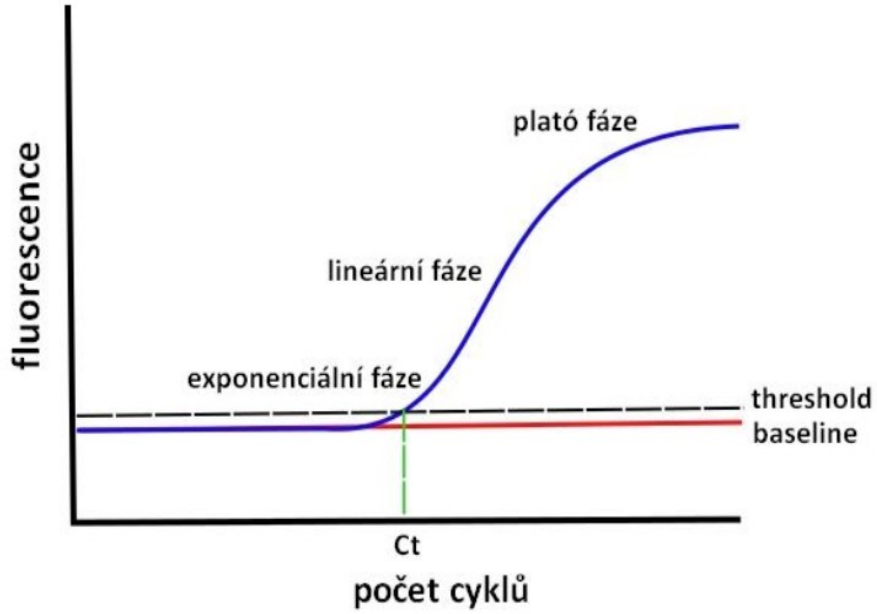
Amplifikační křivka je grafickým výstupem každé kvantitativní PCR reakce. Je tvořena grafem s hodnotami naměřené fluorescence oproti jednotlivým cyklům, ve kterých byla detekována.

Exponenciální fáze je vysoce specifická, dochází při ní ke zdvojnásobení původního množství DNA v reakci. Při lineární fázi dochází k postupnému zpomalování reakce a spotřebě jednotlivých komponent. Ve fázi plató je reakce zastavena, neboť může docházet k degradaci produktu.

Tzv. základní linie (baseline) představuje hranici, kdy míra fluorescence produktu překročí prahovou citlivost detektoru. Vše pod touto hranicí nazýváme fluorescenční pozadí.

Prahová hodnota (threshold) je předem definovaná fixní hodnota fluorescence. Pokud je při amplifikaci vzorku dosaženo této prahové fluorescence, je odečten cyklus, čímž je získána hodnota Ct (cycle treshold). Prahová hodnota musí být nastavena tak, aby jí bylo dosaženo právě v exponenciální fázi, která je nejpřesnější. Slouží ke kvantifikaci a vzájemnému porovnávání více vzorků.

Hodnota Ct se tedy rovná počtu cyklů, v nichž fluorescence přesáhla prahovou hodnotu (Slabý et al. 2015).



Obrázek 8 - Amplifikační křivka

Zdroj: http://bitesizebio.s3.amazonaws.com/wpcontent/uploads/2015/06/PCR.png (upraveno)

Vyhodnocování výsledků

Kvantitativní PCR vychází z předpokladu, že při každém cyklu se množství templátu zdvojnásobí, tudíž množství produktu je mu přímo úměrné. Ve skutečnosti je efektivita reakce menší než 100 % a této hodnotě se pouze přibližuje.

Za použití relativní kvantifikace je možné stanovit změny v hladině exprese genu u jednotlivých vzorků vzhledem k hladině exprese genu kontrolního. K normalizaci se používá referenční gen, v této práci byl použit glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), který je stabilní a jeho exprese je neměnná (Lecová et al. 2015, Slabý et al. 2015).

4.2.7.1 Vlastní analýza qPCR

Pro analýzu vzorků pomocí qPCR byl použit qPCR kit obsahující DNA polymerázu, směs dNTPs, pufr a nespecifické sondy SYBR Green (qPCR Xceed SG Mix). Dále byli použity specifické primery pro 8 CYP genů (Kellerová et al. 2019), 31 UGT genů (Matoušková et al. 2018) a jeden referenční GAPDH (Lecová et al. 2015). Jednotlivé sekvence primerů a jejich amplifikační účinnost jsou uvedeny v příloze č.1.

Tyto komponenty byly smíchány pro každý gen zvlášť a doředěny vodou na finální množství reakční směsi 6 µl dle tabulky 5.

Automatickou pipetou byl master mix pro každý gen napipetován do 384 jamkové PCR destičky (tzv. Real-time PCR array sloužící k paralelní analýze genové exprese více vzorků naráz. Jednotlivé vzorky se pipetují do plastových destiček, obsahujících 96, 384 či dokonce 1536 jamek. Dochází zde tedy k miniaturizaci, významné úspoře reagencií a vysokokapacitní analýze (Slabý et al. 2015) K mastermixu byly přidány 2 µl vzorku ve dvou technických replikátech. Výsledný objem každé analyzované směsi tedy činil 8 µl. Pro každý gen byla provedena negativní kontrola, umožňující zjistit případnou kontaminaci, kde namísto vzorku byla napipetována redestilovaná voda.

Tabulka 5 - Jednotlivé komponenty pro qPCR

	komponenty pro analýzu jednoho vzorku [µl]	Master-mix pro analýzu jednoho genu (34 vzorků) [µl]
Redestilovaná voda	1,68	57,12
qPCR kit	4,00	136,00
Primer (F+R)	0,32	10,88
vzorek cDNA	2,00	
Celkem	8,00	204,08

F – forward primer

R – reverse prime

4.3 Statistická analýza

Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel, vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1 a vyjádřeny jako průměr ± SD.

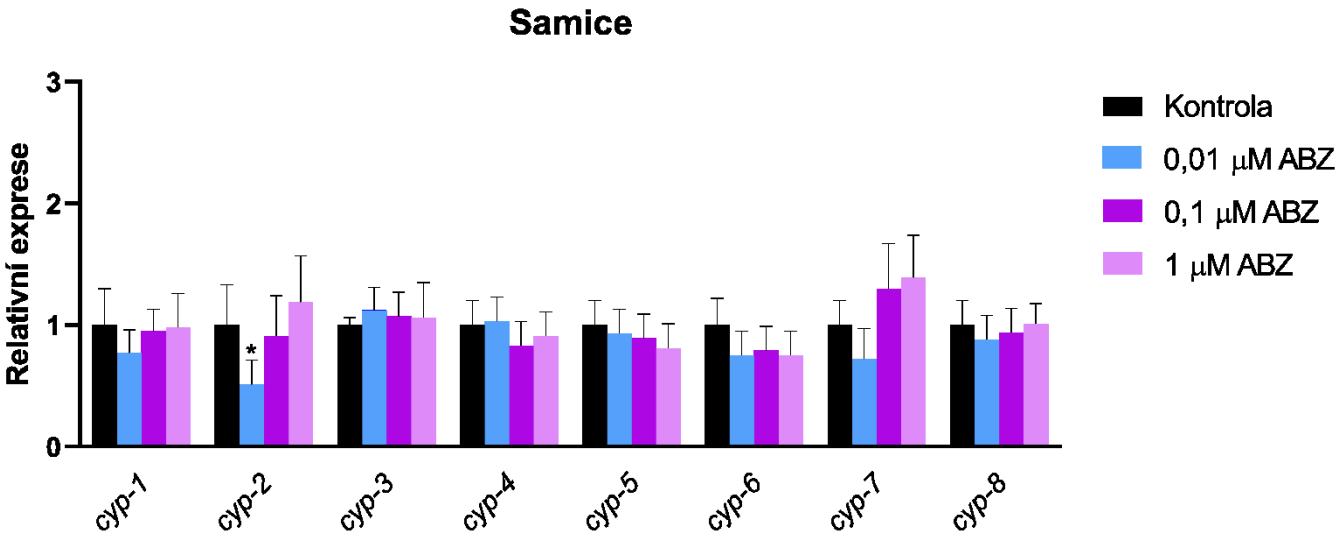
V našem případě byla použita metoda relativní kvantifikace, která umožňuje stanovit změny v hladinách exprese genu u jednotlivých vzorků vzhledem k hladině exprese vzorku kontrolního, čemuž předcházela normalizace pomocí referenčního genu.

Nejprve byly hodnoty CT duplikátů zprůměrovány a dosazeny do rovnice 2 ^ (ΔCT), kde ΔCT značí Ø CT stanovovaného genu – Ø CT referenčního genu GAPDH. Léčivem neovlivněným kontrolním vzorkům, byla udělena hodnota 1,00 a k ní byly vztaženy normalizované výsledky všech albendazolem ovlivněných vzorků. Poté byly data vyhodnoceny v programu GraphPad Prism metodou two-way ANOVA, Dunnetovým vícenásobným srovnávacím testem a hladinou významnosti $P < 0,05$.

5. VÝSLEDKY

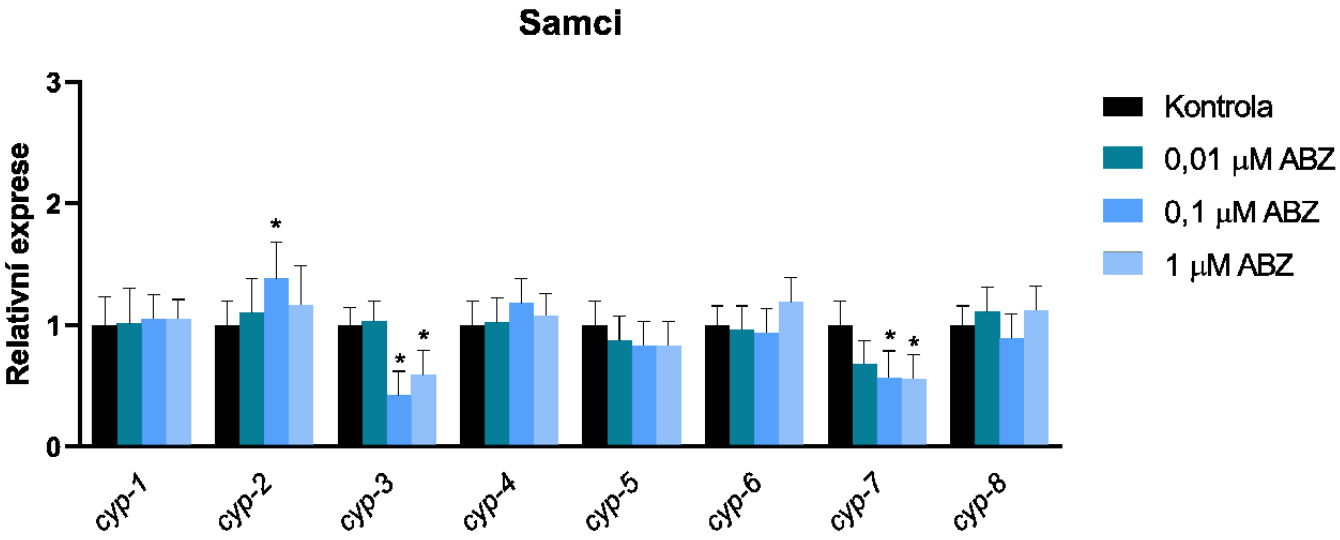
5.1 Exprese vybraných genů

Graf 1 znázorňuje expresi vybraných genů cytochromů P450 u samic *H. contortus* po 4-hodinové inkubaci s albendazolem (ABZ). Byla porovnána hladina exprese mRNA červů ovlivněných ABZ ve třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrolním neovlivněným vzorkům. K signifikantní změně došlo pouze u genu *cyp-2*, jehož exprese byla při koncentraci 0,01 µM ABZ oproti kontrole snížena.



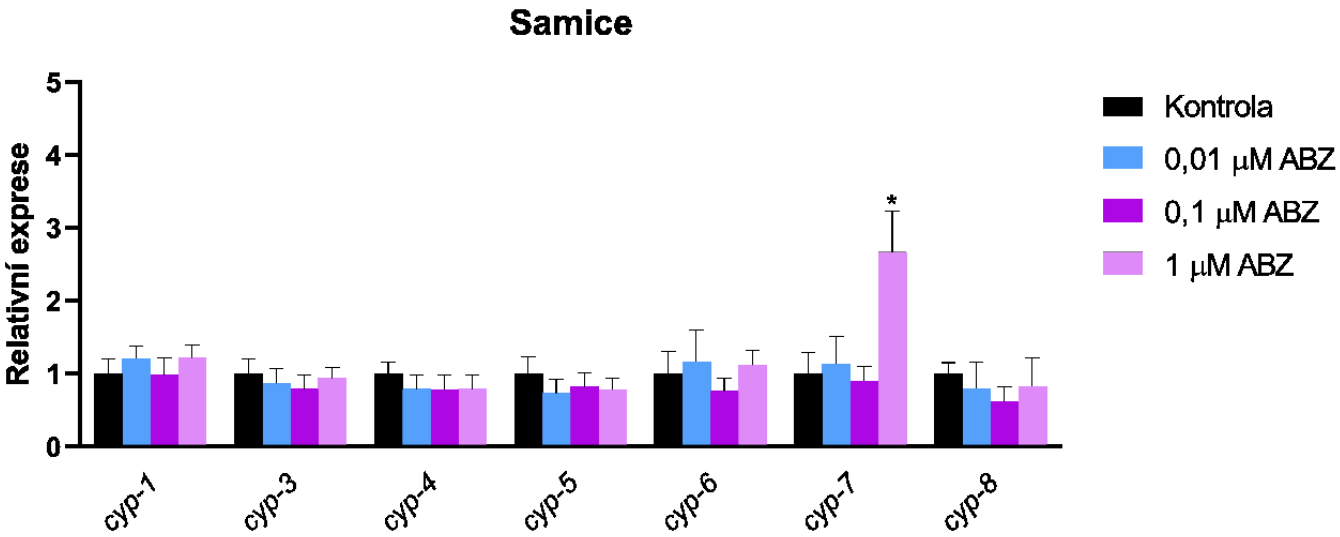
*Graf 1 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samic H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

Na grafu 2 jsou znázorněny výsledky relativní exprese CYPů u samců *H. contortus* inkubovaných s albendazolem po dobu 4 hodin. Zde byla exprese genů ovlivněna více než u samic. Gen *cyp-2* byl mírně, ale signifikantně indukován (0,4 x) expozicí 0,1 µM ABZ. Naopak, u genů *cyp-3* a *cyp-7* došlo ke snížení hladiny exprese mRNA. Gen *cyp-3* byl změněn oproti kontrole 0,4 x při expozici 0,1 µM ABZ a 0,6 x při 1 µM ABZ a gen *cyp-7* 0,4 x při 0,1 µM a 1 µM ABZ.

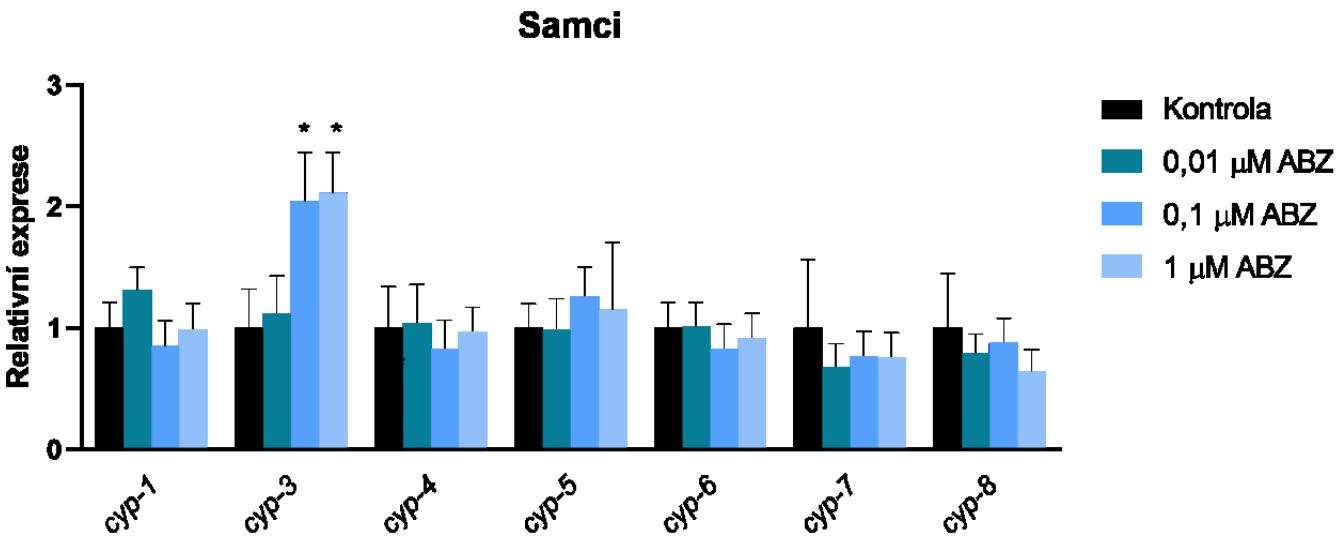


*Graf 2 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samců H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

Při 12-hodinovém ovlivnění ABZ byla exprese některých genů CYP výraznější než u předchozích výsledků (graf 3, graf 4). U dospělců samic *H. contortus* došlo k indukci genu *cyp-7* (1,7 x) expozicí 1 µM ABZ. U samců byla zvýšená exprese genu *cyp-3* 1 x při 0,1 µM a 1,1 x při 1 µM ABZ. Další signifikantní změny nebyly zaznamenány.

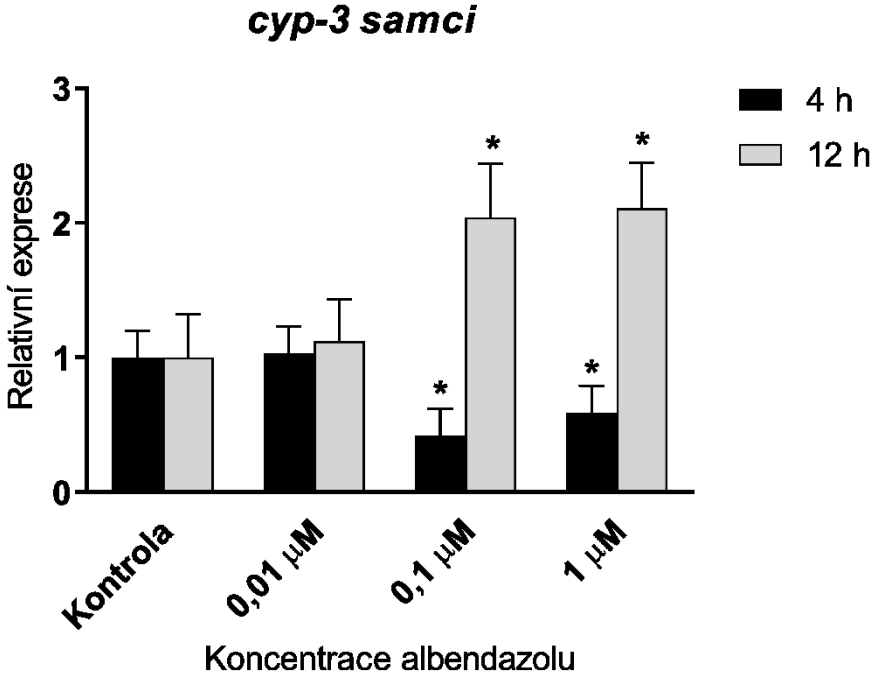


*Graf 3 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samic H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*



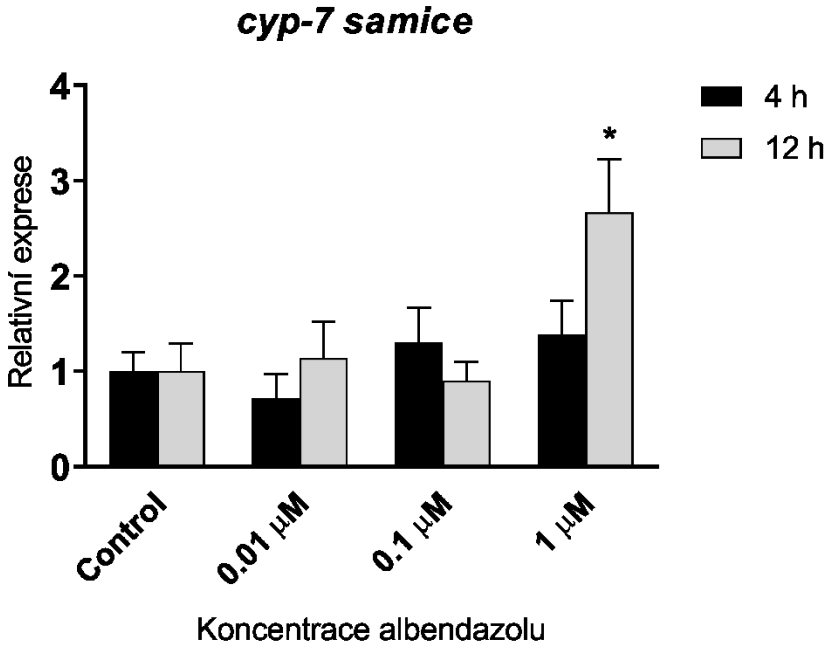
*Graf 4 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samců H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

V grafu 5 byla porovnána relativní exprese genu *cyp-3* s rozdílnou dobou expozice ABZ, a to po 4 hodinách a 12 hodinách u dospělých samců H. contortus. Za zajímavý můžeme pokládat výsledek exprese mRNA *cyp-3* po ovlivnění 0,1 µM a 1 µM ABZ, kdy jsou signifikantní změny exprese genu protichůdné.



*Graf 5 - Porovnání relativní exprese genu cyp-3 u samců H. contortus po 4 h či 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) a kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

I v případě dalšího porovnání na grafu 6 byla porovnávána exprese genu *cyp-7* u dospělých samic *H. contortus* po 4-hodinové a 12-hodinové expozici ABZ. Po ovlivnění 1 μM ABZ došlo ke zvýšení hladiny mRNA genu *cyp-7*, signifikantní změna nastala pouze po 12-hodinovém ovlivnění ABZ.



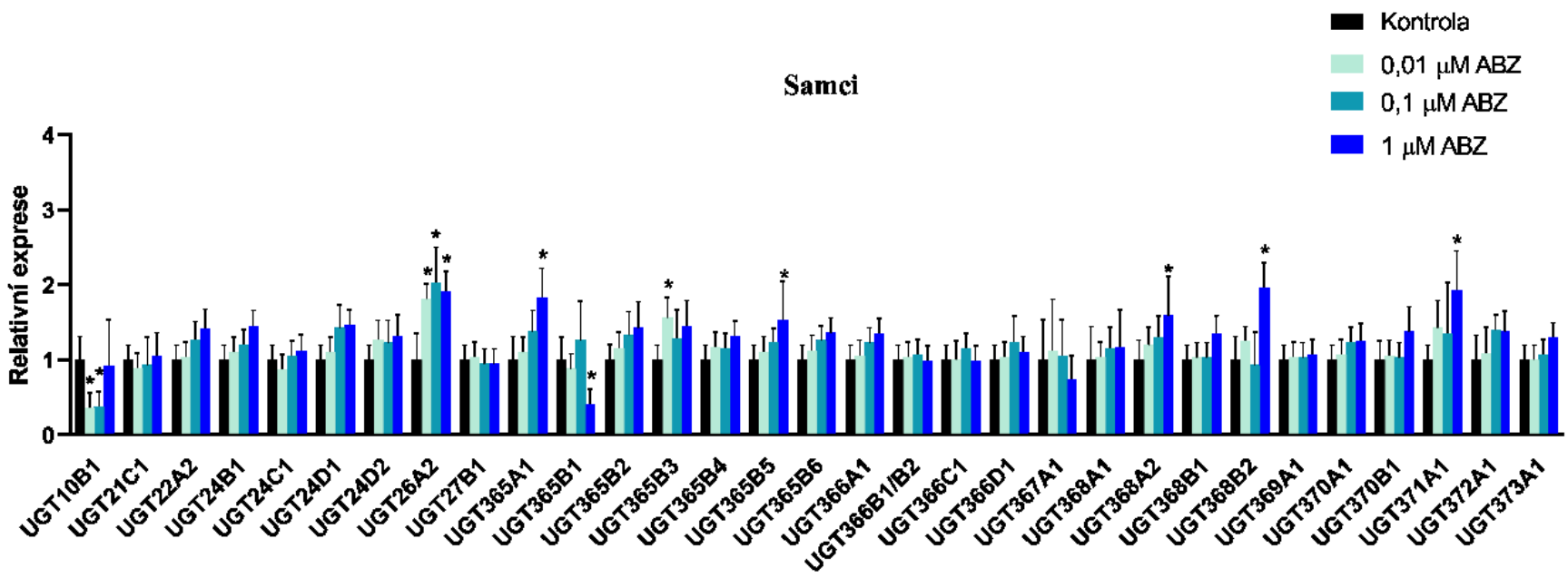
*Graf 6 - Porovnání relativní exprese genu cyp-7 u samic H. contortus po 4 h či 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM) a kontrole (0 μM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

Relativní expresi vybraných genů UGT u samců *H. contortus* ovlivněných ABZ po dobu 4 hodin znázorňuje graf 7, na kterém je zřejmé více signifikantních změn, z nichž nejvýznamnější je indukce genu *UGT26A2* ve všech třech koncentracích téměř na dvojnásobek. Dále došlo ke zvýšení hladiny mRNA u genů *UGT365A1*, *UGT365B3*, *UGT365B5*, *UGT368A2*, *UGT368B2* a *UGT371A1*. Naopak inhibovaný byl gen UGT10B1 při expozici 0,01 µM a 0,1 µM ABZ a UGT365B1 při 1 µM ABZ.

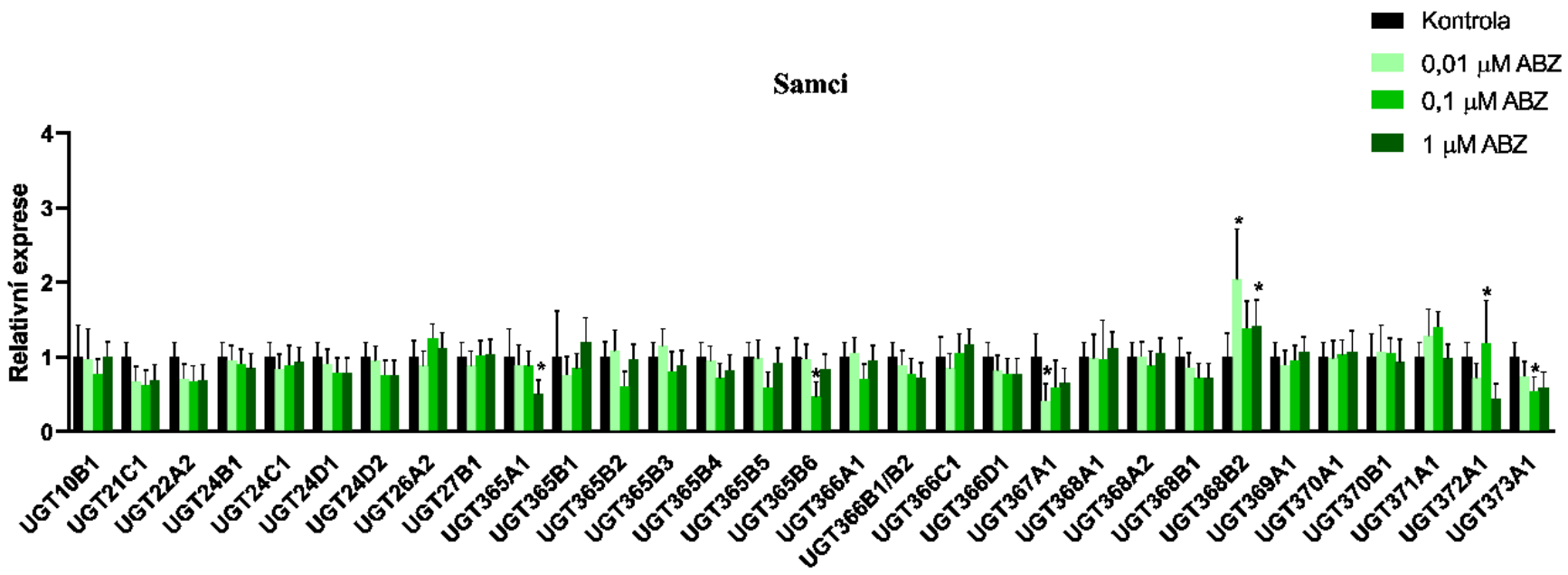
Na grafu 8 je znázorněna relativní exprese genů UGT u samců *H. contortus* po 12-hodinové expozici ABZ. Ke zvýšené expresi došlo u genu *UGT38B2* (1 x a 0,4 x) při 0,01 µM a 1 µM ABZ a u genu *UGT372A1* (0,6 x) po expozici 0,1 µM ABZ. Opačná změna exprese mRNA byla zaznamenána u genů *UGT365A1*, *UGT365B6*, *UGT367A1* a *UGT373A1*.

Nejvýznamnější změna v expresi mRNA u vybraných genů UGT byla zaznamenána u samic *H. contortus* ovlivněných ABZ po dobu 4 hodin, znázorněná na grafu 9. Oproti samcům nedošlo k žádné inhibici, ovšem k indukci došlo u genu UGT365A1 1,8 x při nejnižší koncentraci ABZ a 2,2 x při 0,1 µM ABZ. U genu UGT367A1 došlo též k velmi výrazné změně oproti kontrole u všech tří koncentrací. Po expozici 0,01 µM ABZ 3,3 x, při 0,1 µM dokonce 6,5 x a při 1 µM 3 x.

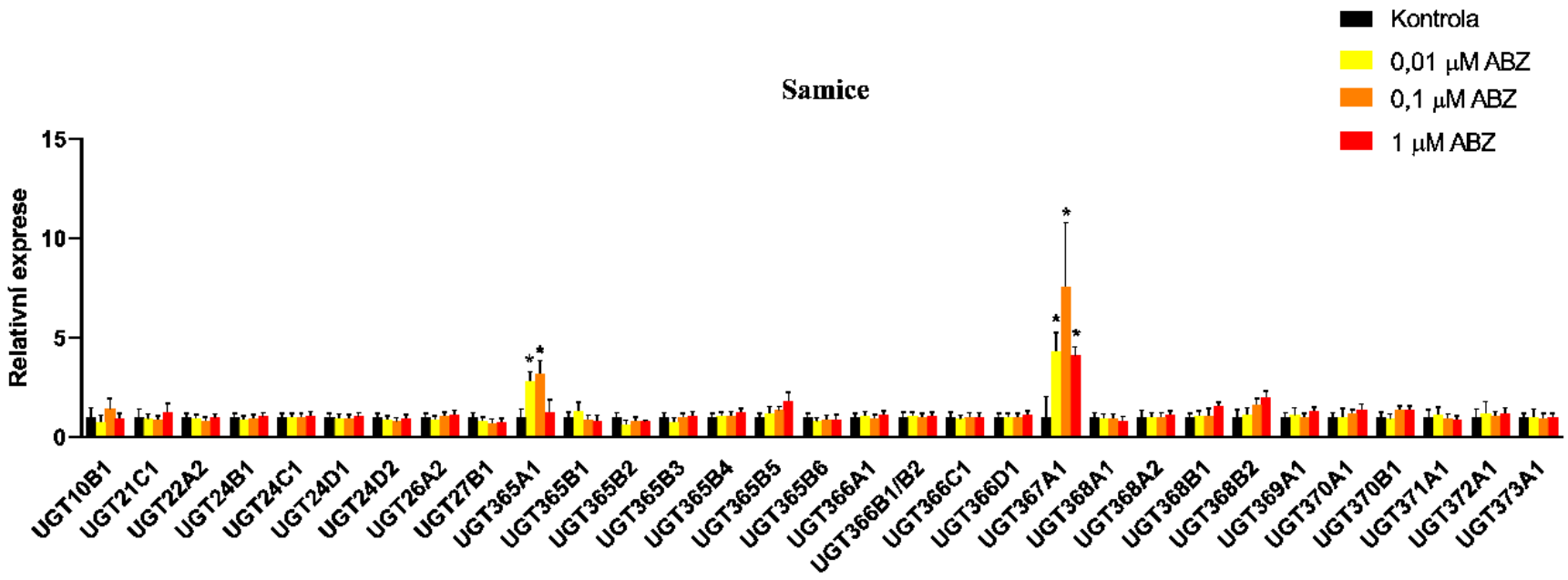
Graf 10, kde jsou vyobrazeny výsledky exprese genů UGT samic *H. contortus*, ovlivněných ABZ po dobu 12 hodin je velmi podobný předešlému. Zde došlo k indukci stejného genu *UGT367A1* též ve všech třech koncentracích. Po expozici 0,01 µM ABZ 2,7 x, při 0,1 µM 3 x a při 1 µM 2,7 x. U genu UGT10B1 nastala změna v expresi mRNA (0,9 x) po ovlivnění 1 µM ABZ.



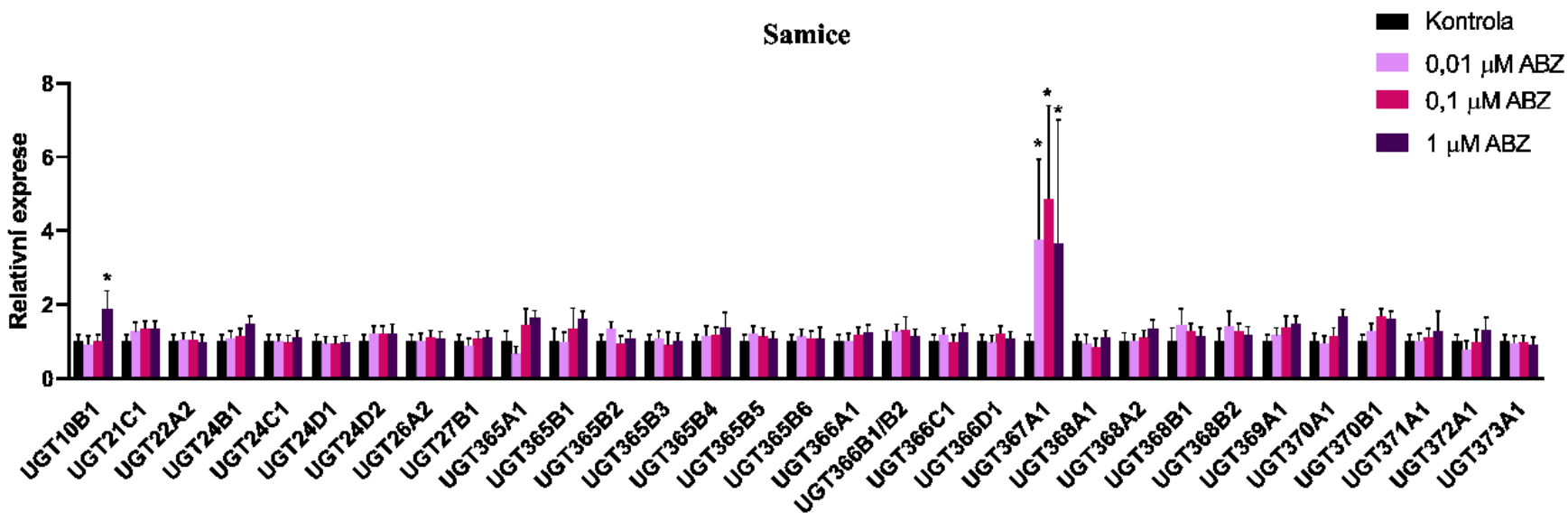
*Graf 7 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas (UGT) (UGT) u samců H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*



*Graf 8 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas(UGT) u samců H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM) vůči kontrole (0 μM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*



*Graf 9 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas(UGT) u samic H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*



*Graf 10 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas (UGT) u samic H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05)*

6. DISKUSE

Stále se rozvíjející rezistence nematody *H. contortus* je dána častým a nesprávným užitím anthelmintik. Mezi rizikové faktory vzniku rezistence patří vystavení parazita sub-letálním dávkám léčiva. Rezistence *H. contortus* na benzimidazolová anthelmintika byla prokázána v mnoha studiích. Hlavním mechanismem je výskyt jednonukleotidových polymorfismů v kodonech genu pro β-tubulin, které mění jeho trojrozměrnou strukturu a brání tak vazbě benzimidazolu k cílovému místu (Stuchlíková et al. 2018). Nicméně ke vzniku rezistence přispívá více mechanismů, například vyšší exprese genů biotransformačních enzymů a jejich vyšší metabolická aktivita (Kellerová et al. 2019 Matoušková et al. 2018, Stuchlíková et al. 2018, Vokřál et al. 2013).

Nematoda mají poměrně velké množství biotransformačních enzymů, které jsou zodpovědné za detoxikaci xenobiotik včetně anthelmintik. Tyto enzymy tak do určité míry chrání helminta před jejich toxickými účinky. Z toho důvodu je možné se domnívat, že zvýšená exprese, resp. aktivita těchto enzymů může přispívat k rezistenci helmintů (Kellerová et al. 2019). Porovnání metabolismu benzimidazolových léčiv u *H. contortus* mezi kmenem ISE (citlivým vůči všem anthelmintikům) a kmenem IRE (rezistentním na benzimidazolová anthelmintika) ve studii Stuchlíkové et al. (2018) ukazuje, že dospělci rezistentního kmene IRE jsou schopni z anthelmintik tvořit více metabolitů I. i II. fáze biotransformace než dospělci kmene ISE. Hlavními metabolickými přeměnami anthelmintik u *H. contortus* byly oxidace a glykosidace, proto je možné se domnívat, že právě biotransformační enzymy katalyzující oxidační reakce (např. CYP) a glykosidace (UGT) by mohly hrát roli v lékové rezistenci u *H. contortus* (Stuchlíková et al. 2018).

Cílem naší práce bylo sledovat změny v relativní expresi mRNA vybraných genů kódujících biotransformační enzymy CYP a UGT u dospělců *H. contortus* citlivého kmene ISE po inkubaci se sub-letálními dávkami albendazolu. První část byla zaměřena na expresi CYP genů, u kterých bylo již dříve prokázána indukce genové exprese sub-letálními dávkami široce využívaného léčiva ivermektinu (IVM), anthelmintika z třídy makrocyklických laktonů (Kellerová et al. 2019). V souvislosti s albendazolem jsou CYP zodpovědné za jeho oxidaci a přeměnu na ABZ-SO a ABZ-SO2 (Stuchlíková et al. 2018). Dospělci *H. contortus* kmene ISE byly vystaveni třem různým dávkám ABZ (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM). Výsledky relativní exprese byly normalizovány pomocí referenčního genu GAPDH a vztaženy ke kontrole (0 μM ABZ).

Výrazná změna exprese nastala v genu *cyp-7* u samic *H. contortus* po expozici 1 μM ABZ. K výraznější indukci (1,7 x) došlo po 12-hodinové expozici ABZ, což může naznačovat přímou souvislost mezi dobou expozice červa ABZ a expresí genu. U samců *H. contortus* byla exprese tohoto genu po 4 h ovlivňování naopak snížena. Ve studii Kellerové et al. (2019) také došlo k indukci *cyp-7* po ovlivnění *H. contortus* sub-letálními dávkami IVM.

Významné rozdíly byly pozorovány v expresi genu *cyp-3* u samců *H. contortus* mezi oběma dobami expozice ABZ. U dvou nejvyšších koncentrací ABZ (0,1 μM a 1 μM) byly výsledné signifikantní změny relativní exprese genu protichůdné. Po 4hodinové expozici ABZ byla zjištěna snížená exprese, po 12 hodinách naopak výrazná indukce. Exprese *cypu-3* byla zvýšena i v předchozí studii po ovlivnění 100 nM IVM (Kellerová et al. 2019).

Účast UGT na rezistenci helmintů vůči ABZ ukazuje i studie Vokřála et al. (2013), ve které dospělci *H. contortus* rezistentní na léčivo generovali významně vyšší hladiny konjugátů ABZ s glukózou. Ve studii Matouškové et al. (2018) byla porovnávána exprese vybraných UGT ISE kmene *H. contortus* se dvěma rezistentními kmeny IRE a WR. Konstitutivní exprese genu UGT368B2 byla výrazně vyšší u obou rezistentních kmenů. Je možné se domnívat, že tento gen může přispívat k rezistenci. V souvislosti s naší studií vyšla relativní exprese genu UGT368B2 též zvýšená, a to u samců *H. contortus* po 4-hodinové i 12-hodinové expozici ABZ (1 μM). Částečně shodný výsledek nastal i u genu UGT371A1, který byl ve studii (Matoušková et al. 2018) zvýšen u samců *H. contortus* rezistentních kmenů. V této práci byl signifikantně zvýšen u samců po 4 hodinách expozice 1 μM ABZ. Za zmínku stojí i výrazná indukce genu UGT26A2, která nastala po 4-hodinové expozici samců *H. contortus* ABZ ve všech třech koncentracích.

Za významný výsledek můžeme považovat zvýšení transkripce genu UGT367A1 u samic *H. contortus* po 4 i 12-hodinové expozice ABZ. Jelikož ve všech třech koncentracích ABZ (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM) byla zaznamenána signifikantní změna, lze se domnívat, že zvýšená exprese tohoto genu může souviset s rozvojem rezistence na ABZ u samic *H. contortus*.

Celkově byly zaznamenány výrazné rozdíly v relativní expresi CYP i UGT mezi pohlavími. Velké rozdíly mezi pohlavími byly patrné i v odpovědích na expozici ABZ. Tyto výsledky podtrhují význam provádění experimentů na oddělených samcích a

samicích. Vzhledem k rozdílům v odpovědích na ABZ podle doby expozice je zřejmé, že při těchto typech experimentů je třeba sledovat expresi v několika časových intervalech.

Otázkou stále zůstává, nakolik je rezistence na léčivo spojená se signifikantními změnami exprese biotransformačních enzymů. Pro odpověď na tuto otázku je zapotřebí dalších studií například porovnání indukce genů citlivého kmene ISE s rezistentním kmenem IRE. Možnost vzniku rezistence v souvislosti se sub-letálními dávkami léčiva zmiňuje pouze studie Kellerová et al. (2019) a tato práce. S ohledem na výsledky je zapotřebí v tomto tématu pokračovat a studii nadále rozšiřovat.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zmapování změn v expresi vybraných genů kódujících biotransformační enzymy CYP a UGT u dospělců *Haemonchus contortus* citlivého kmene ISE po inkubaci se sub-letálními dávkami ABZ.

V souvislosti se zjištěnými výsledky můžeme říci, že sub-letální dávky ABZ významně ovlivnily expresi některých genů. Signifikantní změny nastaly u genu *cyp-3* u samců a *cyp-7* u samic *H. contortus*. Indukce těchto genů byla výraznější po 12-hodinové expozici ABZ. Ještě více signifikantních změn nastalo v hladinách relativní exprese UGT. Za nejvýraznější lze považovat indukce genů UGT365A1, UGT367A1 u samic a UGT36A2, UGT368B2 a UGT371A1 u samců *H. contortus*.

Za velmi významnou považuji zvýšenou hladinu exprese genu UGT367A1, která byla velmi výrazná po 4 i 12 hodinách expozice všech tří koncentrací ABZ (0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM). Lze se domnívat, že tento gen je indukovatelný léčivy a může souviset s rozvojem rezistence na ABZ u samic *H. contortus*.

V předkládané práci byla taktéž potvrzena hypotéza o rozdílech mezi pohlavími jak v konstitutivní expresi genů CYP a UGT, tak i v odpovědích na ABZ.

Výsledky této studie jsou zahrnuty v publikaci Kellerové et al. (2020).

8. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	Význam zkratky	Český význam
ABC	*ATP binding cassette*	ATP-vazebné kazetové transportéry
ABZ	*albendazole*	albendazol
ABZ-SO	*albendazole sulphoxide*	albendazol sulfoxid
ABZ-SO_2	*albendazole sulphone*	albendazol sulfon
AKR	*aldo-keto reductase*	aldo-keto reduktasy
cDNA	*complementary DNA*	komplementární DNA
C_T	*cycle of treshold*	cyklus, kdy dochází k nárůstu flourescence nad práh pozadí
CYP	*cytochrome P450*	cytochrom P450
ddH_2O	*double-distilled water*	redestilovaná voda
DEPC	*diethylpyrocarbonate*	diethylpyrokarbonát
DEPC H_2O	*diethylpyrocarbonate treated watter*	redestilovaná voda ošetřená 0,1 % diethylpyrokarbonátem
DMSO	*dimethylsulfoxid*	dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid*	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	*double-stranded DNA*	dvouvláknová DNA
dNTPS	*deoxynucleotides*	směs deoxynukleotidů
DTT	*dithiotreitol*	dithiotreitol
EDTA	*ethylenediaminetetraacetic acid*	kyselina ethylendiamintetraoctová
GABA	*gamma aminobutyric acid*	kyselina gama-aminomáselná
GAPDH	*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GST	*glutathione S-transferases*	glutathion-S-transferasy
IRE	*inbred resistant Edinburgh strain*	---

ISE	*Inbred suspectible Edinburgh*	---
MATE	*Multi-drug and toxic compound extrusion*	transportéry více léčiv a toxických sloučenin
MFS	*major facilitator superfamily*	transportéry superrodiny hlavních sprostředkovatelů
P	*p-value*	hladina významnosti
PBS	*Phosphate Buffered Saline*	pufrovaný fosfátový fyziologický roztok
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	*ribonucleic acid*	ribonukleová kyselina
RND	*resistence nodulation division*	transportéry ondulačního dělení
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*	RPMI medium
SD	*standard deviation*	směrodatná odchylka
SDR	*short-chain dehydrogenases/reductases*	reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem
SG	*SYBR Green*	SYBR Green
SMR	*small multi-drug resistence proteins*	malé transportéry multidrogové rezistence
T_a	*annealing temperature*	teplota nasedání primerů
UDP	*uridine diphosphate*	uridindifosfát
UGT	*UDP-glucuronosyltransferase/glucosyltransferase*	UDP-glukurunosyltransferasa/glukosyltransferasa
UV	*ultraviolet*	ultrafialové (záření)
WR	*white river*	---

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Rozložení vzorků pro inkubaci 26
Tabulka 2 - Koncentrace vzorků ovlivněných ABZ po dobu 4 hodin 30
Tabulka 3- Koncentrace vzorků ovlivněných ABZ po dobu 12 hodin 31
Tabulka 4 – Rozpis jednotlivých reagencií použitých pro reverzní transkripci 32
Tabulka 5 - Jednotlivé komponenty pro qPCR.....36

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Příčný řez hlísticí 10
Obrázek 2 - Základní morfologie hlístic.....10
Obrázek 3 - Vzorec albendazolu.....15
Obrázek 4 - Metabolismus albendazolu 20
Obrázek 5 - Rozdělení fází po centrifugaci 27
Obrázek 6 – Peleta.....28
Obrázek 7 - Sondy SYBR Green 33
Obrázek 8 - Amplifikační křivka 35

11. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samic H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05) 38
Graf 2 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samců H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05) 39
Graf 3 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samic H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05) 40
Graf 4 - Porovnání relativní exprese vybraných genů cytochromů P450 (CYP) u samců H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05) 40
Graf 5 - Porovnání relativní exprese genu cyp-3 u samců H. contortus po 4 h či 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) a kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05).....41
Graf 6 - Porovnání relativní exprese genu cyp-7 u samic H. contortus po 4 h či 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) a kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05).....42
Graf 7 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas (UGT) (UGT) u samců H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05) 44
Graf 8 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas(UGT) u samců H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05).....45
Graf 9 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas(UGT) u samic H. contortus po 4 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05).....46
Graf 10 - Porovnání relativní exprese vybraných genů UDP-glukosyltransferas (UGT) u samic H. contortus po 12 h expozici ABZ o třech koncentracích (0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM) vůči kontrole (0 µM ABZ). n=4; * signifikantní změna (P < 0,05).....47

12. POUŽITÁ LITERATURA

Addiss D.G., Beach M.J., Streit T.G., Lutwick S., Leconte F.H., Lafontant J.G., Hightower A.W., Lammie P.J. Randomised placebo-controlled comparison of ivermectin and albendazole alone and in combination for Wuchereria bancrofti microfilaraemia in Haitian children. Lancet 1997, 350/480–484

Allonby E.W., Urquhart G.M. The epidemiology and pathogenic signifikance of haemonchosis in a merino flock in East Africa. Veterinary Parasitology 1975, 1/129-143

Al-Zubaidy A.J., Altaif K.I., Al-Qaisy H.H.K., Makkawi T.A. Gross pathology and histopathology of haemonchosis in sheep and goats in Iraq. Veterinary Parasitology 1987, 23/249-256

Aremu A.O., Finnie J.F., Van Staden J. Potential of South African medicinal plants used as anthelmintics – Their efficacy, safety concerns and reappraisal of current screening methods. South African Journal of Botany 2012, 82/134-150

Baron S. Medical Microbiology 4th edition. Galveston, University of Texas 1996

Bloom A. K., Ryan E.T. Albendazole. Hunter´s Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease 2013, 1088-1089

Garcia H.H. Antiparasitic drugs in neurocysticersosis: albendazolem or praziquantel? Expert Review of Anti-Infective Therapy 2008, 6/295-298

Getachew T., Dorchies P., Jacquiet P. Trends and challenges in the effective and sustainable control og Haemonchus contortus infection in sheep. Parasite 2007, 14/3-14

Gyapong J.O., Kumaraswami V., Biswas G., Ottesen E.A. Treatment strategies underpinning the global programme to eliminate lymphatic filariasis. Expert Opinion on Pharmacotherapy 2005, 6/179–200

Hoberg E.P., Zarlenga D.S. Evolution and Biogeography of Haemonchus contortus: Linking Faunal Dynamics in Space and Time. Adv Parasitol 2014, 93/1-30

Horák P., Scholz T. Biologie hemintů. Karolinum, Praha 1998. ISBN: 80-7184-782-8

Idris O.A., Wintola O.A., Afolayan A.J. Helminthiases; prevalence, transmission, host-parasite interactions, resistence to common synthetic drugs and treatment. Heliyon 2019

Issouf M., Guégnard F., Koch C., Le Vern Y., Blanchard-Letort A., Che H., Beech R.N., Kerboeuf D., Neveu C. Haemonchus contortus P-glycoproteins interact with host eosinophil granules: a novel insight into the role of ABC transporters in host-parasite interaction. PLoS One 2014, 3/9(2)

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

Ježková T. Slezová červivost malých přežvýkavců. Dostupné online [13.2.2017] [cit.11.3.2020] Dostupné z: https://zverolekarka.com/slezova-cervivost-malych-prezvykavcu/

Kellerová P., Matoušková P., Lamka J., Vokřál I., Szotáková B., Zajíčková M., Pasák M., Skálová L. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in Haemonchus contortus female and male adults. Veterinary Parasitology 2019, 273/24-31

Kočárek E. Molekulární biologie v medicíně. NCO NZO 2007, Brno. ISBN 978-80-7013-450-4

Kotze A.C., Prichard R.K. Chapter Nine - Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. Advances in Parasitology 2016, 93/397-428

Kotze A.C., Ruffell A.P., Ingham A.B. Phenobarbital Induction and Chemical Synergism Demonstrate the Role of UDP-Glucuronosyltransferases in Detoxification of Naphthalophos by Haemonchus contortus Larvae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2014, 58/7475-7483

LabGuide – Průvodce laboratoří [online]. [cit.5.1.2020]. Dostupné na: https://labguide.cz/

Lanusse C., Canton C., Virkel G., Alvarez L., Costa-Junior L., Lifschitz A. Strategies to Optimize the Efficacy of Athelmintic Drugs in Ruminants. Trends in Parasitology 2018, 34/664-682

Leathwick D.M., Besier R.B. The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—Strategies and experiences. Veterinary Parasitology 2014, 204/44-54

Lecová L., Růžička M., Laing R., Vogel H., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Vokřál I., Skálová L., Matoušková P. Reliable reference gene selection for qiantitative real time PCR in Haemonchus contortus. Molecular and Biochemical Parasitology 2015, 201/123-127

Li X., Zhu B., Gao X., Liang P. Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in Plutella xylostella (L.). Pest Manag Sci 2017, 73/1402-1409

Logan J., Logan J.M.J., Edwards K.J., Saunders N.A. Real-time PCR: Current Technology and Application. Caister Academic Press 2009. ISBN: 1904455395

Maddison J., Page S., Church D. Small Animal Clinical Pharmacology. Druhé vydání 2008. ISBN: 9780702028588

Manke M.B., Dhawale S.C., Jamkhande P.G. Helminthiasis and medicinal plants: a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2015, 5/175-180

Matoušková P., Vokřál I., Lamka J., Skálová L. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzyme Deactivation and Rezistance in Helmints. Trends in Parazitology 2016, 32/481-491

Matoušková P., Lecová L., Laing R., Dimunová D., Vogel H., Raisová Stuchlíková L., Nguyen L.T., Kellerová P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Várady M., Skálová L. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis,

constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2018, 8/420-429

MSD Veterinary manual – Benzimidazoles [cit.17.3.2020]. Dostupné z: https://www.msdvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/benzimidazoles

MSD Veterinary manual – Macrocyclic laktones [cit.19.3.2020]. Dostupné z: https://www.msdvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/macrocyclic-lactones

MSD Veterinary manual – Mechanisms of action of Anthelmintics [cit.17.3.2020]. Dostupné z: https://www.msdvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/mechanisms-of-action-of-anthelmintics

MSD Veterinary manual – Pharmacokinetics of anthelmintics [cit.19.3.2020]. Dostupné z: https://www.msdvetmanual.com/pharmacology/anthelmintics/pharmacokinetics-of-anthelmintics

Preston S., Jabbar A., Gasser R.B. A perspective on genomic-guided anthelmintik Discovery and repurposing using Haemonchus contortus. Infection, Genetics and Evolution 2016, 40/368-373

Prichard R.K. Mechanisms of anthelmintik resistence: implications fot the future of parasite control. Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária 2008, 15/62-68

Raisová Stuchlíková L., Matoušková P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Sečkařová A., Dimunová D., Nguyen L.T., Várady M., Skálová L. 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: Drugs and Drug Resistance 2018, 8/50-58

Roberts L.S., Janovy J. Gerald D. Schmidt and Larry S. Robert´s Foundations of Parasitology. McGraw-Hill 2009, New York. ISBN: 978-0-07-302827-9

Ruano Z.M., Carolino N., Mateus T.L. Gastrointestinal parasites as a threat go grazing sheep. Large Animal Review 2017, 23/231-238

Rufener L., Mäser P., Roditi I., Kaminsky R. Haemonchus contortus Acetylcholine Receptors of the DEG-3 Subfamily and Their Role in Sensitivity to Monepantel. PLoS Pathogens 2009

Ryšavý B. et al. Helminti vodní drůbeže: klíč k určení, morfologie, biologie, laboratorní diagnostika. Academia 1982, Praha

Sendow J. Haemonchus contortus [online]. Animal Diversity Web [cit.4.3.2020] Dostupné z: https://animaldiversity.org/site/accounts/information/Haemonchus_contortus.html

Slabý O. et al. Molekulární medicína. Galén 2015, Praha. ISBN: 978-80-7492-121-6

Taman A., Azab M. Present-day anthelmintics and perspectives on future new targets. Parasitology Research 2014, 113/2425-2433

Van Wyk J.A., Gerber H.M., Groeneveld H.T. A technique fot the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. Onderstepoort J. Vet. Res. 1980 47/147-158

Vokřál I., Bártíková H., Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubíček V. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. Parasitology 2012, 139/1309-1316

Vokřál I., Jirísko R., Stuchlíková L., Bártíková H., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Skálová L. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics. Veterinry Parasitology 2013, 196/373-381

Zajac A. White eyes and Bottle Jaw: Are There Zebras? American Consortium for Small Ruminant Parasite Control 2016 [online]. [cit.11.3.2020]. Dostupné z: https://www.wormx.info/zebra

Zajíčková M., Nguyen L.T., Skálová L., Raisová Stuchlíková L., Matoušková P. Anthelmintics in the future: current trends in the Discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. Drug Discovery Today 2020, 25/430-437

Zoologie pro veterinární mediky, Fakulta veterinární hygieny a epidemiologie [online]. [cit.18.2.2020].
Dostupné z: http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200209%20hlistice/hl%C3%ADstice.html

13. PŘÍLOHY

Příloha 1 – Tabulka primerů pro qPCR

Název genu	WORM BASE (PRJEB506)		Sekvence primeru	Velikost produktu	Účinnost [%]	Zdroj
	Aktuální označení genu	Bývalé označení genur				
cyp-1	HCON_00143950	HCOI00816200	F: TGGCAAGTTGAAGAAGGTAGAAG R: GCCAGTCCTTCTCCTAGACATTG	75	93	Kellerová et al. 2019
cyp-2	HCON_00141020	HCOI00284400	F: GTCTCTCCACTTTGATCGCAA R: CAGAAGATGAGCAAGAACAAGC	181	98	Kellerová et al. 2019
cyp-3	HCON_00022670	HCOI00383700	F: TCGGTCAATGTACAGCTGGC R: CCTGTCATGTATCGGTCCGG	89	92	Kellerová et al. 2019
cyp-4	HCON_00084620	HCOI02017000	F: ATCGATCAGTGGGCTTTGCA R: ACACATTGCCTTGGACCCAA	140	95	Kellerová et al. 2019
cyp-5	HCON_00038960	HCOI01579500	F: AGCTGTGCATACTGTCAACGA R: TCTCCTTCACCGAATTTGTTGT	93	100	Kellerová et al. 2019

cyp-6	HCON_00024010	HCOI01920700	F: GGTCTTGCCTTGTTGTTCGAR: GACAAGATCACCTAGCACTGGA	102	102	Kellerová et al. 2019
cyp-7	HCON_00045430	HCOI00165400	F: GCGAATATCCCACTGCCTGA R: ACCGGAAAACCAAGTGAGGG	53	107	Kellerová et al. 2019
cyp-8	HCON_00022640	HCOI00383400	F: TGGAATGTGAATTGGCCGTT R: CGGAGTTCAGTGGCTTCATC	64	105	Kellerová et al. 2019
UGT10B1	HCON_00104220	HCOI01037200	F: TCAACTTGCAATCACCCACG R: CTGAGAGCGGGATGAGGTAG	147	104	Matoušková et al. 2018
UGT21C1	HCON_00119360	HCOI01817600	F: GCCGTGCTGCTGAATTGAAT R: CGTCTGGATTATCACGAAGAGAG	69	97	Matoušková et al. 2018
UGT22A2	HCON_00135760	HCOI00058000	F: GATCTCTGTGGAATCGGCGT R: TATGAAGGTGGTGCTGGGAC	119	100	Matoušková et al. 2018
UGT24B1	HCON_00126565	HCOI00244800	F: ACGTACACCTATTCCAATGGCT R: CCTTGGTTTTGGGGTGTTGAAG	60	106	Matoušková et al. 2018
UGT24C1	HCON_00122990	HCOI00868700	F: GGATCCGAGACATAGGCAGC R: ACAGTGAGTTTGCATCCCTC	69	93	Matoušková et al. 2018
UGT24D1	HCON_00126560	HCOI01592800	F: GAGTAGCAGAGACGTTGGCA R: TCCCGAAATCATCACCATCGT	59	100	Matoušková et al. 2018

UGT24D2	HCON_00127680	HCOI00244900	F: GATCAGTCGCTCCCAGTCAC R: TGGGTGGCAATCGATCTTTCA	132	90	Matoušková et al. 2018
UGT26A2	HCON_00092310	HCOI01238200	F: GGGCCTGGTTGTCTTCTCTC R: TGTTTCAGTGGGATCGCCTC	156	99	Matoušková et al. 2018
UGT27B1	HCON_00132780	HCOI01933800	F: TGTGATGGTTTCGGAATGGA R: AGCACGGTTTTCTCATCAAGA	60	100	Matoušková et al. 2018
UGT365A1	HCON_00125590	HCOI01462600	F: GCTAGCTACGTTCCAGGAGC R: CAGACGCTCAAAGGTGTTCA	63	92	Matoušková et al. 2018
UGT365B1	HCON_00125530	HCOI01462400	F: GCTTGCCAAACACGGTACTG R: GAATATCCTTCTCAGAGAGTCCC	139	88	Matoušková et al. 2018
UGT365B2	HCON_00125570	HCOI01461700	F: ACGACGATGAGCTAATGAAACA R: ACCGCTGAGAATACACCAATTG	133	100	Matoušková et al. 2018
UGT365B3	HCON_00125540	HCOI01461900	F: TCATTCGGTTCAGCAATCAAGG R: CGAAGACTTCCAGAAAATTCCTCT	70	100	Matoušková et al. 2018
UGT365B4	HCON_00125545	HCOI01462000	F: TTCACAAAACCATCCCGCTC R: CGGCATGTAGATTGATTTAGCCA	149	100	Matoušková et al. 2018
UGT365B5	HCON_00125560	HCOI01462200	F: CTTGGTGGAATCGCGGTCTA R: TTTTGAGGTGCCCATGTGGT	269	100	Matoušková et al. 2018

UGT365B6	HCON_00125550	HCOI01462100	F: TCCAAGTTATGTTCCAGGGCAT R: AGTTCTTCATAATCCTTGAACCGC	177	100	Matoušková et al. 2018
UGT366A1	HCON_00121110	HCOI02015300	F: GCAGCCTTTGATGAGCACAC R: GGCCCACTTGAATGAGACGA	68	100	Matoušková et al. 2018
UGT366B1/B2	HCON_00121182	HCOI00320100	F: GGCGATCAAATAAGGAATGCG R: ATCTGGGATTGTTGAGAACTAGG	127	100	Matoušková et al. 2018
UGT366C1	HCON_00121250	HCOI01255100	F: TTATGCCAGCCTCTCTCGGT R: CACTTGCGATGCCTGTCTG	111	100	Matoušková et al. 2018
UGT366D1	HCON_00121240	HCOI01255000	F: CGGGAAGCCATTGATCGAGT R: TGAAAGGACGTCGCGCTAAT	88	100	Matoušková et al. 2018
UGT367A1	HCON_00165360	HCOI00538800	F: AGCGAACTCTGGCCTTCATC R: TCCGCGAACAATGGTATGGT	97	100	Matoušková et al. 2018
UGT368A1	HCON_00040966	HCOI01078900	F: GGAGTTCCCACCAATCCCAG R: CGTTCACGTTCAGGAGGACA	229	100	Matoušková et al. 2018
UGT368A2	HCON_00040964	HCOI01452100	F: TCGGCCAACAGCAAACATTG R: GTATTGGGGAACGCGGAGAA	210	100	Matoušková et al. 2018
UGT368B1	HCON_00040962	HCOI00785300	F: TGGGAAGAAAAATTGAGGCAGTT R: TGTTTCAGCAGCTTCCTTAAATCA	74	100	Matoušková et al. 2018

UGT368B2	HCON_00040960	HCOI00785400	F: CAGTGGGAAAAGGATCTATGGA R: TGTTTGAGCAATTCCCGCAG	77	100	Matoušková et al. 2018
UGT369A1	HCON_00194230	HCOI00240800	F: TCTAGTTTCGTTCCGGCCAC R: TCGCCCAAGGAACGTCATT	60	100	Matoušková et al. 2018
UGT370A1	HCON_00133660	HCOI01632300	F: CCACCGAGAATCTGACAGCC R: GGGCTGCATTTGAGGTGAATC	69	100	Matoušková et al. 2018
UGT370B1	HCON_00133650	HCOI01632400	F: GAGAAACGGATGGATGGCGA R: ACGGGCTGCATTCGAGTTAA	133	100	Matoušková et al. 2018
UGT371A1	HCON_00108700	HCOI01917400	F: CCACACACTCAGCATATCACT R: GTTCCCTTCGATGTTGGATCA	160	100	Matoušková et al. 2018
UGT372A1	HCON_00161690	HCOI01985800	F: CTCGTCGTTTGGGTATCGCT R: CGAAGCTGGTGTCCGTAAGT	99	100	Matoušková et al. 2018
UGT373A1	HCON_00040490	HCOI01651100	F: TCAACCCTCGGAATGATGCC R: AATGGTGTCAGTCCGGTTGG	86	100	Matoušková et al. 2018
gpd	CDJ92718.1*		F: ACGAGACCTACAATGCAGCC R: GCGAGACAGTTGGTGGTACA	67	101	Lecová et al. (2015)