

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**ZMĚNY V EXPRESI KARBONYLREDUKTAS
BĚHEM ŽIVOTNÍHO CYKLU HLÍSTICE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultantka: Mgr. Karolína Štěrbová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Bc. Kateřina Ňorková

Touto cestou bych chtěla na prvním místě poděkovat své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za možnost zpracování tohoto velmi zajímavého tématu, odborný dohled při vypracování diplomové práce a zejména za příjemné pracovní prostředí s bezproblémovou spoluprací.

Dále bych velmi ráda poděkovala doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a ostatním za přípravu prumerů a obstarání veškerého potřebného biologického materiálu.

Můj největší dík patří Mgr. Karolíně Štěřbové za velkou trpělivost, konzultace, vysvětlení metod, zcela přátelský přístup a pohodové prostředí pro vykonávání praktické části této diplomové práce.

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

V Hradci Králové

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Fakulta biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Ňorková

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

Název diplomové práce: Změny v expresi karbonylreduktas během životního cyklu hlístice

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*, z čeledi *Trichostrongylidae*) je hlístice napadající sliznici gastrointestinálního traktu malých přežvýkavců. Infekce vyvolané touto hlísticí se projevují anémií a edémem. K profylaxi i léčbě těchto infekcí se využívají anthelmintika, tj. léčiva působící proti parazitickým červům. Avšak obrovským problémem je celosvětově narůstající rezistence hlístic na veškerá dostupná anthelmintika. Proto je velmi důležité studovat možné mechanismy vzniku rezistence a faktory, které k vývoji rezistence přispívají. V posledních letech bylo zjištěno, že jedním z mechanismů vzniku rezistence vůči anthelmintikům může být zvýšená exprese a aktivita některých enzymů metabolizujících léčiva.

Tato práce se zabývala sledováním změn v expresi vybraných genů z nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Exprese 20 SDR genů byla stanovena pomocí metody kvantitativní PCR ve všech vývojových stádiích (vajíčka, larvy, dospělci) hlístice *H. contortus*, porovnávána mezi kmenem ISE (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3) a kmenem IRE (Inbred Resistant Edinburgh, MHco5) a také v rámci obou pohlaví. Normalizace výsledků byla provedena pomocí referenčních genů GAPDH a AMA. Výsledky ukázaly výrazné změny v expresi SDR enzymů během ontogeneze, nejvíce byly SDR exprimované v larválních stádiích. U dospělců vyšší expresi vykazovaly samice oproti samcům. U hlístic z rezistentního kmene IRE byla pozorována zvýšená exprese několika SDR oproti citlivému kmeni ISE. Některé z těchto SDR by mohly hrát roli v rezistenci hlístic na anthelmintika s karbonylovou skupinou.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Ňorková

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

Title of diploma thesis: The changes in expression of carbonyl reductases during life cycle of nematode

Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*, from the family *Trichostrongylidae*) is a nematode attacking the mucosa of the gastrointestinal tract of small ruminants. Infections caused by this nematode are manifested by anemia and edema. Anthelmintics, drugs against parasitic worms, are used for prophylaxis and treatment of these infections. However, a huge problem is the worldwide growing resistance to all available anthelmintics. Therefore, it is very important to study the possible mechanisms of resistance and factors that contribute to the development of resistance. In recent years, one of the mechanisms of resistance to anthelmintics has been found to be increased expression and activity of some enzymes of metabolizing drugs.

This work dealt with the monitoring of changes in the expression of selected genes from the detrinth of Dehydrogenas/Reductas with a short chain (SDR). Expression of 20 SDR genes was determined using the quantitative PCR method in all developmental nematode stages (eggs, larvaes, adults) of *H. Contortus*, compared between the ISE (Inbread Susceptible Edinburgh, MHCO3) and IRE (Inbread Resistant Edinburgh, MHCO5) and of both sexes. The normalization of the results was performed using the GAPDH and AMA reference genes. The results showed significant changes in the expression of SDR enzymes during ontogenesis, the highest expression of SDR was observed in larvals. In adults, females showed higher expression than males. An increased expression of several SDRs was observed in the IRE resistant stem strain compared to the sensitive ISE strain. Some of these SDRs could play a role in the resistance of nematodes on anthelmintics with a carbonyl group.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Hlístice (Nematoda)	9
2.2 Vlasovka slezová (<i>Haemonchus contortus</i>)	10
2.3 Hemonchóza a její léčba	14
2.4 Léková rezistence u hlístic	16
2.5 Metabolismus anthelmintik a jiných xenobiotik	17
2.6 Enzymy redukující karbonylovou skupinu	19
2.6.1 AKR enzymy	19
2.6.2 MDR enzymy	22
2.6.3 SDR enzymy	22
2.7 Kvantitativní PCR	26
3. CÍL PRÁCE	30
4. MATERIÁL A METODY	31
4.1 Materiál	31
4.1.1 Biologický materiál	31
4.1.2 Chemikálie a reagenty	31
4.1.3 Technické vybavení	32
4.1.4 Pracovní pomůcky	32
4.2 Metody	33
4.2.1 Izolace vajíček z ovčího trusu	33
4.2.2 Zakládání koprokultury a získávání larev L3	33
4.2.3 Izolace dospělců a jejich třídění	36
4.2.4 Izolace RNA	38
4.2.5 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem	39
4.2.6 Ošetření DNAsou I	39
4.2.7 Reverzní transkripce	39
4.2.8 Kvantitativní PCR (qPCR)	40
4.3 Statistická analýza	41
5. VÝSLEDKY	42
5.1 Expres referenčních genů	42
5.2 Relativní exprese vybraných SDR genů	43

5.3	Změny v expresi vybraných SDR genů během ontogeneze	46
5.4	Rozdíly v expresi vybraných SDR genů mezi samci a samicemi	50
5.5	Rozdíly v expresi vybraných SDR genů mezi kmeny ISE a IRE	52
6.	DISKUSE	57
7.	ZÁVĚR	60
8.	POUŽITÉ ZKRATKY	61
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
10.	SEZNAM TABULEK	65
11.	POUŽITÁ LITERATURA	66

1. ÚVOD

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je vysoce patogenní hlístice živící se krví malých přežvýkavců. Infekce vyvolané vlasovkou slezovou se nazývají hemonchózy. Vedou k anémii, edému, nadměrnému hubnutí a zpomalenému růstu (Besier et al. 2016).

K léčbě těchto parazitární infekcí se používají anthelmintika. Avšak během posledních desetiletí si vlasovka slezová dokázala vyvinout na tato léčiva rezistenci. Příčinou rozvoje této rezistence je především časté a někdy i nesprávné podávání anthelmintik hospodářským zvířatům. Některé kmeny nyní vykazují rezistenci vůči všem hlavním skupinám anthelmintik včetně benzimidazolů, imidazothiazolů a makrocyclických laktonů (Kotze a Prichard 2016). Prevalence těchto rezistentních populací ohrožuje chovy ovcí a koz po celém světě. Jedná se o velmi závažný celosvětový problém, jehož řešením je nejen vývoj nových léčiv působících na nové molekulární cíle, ale i odhalení všech mechanismů lékové rezistence.

V této diplomové práci jsme se zabývali nadrodinou reduktas/dehydrogenas s krátkým řetězcem („short-chain reductases/dehydrogenases“, SDR). Tyto enzymy mají u savců velký význam v endogenním metabolismu i v metabolismu xenobiotik. Avšak informace o SDR u hlístic jsou velmi omezené. V naší studii jsme sledovali změny v expresi jednotlivých SDR během životního cyklu vlasovky slezové a porovnávali jejich expresi v kmenech citlivém na anthelmintika (ISE) a rezistentním na anthelmintika (IRE).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hlístice (Nematoda)

Kmen Nematoda zahrnuje jak volně žijící druhy, tak řadu rostlinných i živočišných parazitů. V souladu se svým jménem mají hlístice většinou tělo dlouhé, úzké a vláknité („nema“ je řecky vlákno), které není segmentované jako tělo žížal.

Bylo popsáno pouze asi 30 000 druhů, ale počet existujících druhů helmintů se odhaduje na milion nebo více. Navzdory svému neměnnému složení těla vykazují hlístice ohromující biologickou rozmanitost. Jednotlivé druhy se od sebe zřetelně odlišují. Mezi nejpodstatnější rozdíly patří velikost jejich těla, která se pohybuje od zlomků milimetrů do několika metrů. Ale jednotlivé druhy hlístic se liší také způsobem příjmu potravy. Ústa hlístice mohou představovat jednoduchou trubici nebo mohou být vybaveny zuby, pomocí kterých helminti potravu řezají, trhají nebo kousají. Největší a nejvíce fascinující rozmanitost se však nachází ve fyziologických adaptacích a v interakcích, které mají helminti s jinými organismy. Hlístice žijí doslova všude. V trávách, korunách stromů, na poušti, v ledu, horkých pramenech, hlubokém moři i v mořských sedimentech, které postrádají jakoukoli stopu kyslíku. To dokazuje jejich obrovskou adaptaci na vnější prostředí a nenáročnost na životní podmínky. Mnohé z nich jsou také přítomny vně nebo uvnitř rostlin a zvířat nebo jsou s nimi v těsném kontaktu. Tím se mezi nimi a dalšími organismy vyvinuly různorodé interakce, od nepříznivých po výhodné (Kiontke a Fitch 2013).

Živočišnými hostiteli hlístic jsou většinou členovci nebo obratlovci všeho druhu. Některé hlístice parazitující u živočichů mají složité životní cykly zahrnující různé meziphostitele nebo migraci přes různé tkáně obratlovce. Stejně jako jiní parazité i některé hlístice mění chování svého hostitele způsobem, který usnadňuje přenos (Kiontke a Fitch 2013).

Hlístice sehrály významnou roli ve vědeckém poznání a v rozvoji biologických věd. Edouard Van Beneden využil hlístice z rodu *Parascaris spp.* pro studium chromozomů. Typické znaky tohoto organismu umožňovaly pozorovat stadia gametogeneze v dlouhých reprodukčních orgánech (samčích a samičích pohlavních žlázách s délkou v průměru 70 cm nebo více, velkých spermiích a v množství oocytů i vajíček). V roce 1883 byl použit rod *Parascaris spp.* k pozorování a popisu procesů gametogeneze, včetně redukčního dělení meiózy. Došlo také k navržení chromozomálního základu pro určení pohlaví hlístic. Na tyto projekty navázaly další studie, které je použily k rozvoji teorie chromozomové dědičnosti, chromozomového cyklu a k popisu klíčové role centrozomů při segregaci chromozomů.

Výzkumy z tohoto období přinesly zásadní informace o chromozomech a dědičnosti (Carlton et al. 2022).

Přibližně čtvrtina světové lidské populace je infikována gastrointestinálními hlísticemi. Hlístice představují hlavní parazity hospodářských zvířat a působí značné ekonomické ztráty jejich chovatelům. Přibližně 8–15 % ztrát na úrodě je celosvětově připisováno také hlísticím (Kiontke a Fitch 2013).

Hlístice rodu *Haemonchus spp.* patří mezi abomazální (vnitrobuněčné) parazity. Napadají gastrointestinální trakt skotu a malých přežvýkavců. Dospělí samci a samice žijí ve slezu nebo tenkém střevě (Arsenopoulos et al. 2021; Gareth et al. 2021).

2.2 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Haemonchus contortus neboli vlasovka slezová pochází z čeledi *Trichostrongylidae*. Je to vysoce patogenní hlístice napadající gastrointestinální trakt a živící se krví malých přežvýkavců. *H. contortus* způsobuje nemoc zvanou hemonchóza, jejíž následky mají obrovský ekonomický dopad. Představují významné ztráty produkce v důsledku morbidity, mortality a nákladů na léčbu. Nejvíce infikovaná zvířata jsou kozy a ovce nacházející se v tropických a subtropických oblastech.

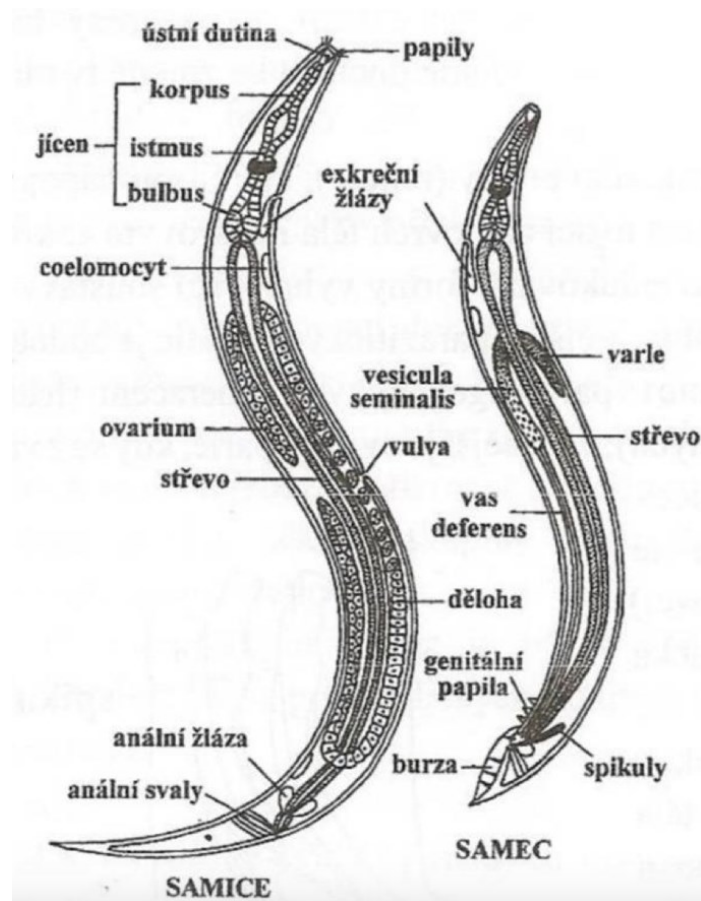
Tvar těla *H. contortus* připomíná trubici. Samičky jsou dlouhé 18–30 mm. Na jejich těle jsou jasně viditelné vaječníky a děloha bílého zbarvení. Tyto orgány se stáčí po délce červa kolem červeného střeva plného krve. Tímto je lze rozpoznat od samečků. Dalším typickým znakem samičky vlasovky slezové je tzv. vulvární patka neboli klapka (*vulva*). Ta se nachází v dutině ústní. Zde pomáhá perforovat žaludeční sliznici a sát krev. Zbarvení samečků je rovnoměrně červenohnědé. Jsou 10–20 mm dlouzí. Jejich typickým morfologickým znakem je kopulační burza (*bursa copulatrix*), která se nachází v kaudální části těla (Gareth et al. 2021). *Bursa copulatrix* a *vulva* jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1 – Rozlišení samce a samice

Zdroj: (Šormová 2020)

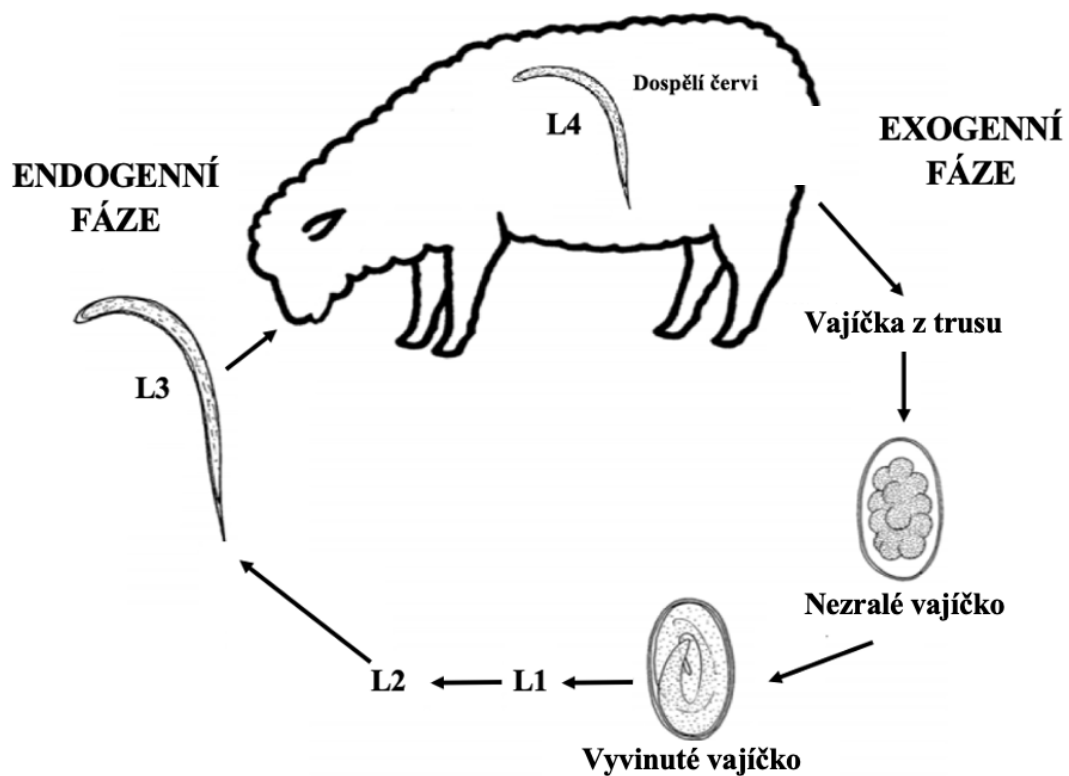
Mezi další výrazné orgány vlasovky slezové patří střevo a gonáda. Tyto orgány jsou obklopeny stěnou s dorzálními a ventrálními podélnými svaly, epidermis a kutikulou. Mezi vnitřní a vnější trubicí je dutina naplněná tekutinou. Ta funguje jako hydrostatická kostra. Popsaná organizace jednotlivých orgánů umožňuje hlísticím jedinečný pohyb v sinusových vlnách. V průběhu lokomoce vždy na jedné straně leží a druhou stranu pak používají k samotnému hnutí (Kiontke a Fitch 2013). Podrobný popis vnitřních orgánů samiček a samečků je ukázán na obrázku 2.



Obrázek 2 – Podrobná morfologie samce a samice

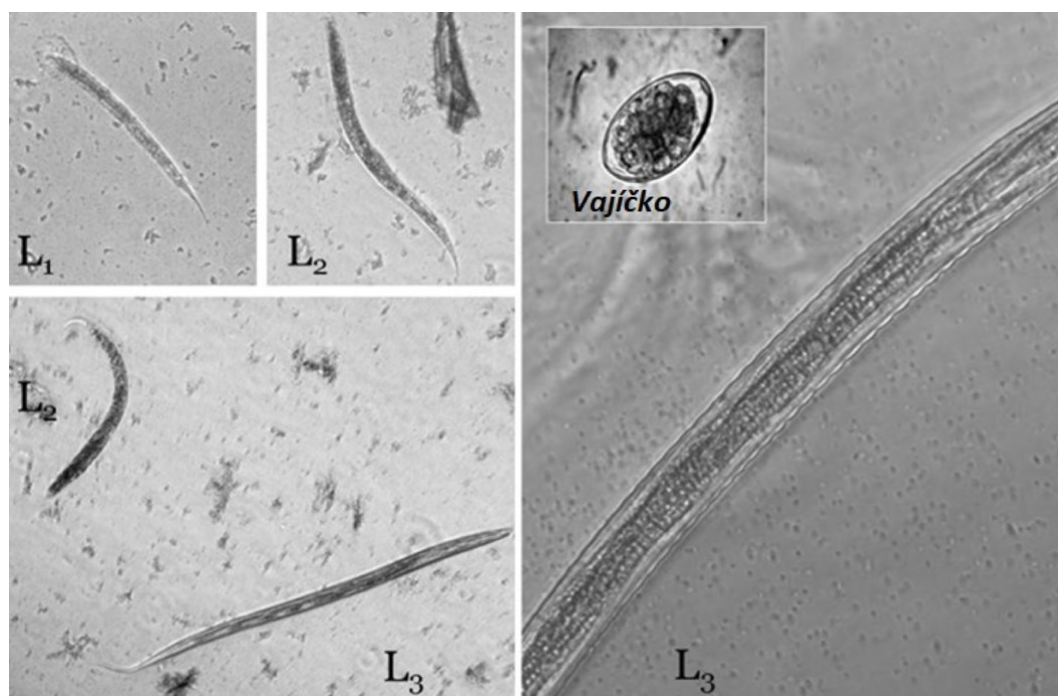
Zdroj: (Horák a Scholz 1998)

H. contortus má přímý životní cyklus, který je dvoufázový, bez účasti mezipřehoditele. Zahrnuje předparazitická a parazitická stádia (Gareh et al. 2021). Životní cyklus vlasovky slezové je znázorněn na obrázku 3. Všechny hlístice procházejí čtyřmi larválními stádii. Stádia L1, L2 a L3 jsou zobrazena na obrázku 4. Při rozvoji hemonchózy dochází ve slezu hostitele k produkci několika tisíc vajíček denně. Spolu s exkrementy jsou tato vajíčka z těla hostitele následně vylučována do vnějšího prostředí. Tím infikují travnaté plochy, na kterých se ovce pasou. Po pohlcení infekčních larev třetího stádia (L3) přežvýkavcem v něm migrují do predikčního místa, tj. do slezu. Zde dochází k vývoji larev čtvrtého stádia (L4) a uchycení dospělců. Ideálními podmínkami pro vývoj vajíček je teplota zhruba 28 °C a vlhkost prostředí 70 %. Odolnost těchto larev se zvyšuje s jejich vývojem a larvy L3 jsou velice dobře odolné k vnějším podmínkám (Arsenopoulos et al. 2021).



Obrázek 3 – Životní cyklus vlasovky slezové

Zdroj: přejato z <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/haemonchus-contortus>, upraveno



Obrázek 4 – Stádia larvy

Zdroj: přejato z pracovních postupů – katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, upraveno

Hypobióza (fakultativní zástava vývoje) je nejdůležitější adaptací životního cyklu zajišťující přežití parazitických hlístic v nepříznivých podmínkách. Dočasné zastavení vývoje mezi hlísticemi je tedy schopnost přerušit životní cyklus a přežít drsné podmínky. Spouštěčem hypobiózy je právě reakce na nepříznivé podmínky vnějšího prostředí. Například u volně žijících hlístic *Caenorhabditis elegans* dochází k zastavení vývoje ve třetím larválním stadiu (L3). Příčinou může být např. nedostatek potravy, vysoká populační hustota nebo vysoká teplota. Reakcí na tyto podmínky pak hlístice vstupují do stadia dauer (dipauza). Toto stádium je odolné vůči nepříznivým podmínkám. *H. contortus* také podléhá fakultativnímu zastavení (diapauze). Molekulární základ těchto mechanismů u *C. elegans* je např. oxidace mastných kyselin a syntéza dauerových feromonů (Shi et al. 2021), u parazitických hlístic dosud nebyl objasněn.

2.3 Hemonchóza a její léčba

Infekce vyvolané vlasovkou slezovou se nazývají hemonchózy. Jedná se o celosvětově rozšířené onemocnění. Napadá především skot, ovce a kozy.

Anémie, úbytek hmotnosti a zpomalený růst patří mezi klinické příznaky hemonchózy. Nejčastěji však dochází k anémii, což je zvláště snadno patrné ve spojivkách, jejichž barva se mění od normální červenorůžové až po extrémně bílou (Besier et al. 2016; Gareh et al. 2021). Názorný příklad tohoto následku onemocnění je na obrázku 5. Rozvoj anémie u hostitele je podporován produkcí hemolytického faktoru helmintem, která následně způsobuje rozsáhlé morfologické změny na povrchu erytrocytů postižených ovcí (Arsenopoulos et al. 2021). Další komplikace mohou nastat, pokud není akutní hemonchóza léčena. Například ztráta krve může vyvolat hypoproteinémii. Ta může být příčinou celkového ventrálního edému. Obvykle se hemonchóza vyskytuje v akutní formě s různou rychlostí nástupu v závislosti na přijatém množství infekčních larev *H. contortus*. Výkaly nemocných zvířat jsou často pevné a mohou být tmavé kvůli obsahu okultní krve. Průjem není obvyklý, i když se hemonchóza může vyskytovat současně s infekcemi jinými hlísticemi, které způsobují tento klinický příznak. Bolest je vizuálně patrná. Někdy dochází dokonce k poškození kůže projevující se vypadáváním pramenů nebo celého rouna (Besier et al. 2016).



Obrázek 5 – Postižená sliznice oka u ovce

Zdroj: (FAMACHA[©] 2016), upraveno

Mezi nejvýznamnější rizikové faktory této infekce patří stáří zvířat a pohlaví. Mláďata se infikují snadněji. U dospělých hlístic jsou k nákaze citlivější samice (Gareh et al. 2021). Odolnost vůči hemonchóze je závislá na plemeni ovcí. Například plemena Red Maasai, Garole, Gulf Coast Native, Rhön a Barbados Black Belly mají vůči hemonchóze vyšší odolnost (Yan et al. 2021). Dále odolnost L3 vůči některým atmosférickým proměnným (např. teplota a vlhkost) by mohla být použita k predikci výskytu hemonchózy u malých přežvýkavců (Iliev et al. 2018). Včasná detekce parazitů a lepší pochopení hlavních rizikových faktorů spojených s infekcí jsou hlavní strategie kontroly infekce (Gareh et al. 2021). Platí také pravidlo, čím větší chov, tím větší riziko rozvoje hemonchózy. Zejména vysoké riziko je ve velkochovech, kde nejsou prostory ke střídání pastvin.

Nejzávažnějším důsledkem infekce je výrazné snížení produkce infikovaných zvířat. To zahrnuje snížení růstu mláďat, snížení produkce mléka u zvířat v laktaci a produkci vlákniny. V nejzávažnějších případech dochází i k úhynu zvířat. Například podle dlouhodobé studie

infekčních onemocnění koz v Indii byla hemonchóza příčinou předčasného úmrtí u 10 % zvířat (Pawaiya et al. 2017).

K léčbě hemonchózy těchto parazitární infekcí se používají anthelmintika. Tuto skupinu léků lze rozdělit do dvou skupin. Jsou širokospektrá a úzce specializovaná anthelmintika. Mezi širokospektrá se řadí anthelmintika zaměřená proti různým třídám helmintů. Do této skupiny léčiv patří například albendazol, který je účinný proti hlísticím, ale také tasemnicím a motolicím. Úzce specializovaná anthelmintika jsou naopak namířena proti konkrétním druhům. Jejich příkladem je triklabendazol, který se používá se k terapii infekcí motolicemi.

V současnosti se nejčastěji k léčbě hemonchóz používají ivermektinová nebo benzimidazolová léčiva. Terapie je ale také možné použitím anthelmintika levamizolu ze skupiny imidazothiazolů (Emery et al. 2016). V závažných případech mohou mít zvířata prospěch z krevních transfuzí či ze suplementací železem. Důležité jsou však zejména správné hygienické podmínky. A tedy všeobecná sanitace zařízení, správa a střídání pastvin včetně nezbytných preventivních a kontrolních opatření. Tyto postupy jsou důležité hlavně proto, aby bylo minimalizováno riziko nákazy zvířat infekčními larvami.

V současné době existují komerčně dostupné vakcíny proti infekci vyvolané hlísticí *H. contortus* v Austrálii a Jižní Africe. Tyto vakcíny vyvolávají vysoké hladiny sérových protilátek proti „skrytým“ střevním antigenům vlasovky slezové. Výroba vakcíny zahrnuje sběr extraktů ze střeva parazita. Vakcinace snižuje vylučování vajíček a onemocnění u jehňat, ročních mláďat a dospělých ovcí. Ovce vyžadují tři základní dávky vakcíny, po nichž následují přeočkování každých šest týdnů až šest měsíců v závislosti na úrovni expozice. Obrovskou nevýhodou těchto vakcín je jejich vysoká pořizovací cena, což velmi limituje jejich širší využití (Emery et al. 2016).

2.4 Léková rezistence u hlístic

Anthelmintika však v poslední době ztrácejí účinnost, neboť se u řady kmenů helmintů vyvinula rezistence k běžným anthelmintikům. V posledním desetiletí byla zjištěna výrazná rezistence gastrointestinálních hlístic zejména na benzimidazoly, levamizol a makrocyklické laktony. Např. dle studie na Novém Zélandu prokázalo rezistenci na fenbendazol 43 % gastrointestinálních hlístic (Hugles et al. 2005). Momentálně z Evropy jsou na tom nejhůře státy Irsko a Velké Británie, avšak i na evropském kontinentu dochází k rychlému rozvoji rezistence, která zahrnuje všechny třídy anthelmintik (Voigt et al. 2022). Některé kmeny *H. contortus*,

Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta a *Trichostrongylus colubriformis* jsou rezistentní vůči všem hlavním anthelmintikům (Hugles et al. 2005).

Příčinnou vzniku této rezistence je především nesprávné dávkování anthelmintik a jejich příliš časté podávání hospodářským zvířatům. Důsledky rozšířené rezistence na anthelmintika jsou zejména omezení účinnosti léčby i prevence, nižší udržitelnost systémů produkce skotu a malých přežvýkavců po celém světě a také vysoké finanční náklady za léčbu. Odhaduje se, že celosvětové náklady na léčbu anthelmintiky dosahují ročně až desítek miliard dolarů (Yan et al. 2021).

Léková rezistence může vzniknout různými způsoby: např. změnou molekulárního cíle, kdy léčivo cíl nerozpozná a tím je neúčinné, nebo amplifikací cílových genů k překonání účinku léčiva. Další možností je změna metabolismu, což způsobí inaktivaci nebo odstranění léčiva nebo změna v distribuci léčiva v cílovém organismu, která brání léčivu v přístupu do místa účinku (Wolstenholme et al. 2004). Léková rezistence může být tedy způsobena změnou farmakodynamiky (absorpce, distribuce, metabolismu, vylučování a místa účinku) nebo farmakokinetiky. Farmakokineticky zprostředkovaná léková rezistence je založena na zvýšení exprese a aktivit enzymů metabolizujících xenobiotika. Tyto mechanismy mohou zahrnovat snížený příjem léčiva, jeho zrychlený eflux nebo zvýšenou inaktivaci. Tím je koncentrace aktivního léčiva v buňkách parazita snížena (Stuchlíková Raisová et al. 2018).

Nejlépe je prozkoumána rezistence hlístic na benzimidazoly. Primárním mechanismem vzniku rezistence hlístic na benzimidazolová anthelmintika je výskyt jednonukleotidových polymorfismů v rámci tří kodonů genu pro β -tubulin 1. Přítomnost polymorfismů mění trojrozměrnou strukturu β -tubulinu, cílového proteinu benzimidazolů. Na rezistenci hlístic vůči benzimidazolům se však také podílí zvýšená exprese enzymů metabolizujících anthelmintika (Stuchlíková Raisová et al. 2018).

2.5 Metabolismus anthelmintik a jiných xenobiotik

Biotransformační enzymy a transportéry mohou do určité míry chránit parazity před toxickými účinky anthelmintik a indukce xenobiotik může představovat výhodnou obrannou strategii (Cvilink et al. 2009). Anthelmintikum (pokud je metabolizováno a není secernováno v nezměněné podobě) může být detoxikováno a eliminováno pomocí tří obranných systémů na úrovni proteinů, označovaných jako fáze I až fáze III. Tyto fáze mohou probíhat v sérii nebo nezávisle na sobě (Brophy et al. 2012).

Principem biotransformační fáze I je přidání nebo odkrytí reaktivní skupiny reakcemi oxidačními, redukčními či hydrolytickými (Brophy et al. 2012). Tento proces se děje zejména za pomoci cytochromů P450 (CYP), aldo-ketoreduktas (AKR), dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR), flavinových monooxygenas (FMO) a mnoha dalších enzymů (Cvilink et al. 2009).

Oxidace mnoha xenobiotik je zprostředkována CYP. Ačkoli působí hlavně jako monooxygenasy, disponují také jinými katalytickými aktivitami. Monooxygenasová aktivita CYP byla zjištěna u larev a dospělců *H. contortus*. Zatím však není potvrzeno, zda se CYP podílí na metabolismu anthelmintik. Oxidace xenobiotik u helmintů by mohla být zprostředkována také FMO. Zástupci rodiny genů FMO jsou přítomni téměř ve všech kmenech hlístic (Brophy et al. 2012; Cvilink et al. 2009).

Peroxidasy představují další skupinu enzymů, které u helmintů disponují zejména antioxidačními funkcemi. Přítomnost helmintů v hostitelském organismu vede k aktivaci imunitního systému hostitele a ke zvýšení produkce volných radikálů. Tím dochází ke zvyšování koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS). Superoxiddismutasa a peroxiredoxiny jsou pravděpodobně hlavními enzymy detoxikujícími peroxid vodíku u helmintů. Byla také prokázána role katalasy a glutathionperoxidasy v obraně larválního a dospělého *H. contortus* proti peroxidu vodíku (Cvilink et al. 2009).

Reduktasy a hydrolasy jsou u hlístic považovány za důležité biotransformační enzymy xenobiotik. Redukční metabolismus představuje hlavní metabolickou dráhu sloučenin nesoucích karbonylové skupiny. Některé důležité sloučeniny (např. aldehydy a ketony) metabolizují AKR, MDR a SDR (Cvilink et al. 2009). Tyto nadrodiny jsou detailněji popsány v další kapitole.

Ve II. fázi biotransformace je xenobiotikum konjugováno s nízkomolekulární endogenní složkou za účelem zvýšení polariry a snížení reaktivity (Brophy et al. 2012). V této fázi je nezbytné dodání energie pro konjugační reakci formou vazby makroergního kofaktoru. Mezi konjugační enzymy patří například UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), glutathion-S-transferasy (GST), N-acetyltransferasy, methyltransferasy a sulfotransferasy (Cvilink et al. 2009).

H. contortus obsahuje 32 genů UGT, které se nachází na šesti chromozomech. Nejvyšší počet UGT genů je zastoupeno na 4. chromozomu (Matoušková et al. 2018). Mezi základní reakce katalyzované UGT patří glukuronidace a glukosylace. Substráty UGT jsou alifatické alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, thioly a aminy (Chen 2020).

GST jsou obvykle přítomny v relativně vysokých hladinách v cytosolu mnoha dospělých parazitárních helmintů. Mnoho GST má kromě enzymatické aktivity další funkci například proteinu transportující hydrofobní ligandy (Brophy et al. 2012).

Třetí fázi metabolismu xenobiotik zprostředkovávají proteinové transportéry (Choe et al. 2012). Zásadní faktor určující účinnost anthelmintik je způsob jejich vstupu do těla helmintů. Prostup anthelmintik přes buněčné membrány může probíhat specializovaným transportním systémem nebo pasivní difuzí. Nicméně konečná dávka účinné koncentrace anthelmintika k dosažení terapeutického účinku závisí na permeabilitě kutikuly hlístic (Bártíková et al. 2012).

Transportéry léků, které zprostředkovávají transport léčiv přes membrány, se rozlišují na dva hlavní typy. Těmi jsou transportéry importující xenobiotika a jiné metabolity do buněk a efluxní transportéry, které zajišťují přenos xenobiotik a jejich metabolitů z buněk ven. Efluxní transportéry patřící do nadrodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů jsou intenzivně studovány i u helmintů z důvodu jejich možné role v rezistenci vůči anthelmintikům. Například transportér ABCB1 (dříve nazývaný P-glykoprotein) je jedním z hlavních efluxních transportérů zapojených do metabolismu xenobiotik. Vyskytuje se ve všech parazitárních stádiích *H. contortus*. Důležitá je především jeho účast na lékové rezistenci helmintů vůči makrocyclickým laktonům, jejíž příčinou je nadměrná exprese ABCB1 (Choe et al. 2012).

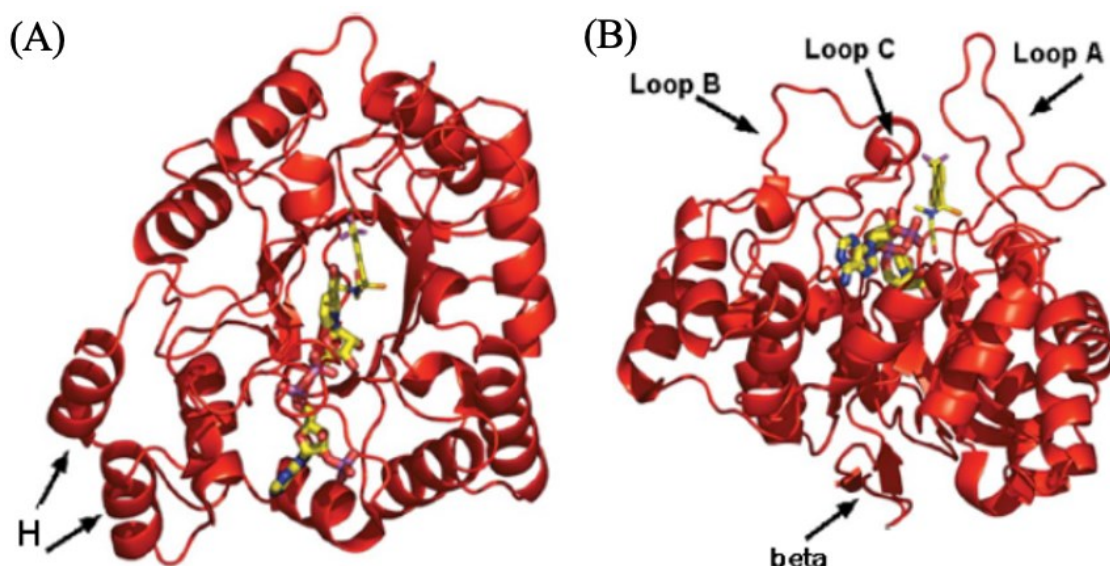
2.6 Enzymy redukující karbonylovou skupinu

Karbonylová skupina, zejména aldehydová, má vysokou chemickou aktivitu a snadno reaguje s nukleofilními centry. Příklady takových center jsou proteinové postranní řetězce obsahující sulfhydrylové nebo primární aminosubstituenty. Přeměna aldehydů na alkoholy vede k redukci karbonylové skupiny a snížení celkové chemické reaktivity molekuly. Redukce karbonylové skupiny tak většinou představuje reakci detoxikační (Barski et al. 2008). Tyto reakce mohou být katalyzovány enzymy z nadrodin AKR, MDR nebo SDR.

2.6.1 AKR enzymy

AKR jsou nadrodinou proteinů nacházející se ve všech živočišných kmenech a obsahující více jak 16 rodin (označeny písmenem), které se dále dělí na podrodiny (označeny číslicí). Jedná se především o monomerní rozpustné cytosolické proteiny s relativní molekulovou hmotností 34–37 kDa. Základ strukturního uspořádání AKR enzymů tvoří 8 paralelních β -listů, které z vnější strany obklopuje osm α -helixů. AKR proteiny mají tedy

shodné prostorové uspořádání tzv. $(\beta/\alpha)_8$ válce. Na N-konci aminokyselinové sekvence se mohou vyskytovat dva β -listy tvořící vlásenku. Mimo strukturu $(\alpha/\beta)_8$ -válce je také možné najít 1–2 α -helixy a 3 variabilní smyčky. Tyto smyčky jsou především zodpovědné za substrátovou specifitu jednotlivých zástupců AKR enzymů (Barski et al. 2008; Penning 2015). Detailně popsaná struktura je ukázána na příkladu enzymu AKR1B10 na obrázcích 6(A) a 6(B). Enzym je zde zobrazen s navázaným kofaktorem NADP^+ a léčivem tolrestatem. Písmeno H na obrázku 6(A) značí 2 α -helixy, které se vyskytují mimo strukturu $(\alpha/\beta)_8$ válce. Označení Loop A–C obrázku 6(B) ukazuje na místa variabilních smyček a označení beta na stejném obrázku značí místo dvou β -listů tvořících vlásenku (Gallego et al. 2007). Toto prostorové uspořádání AKR enzymů je velmi užitečné pro vazbu redoxního aktivního kofaktoru.

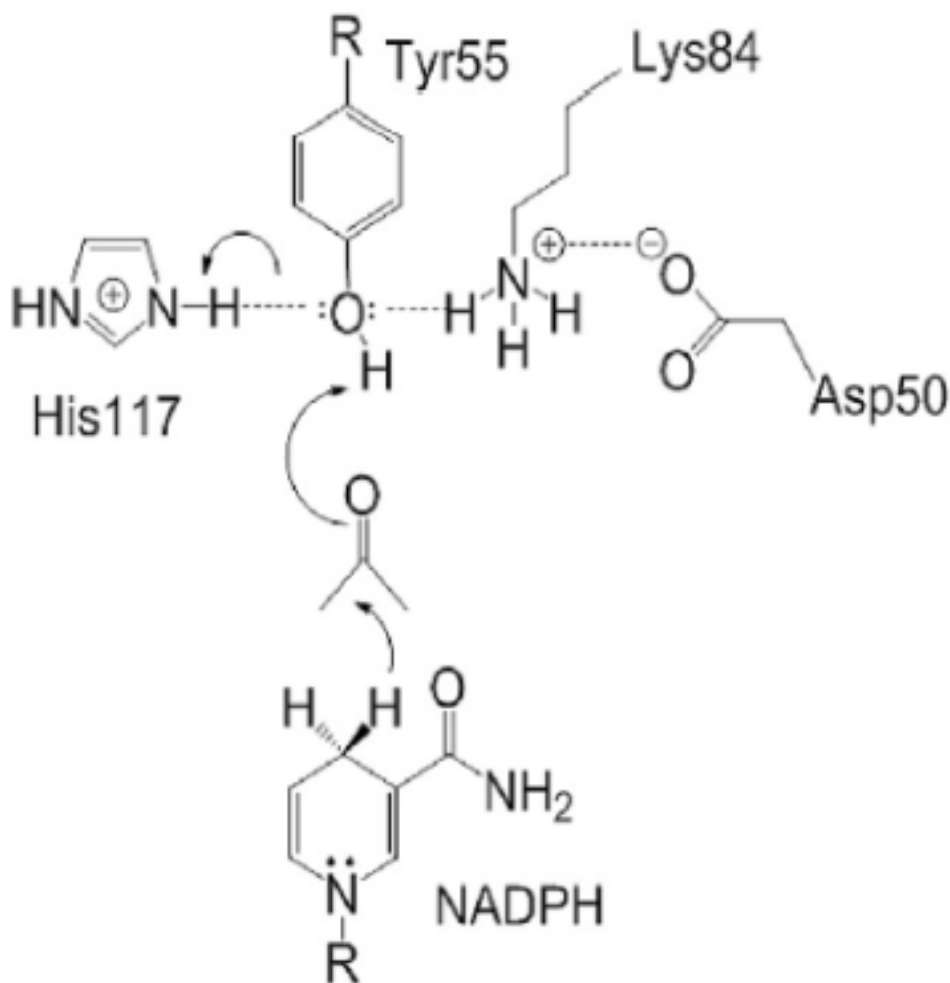


Obrázek 6(A) – $(\alpha/\beta)_8$ -válec AKR1B10 v krystalové struktuře (pohled shora)

Obrázek 6(B) – $(\alpha/\beta)_8$ -válec AKR1B10 v krystalové struktuře (pohled z boku)

Zdroj: (Gallego et al. 2007), upraveno

AKR enzymy vykazují uspořádaný bi-bi kinetický mechanismus katalýzy, ve kterém se kofaktor NAD(P)H váže jako první a odchází jako poslední (Barski et al. 2008; Penning 2015). Příklad katalytického mechanismu enzymu AKR1C9 je zobrazen na obrázku 7, kde je hlavní katalytickou aminokyselinou tyrosin, který zároveň představuje donor protonu redukční reakce. Cílem pomocných aminokyselin lysinu a aspartátu je snížit pK_a tyrosinu. Tyrosin následně vytváří vodíkovou vazbu se substrátem a probíhá polarizace karbonylové skupiny. Těmito reakcemi dochází k usnadnění přenosu hybridu z NADPH na karbonylový uhlík substrátu a karbonylová skupina se redukuje (Penning 2015).



Obrázek 7 – Katalytický mechanismus AKR1C9

Zdroj: (Penning 2015)

Aktivní místo AKR se nachází na C-terminálním konci válce a je optimalizováno pro vysoce afinitní interakci s koenzymy. Při použití NADPH jako koenzymu většina AKR katalyzuje redukci aldehydů nebo ketonů (Barski et al. 2008). AKR redukují karbonylové substráty jako jsou aldehydy cukrů, ketosteroidy, keto-prostaglandiny, chinony a vedlejší produkty peroxidace lipidů. Výjimečně AKR1D redukují dvojně vazby steroidů a oxidují karcinogenní trans-dihydrodiolové polycyklické aromatické uhlovodíky. Redukce aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy jsou zapojeny do I. fáze metabolismu endogenních sloučenin a xenobiotik nesoucích tyto karbonylové skupiny (Penning 2015).

Většina AKR preferuje NADPH před NADH. V metabolicky aktivních buňkách je NADP většinou v redukované formě, proto je redukce upřednostňována před oxidací (Pollak et al. 2007). Poměr NADPH/NADP⁺ odraží syntetickou kapacitu buňky a je kineticky a termodynamicky disociován od poměru NAD⁺/NADH. Tento poměr je většinou regulovaný

rychlostmi glykolýzy a dýchání. AKR tedy mohou plnit své úkoly v detoxikaci, aniž by byly ovlivněny kolísáním poměru kofaktorů v důsledku změn metabolické rychlosti a kapacity. Vysoký konstantní přísun NADPH tedy poskytuje velkou hnací sílu pro AKR (Barski et al. 2008).

2.6.2 MDR enzymy

Velmi obsáhlá proteinová nadrodina MDR zahrnuje téměř 1000 členů, kteří se nacházejí ve všech organismech. MDR enzymy se podílejí na oxidaci alkoholů, detoxikaci aldehydů či alkoholů, metabolismu žlučových kyselin a mají široký rozsah enzymatických aktivit. Především se podílejí na regulačních procesech a ochraně před poškozením buněk (Knoll a Pleiss 2008; Nordling et al. 2002).

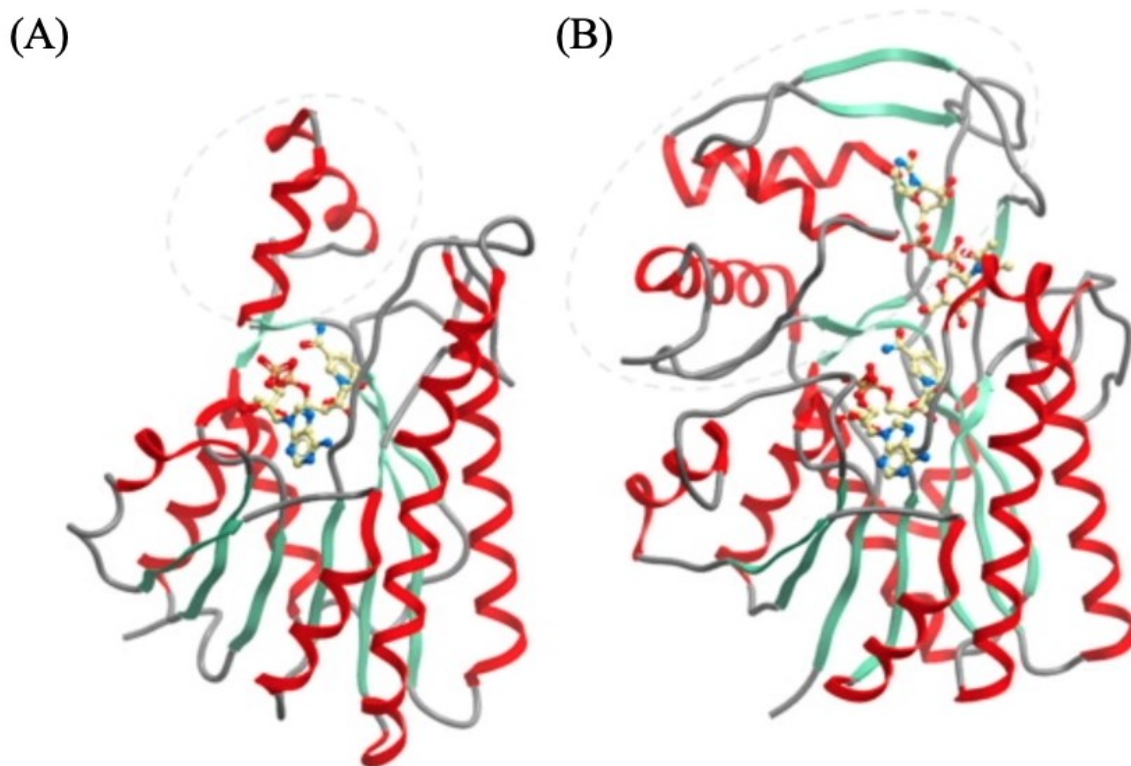
Většina MDR je aktivních jako dimery nebo tetramery. Ačkoli jsou MDR enzymy v sekvenci velmi různorodé, mají podobnou velikost i konzervovanou terciární strukturu. Ta je tvořena dvěma doménami, kofaktorovou vazebnou doménou a katalytickou doménou. Prostorová struktura MDR enzymů zahrnuje segment smyčky v katalytické doméně, která je součástí místa pro vazbu substrátu. Vazebné místo se skládá z konzervovaných i variabilních oblastí. Konzervované oblasti jsou tvořeny kofaktorem NAD(H) nebo NADP(H) a katalytickým iontem zinku (Knoll a Pleiss 2008; Nordling et al. 2002).

Možností klasifikace MDR enzymů je více. MDR mohou být přiřazeny do osmi funkčních rodin, které spadají do dvou tříd. Třídy jsou pak rozděleny na MDR obsahující zinek a MDR neobsahující zinek. První třída zahrnuje cinnamylalkoholdehydrogenasy (CAD), polyoldehydrogenasy (PDH), dimerní alkoholdehydrogenasy (ADH) a kvasinkové/tetramerní alkoholdehydrogenasy (YADH). Do druhé třídy se řadí chinonoxidoreduktasy (QOR), proteiny mitochondriální odezvy (MRF), leukotrien B4 dehydrogenasy (LTD) a acyl-CoA reduktasy (ACR) (Nordling et al. 2002; Jörnvall et al. 2003). Jiná klasifikace seskupuje MDR do tří makrorodin. Makrorodiny I a II zahrnují MDR obsahující zinek a makrorodina III představuje MDR bez obsahu zinku (Riveros-Rosas et al. 2003).

2.6.3 SDR enzymy

SDR jsou jednou z největších proteinových nadrodin vyskytujících se ve všech živočišných kmenech (archea, bakterie i eukaryoty) (Bray et al. 2009; Jörnvall et al. 2003). Jejich relativní molekulová hmotnost zahrnující 250–350 aminokyselinových zbytků je přibližně okolo 25–40 kDa. Sekvenční identita mezi členy nadrodiny SDR je obvykle 15–30 %.

SDR enzymy se vyskytují ve formách monomerů, dimerů i tetramerů. Skládají se z 6–7 paralelních β -listů, které z každé strany obklopují tři α -helixy. Popsaná struktura, která je pro SDR enzymy typická, se nazývá Rossmannův motiv a její praktický význam tkví zejména ve vazbě NAD(P)(H) kofaktoru. Příklady struktur zástupců SDR enzymů jsou zobrazeny na obrázcích 8(A) a 8(B), kde je ukázán ligandový komplex obsahující NAD(H) a UDP-acetylglukosamin. Většina členů SDR enzymů obsahuje v katalytickém místě aminokyselinu tyrosin a také je na N-termální konci bohatá na glycin (Bray et al. 2009). Strukturálním rozdílem SDR oproti jiným nadrodinám enzymů je však C-terminální část, která zajišťuje vazbu substrátu (Bray et al. 2009; Kavanagh et al. 2008).



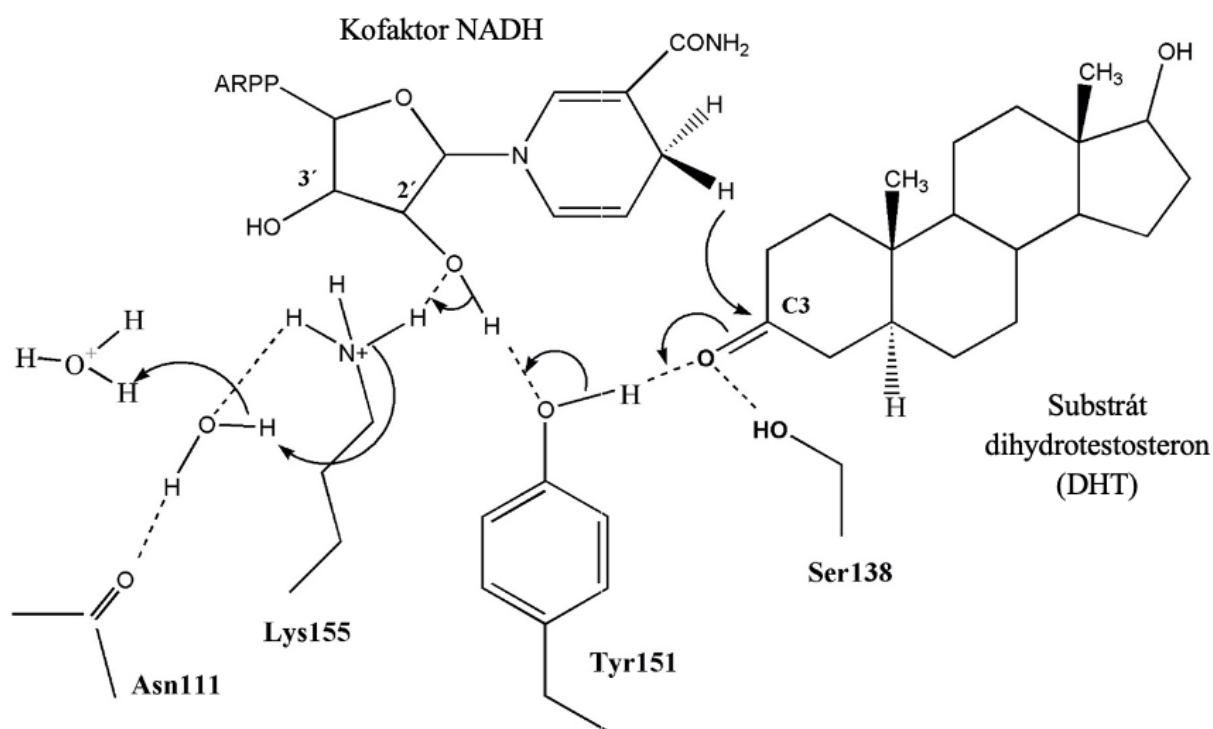
Obrázek 8(A) – Struktura 3-hydroxybutyrátdehydrogenasy typu 2 (BDH2) s klasickým složením SDR navázaná na NAD(H)

Obrázek 8(B) – Struktura UDP-galaktosa-4-epimerasy (GALE)

Zdroj: (Bray et al. 2009), upraveno

SDR nadrodina je rozdělena na rodiny (označeny číslicí) a podrodiny (označeny písmeny) na základě aminokyselinové sekvence. Dříve se užívalo názvosloví pomocí názvů substrátu a/nebo funkcí enzymu. Nová nomenklatura byla zavedena v roce 2009 (Persson a Kallberg 2013; Persson et al. 2009).

Mezi základní funkce zástupců SDR patří oxidace alkoholů a redukce ketonů a aldehydů. Samotný mechanismus enzymové reakce je sekvenční, kdy se nejdříve na enzym váže kofaktor a ten také odchází z reakce jako poslední. Na obrázku 9 je ukázán katalytický mechanismus SDR enzymů. Stejně jako v případě AKR enzymů zde představuje hlavní katalytickou aminokyselinu tyrosin. Nejdříve dochází k odevzdání protonu nacházejícího se na hydroxylové skupině na substrát a následně probíhá přenos hydridového aniontu z kofaktoru na uhlík karbonylu. Serin má pomocnou roli při vazbě substrátu na pozici vhodnou pro průběh reakce. Úkolem lysinu je zprostředkování vazby kofaktoru v okolí substrátu a snížení pK_a tyrosinu. Asparagin usnadňuje stabilizaci lysinu a transfer protonu. Oxidoreduktasová aktivita se však nevyskytuje u všech SDR enzymů. Mezi SDR patří například i dehydratasy, epimerasy nebo isomerasy (Bhatia et al. 2015).



Obrázek 9 – Katalytický mechanismus SDR enzymů

Zdroj: (Filling et al. 2002), upraveno

SDR enzymy mají širokou substrátovou specifitu. U převážné většiny SDR dochází k přeměně i velmi strukturně odlišných substrátů různých funkcí. SDR enzymy metabolizují α -dikarbonylové sloučeniny, chinoidy, retinoidy, určité sacharidy, steroidy, produkty peroxidace lipidů, prostaglandiny a další (Hoffmann a Maser 2007; Oppermann 2007).

Lidský organismus je vybaven 80 geny kódujících proteiny SDR. Převážná většina těchto proteinů patří mezi tzv. klasické typy SDR enzymů a další se řadí mezi atypické a prodloužené SDR. Existuje ale také další rozdělení klasických SDR, které se dále dělí na 3 sekvenční klastry. Do prvního klastru se řadí cytosolické enzymy se širokou specifitou substrátů. Do dalších dvou klastrů jsou řazeny enzymy, které jsou asociovány s membránami a které se účastní v přeměně retinoidních a steroidních substrátů. Nicméně prodloužené SDR obsahují nejen enzymy vázané na membránu, ale také cytosolické (Bhatia et al. 2015; Bray et al. 2009).

Velmi důležitou skupinou SDR enzymů jsou hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD) s různou afinitou vůči hydroxyskupinám a ketoskupinám v pozicích 3, 11 a 17 steroidního jádra. Oxidoredukční přeměny katalyzované HSD regulují aktivitu steroidních hormonů. Na základě toho má pak toto působení HSD značný vliv na fyziologické i patologické děje v organismu (Moeller a Adamski 2009; Shimodaira et al. 2010; Walker a Stewart 2003). Příkladem je redukce karbonylových skupin (např. redukce estronu na estradiol) vedoucí k vytvoření aktivních forem hormonů (Anagnostis et al. 2013).

Kromě významné úlohy SDR enzymů v endogenním metabolismu, je důležitá také role SDR enzymů při metabolismu karcinogenů, léčiv, produktů oxidačního stresu a jiných xenobiotik (Barski et al. 2008; Matsunaga et al. 2006).

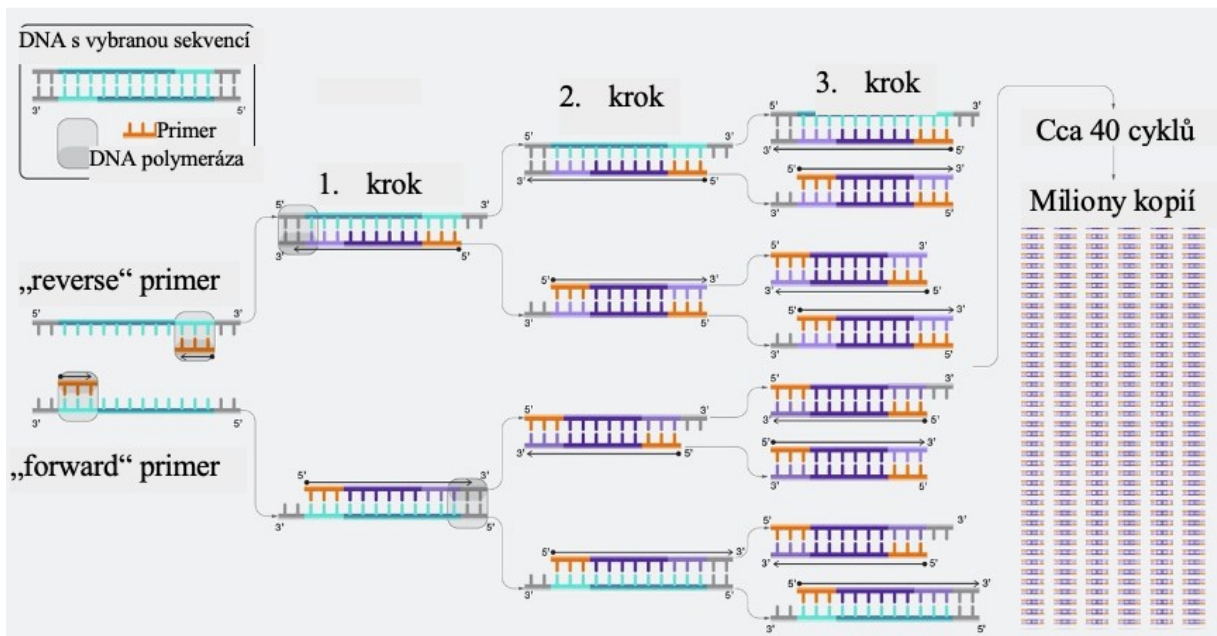
U mnoha xenobiotik je při jejich biotransformaci prokázána účast některých SDR enzymů, například karbonylreduktasy. Během biotransformace léčiv mohou tyto SDR enzymy významně ovlivnit účinnost léčby nebo toxikologii daného léčiva. Konkrétním příkladem takového působení je redukce protinádorového léčiva doxorubicinu (DOX) na metabolit doxorubicinol (DOXOL). Při této reakci dochází právě k deaktivaci DOX, a tedy ke snížení účinku tohoto léčiva. Na této reakci se významně podílí karbonylreduktasa 1 (CBR1) (Kassner et al. 2008). Také byl prokázán příspěvek CBR1 k rozvoji rezistence nádorů na léčbu DOX. Vznikající metabolit DOXOL nemá protinádorovou aktivitu, avšak může působit kardiotoxicky při dlouhodobém užívání léčiva DOX. Případný inhibitor CBR1 by mohl zvyšovat terapeutickou efektivitu DOX a snižovat jeho kardiotoxicitu (Edwardson et al. 2015).

Dalším protektivním účinkem enzymu ze skupiny SDR je přeměna karcinogenu 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonu (NNK) z tabákového kouře na jeho metabolit 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). Ten dále podléhá glukuronidaci a je vyloučen z organismu. Pokud by pomocí SDR proteinu nedošlo k redukci NNK na metabolit NNAL, NNK by byl v organismu aktivován α -hydroxylací katalyzovanou CYP. Tento proces by následně přispíval ke vzniku nádorů plic nebo pankreatu. Reakce, při které vzniká metabolit

NNAL, mohou být katalyzované řadou biotransformačních enzymů, například i pomocí zmíněné CBR3. Hlavním enzymem podílející se na této reakci je však 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 12 (17 β -HSD12) (Ashmore et al. 2018; Stepanov et al. 2008; Ter-Minassian et al. 2012).

2.7 Kvantitativní PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je laboratorní technikou pro rychlou amplifikaci (namnožení) specifického segmentu DNA. Pro průběh cyklické replikace genetické informace jsou nutné krátké syntetické fragmenty DNA, nazývané primery. Tyto specifické primery, označující se „reverse“ a „forward“, slouží ke konkrétnímu určení segmentu genomu, který má být amplifikován (Smith 2022). Na začátku reakce je dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (DNA), která se v 1. kroku rozdělí na 2 vlákna. Ve 2. kroku dojde k přidání primerů, aby se získala konkrétní sekvence určená k amplifikaci a jako poslední proběhne samotná replikace dané sekvence. Celkově probíhá asi 40 cyklů a výsledkem reakce je velké množství kopií vybraného úseku vlákna DNA. Průběh PCR reakce je ukázán na obrázku 10. Detekce amplifikovaného produktu nazývaného ampikon probíhá elektroforeticky (Dudová a Hájek 2008).



Obrázek 10 – Průběh PCR

Zdroj: (Smith 2022), upraveno

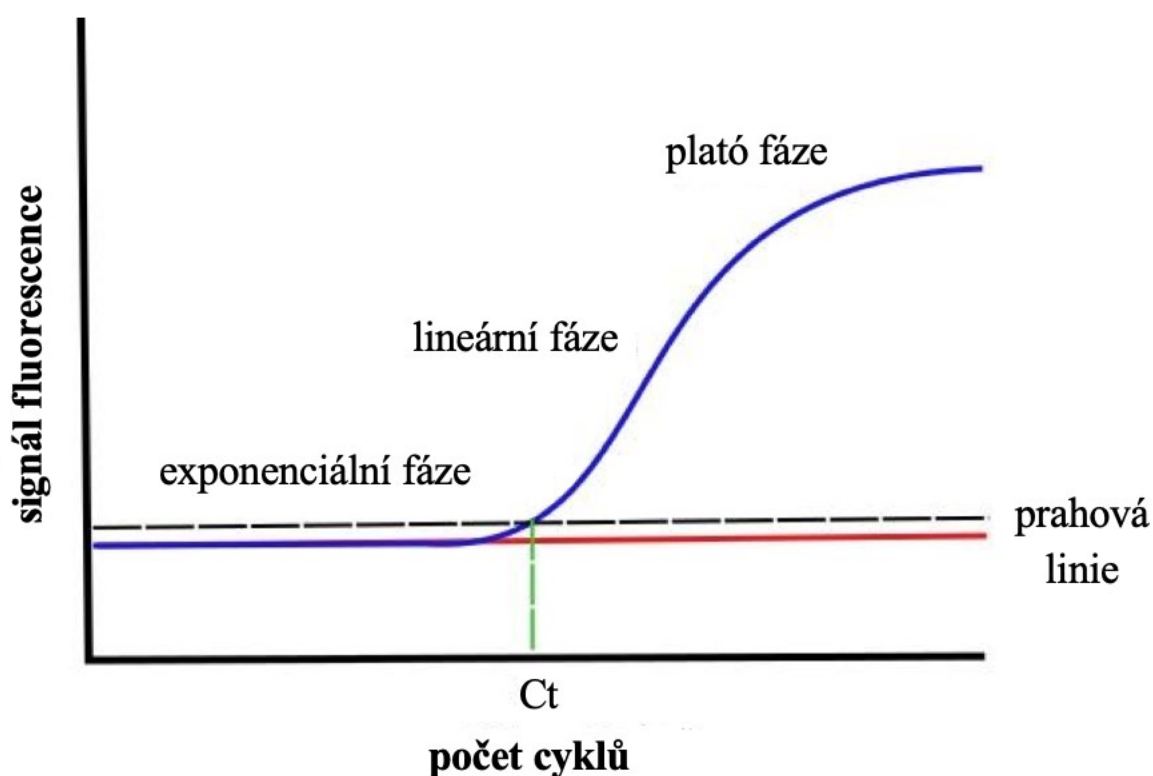
Real-Time PCR (RT-PCR) představuje modifikaci klasické PCR. Její význam spočívá v detekci a kvantifikaci mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA). Nejdříve však musí být tato mRNA převedena na komplementární DNA (cDNA) prostřednictvím reverzní transkriptasy, protože RNA nemůže být templátem pro PCR. Nakonec, stejně jako u PCR, dochází k replikaci specifické sekvence cDNA za účasti „reverse“ a „forward“ primerů. RT-PCR, nebo také kvantitativní PCR (qPCR), oproti klasické PCR umožňuje sledování a měření množství replikovaného produktu během jednotlivých cyklů v průběhu reakce, tzn. v reálném čase. Také se při reakci používá indikátor, například barvivo. Požadovanou sekvenci DNA je možné stanovit kvalitativně i kvantitativně. Proto bývá RT-PCR označováno i jako qPCR. Kvantitativně se vyhodnocuje na základě počtu kopií DNA (Dudová a Hájek 2008).

K detekci produktů RT-PCR je možné použít vícero metod. Nejčastěji používaná metoda je právě pomocí fluorescenčních barviv. Důvody jejich častého použití jsou uvedeny v následujícím odstavci. V této diplomové práci bylo jako indikátor při RT-PCR použito fluorescenční barvivo SYBR Green. Princip detekce pomocí SYBR Green spočívá v jeho vmezezení mezi jednotlivé nukleotidy dvouvláknové DNA (dsDNA). Toto vmezezení právě zajišťuje samotnou fluorescenci daných nukleotidů. Fluorescence pak exponenciálně roste spolu s množstvím dsDNA, a to v reálném čase. Konečný produkt reakce je tedy detekován na základě změny intenzity fluorescenčního záření. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikované DNA. Detekce produktů PCR reakce pomocí fluorescenčního barviva SYBR Green však není sekvenčně specifická. Během reakce může totiž docházet ke vzniku nespecifických PCR produktů či jiných produktů vzniklých reakcí samotných primerů (Bustin 2004; Dudová a Hájek 2008).

Fluorescenční barvivo SYBR Green se řadí mezi interkalační barviva. Ty mají schopnost reverzibilní vazby na kteroukoliv dsDNA, která během PCR reakce vzniká. Tím dochází ke zvyšování intenzity fluorescenčního záření. Důvodem velmi častého použití interkalačních barviv jako indikátorů pro RT-PCR je jejich emisní fluorescenční spektrum, které je velmi blízké spektru fluoresceinu. Dále je velkou výhodou, že jsou vysoce citlivé, práce s nimi je velmi jednoduchá a také levná. Nevýhodou je možnost jejich vazby na jakoukoliv dsDNA nebo jednovláknovou DNA (ssDNA), čímž může docházet k nespecifické fluorescenci. Mimo použití barviva SYBR Green při RT-PCR je možné jej použít také ke kvantifikaci mRNA, detekci vazeb mezi mRNA, virovými a bakteriálními patogeny, detekci doznívající rakoviny u postižených osob nebo například ke zjišťování genotypů (Bustin 2004).

Výsledkem RT-PCR může být amplifikační graf představující závislost fluorescenčního signálu na počtu cyklů PCR reakce. Příklad takového grafu je uveden na obrázku 11. Veličina

„threshold cycle“ (Ct) představuje číslo cyklu, v němž signál fluorescence překračuje prahovou hodnotu (threshold). Čím je hodnota veličiny Ct nižší, tím je ve vzorku přítomno více kopií sledovaného genu. V úvodních cyklech PCR reakce je zaznamenán pouze nízký signál fluorescence. Jeho následné zvýšení nad prahovou hodnotu značí hromadění produktu. Amplifikační graf je definován sigmoidním průběhem obsahujícím exponenciální, lineární a plató fázi. Velkou výhodou veličiny Ct je její dobrá reprodukovatelnost (Dudová a Hájek 2008).



Obrázek 11 – Amplifikační graf PCR reakce

Zdroj: (Oswald 2020), upraveno

Možností použití PCR a RT-PCR je mnoho. Tato metodika nachází uplatnění v různých odvětvích, například v archeologii, biologii ale zejména v biomedicínských aplikacích. V biomedicině se může použít při klonování genů, mutační analýze i určování otcovství. Dále má použití při detekci bakteriálních či virových onemocněních a dědičných chorob. Význam má ale také v onkologické diagnostice. U metody stanovení relativní genové exprese enzymů pomocí RT-PCR je velmi důležitá rychlost zpracování a izolace RNA ihned po získání vzorků nebo po jejich rozmražení. Prodleva i tří hodin může vést k zásadním změnám v genové expresi,

ke kterým dochází nejen v průběhu růstu a diferenciaci buněk, ale zejména právě v reakci na změny prostředí (Dudová a Hájek 2008).

Mezi výhody qPCR patří určitě její vysoká citlivost, potřeba malého množství vzorku a relativně krátká doba zpracování. Do citlivosti je možné zahrnout i možnost použití velmi staré a degradované DNA. Znamená to obrovskou výhodu v možnosti přezkoumání výsledků i po velmi dlouhé době. Vysoká citlivost PCR metody však může zároveň znamenat i velkou nevýhodu. Pokud je vzorek i nepatrně kontaminovaný, PCR kontaminaci zaznamená a následkem mohou být falešně pozitivní výsledky. Mezi nevýhody patří ale také potřeba znalosti sekvencí bazí replikovaného úseku DNA nebo primerů (Šršeň a Šršňová 1995).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo sledování změn v expresi vybraných genů z nadrodiny SDR během životního cyklu hlístice *H. contortus* a porovnání této exprese mezi kmeny ISE a IRE.

Jednotlivé úkoly byly:

- Izolace vajíček, larev a dospělců *H. contortus*
- Třídění dospělců *H. contortus* podle pohlaví
- Izolace RNA a příprava cDNA
- Stanovení relativní exprese vybraných SDR enzymů u vajíček, larev, samců a samic pomocí qPCR
- Sledování změn exprese vybraných SDR během ontogeneze
- Porovnání exprese vybraných SDR u samic a samců
- Porovnání exprese SDR u kmene ISE a IRE

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Zdravá jehňata, ve stáří tři až čtyř měsíců, byla perorálně nakažena suspenzí obsahující zhruba 6000 dospělých larev (L3) *H. contortus* kmene ISE (kmen citlivý na anthelmintika) a IRE (kmen rezistentní na anthelmintika). Chov zvířat probíhal ve stájích Zemědělské společnosti Býšť, která jsou akreditovaná k experimentálním účelům. Zvířata byla umístěna v boxech ve vnitřních prostorech, aby se zamezilo jejich nákaze jinými gastrointestinálními parazity. Následně na konci pátého týdne se připnutím sáčku pomocí spony na ovčí vlnu odebral vzorek ovčího trusu pro kontrolu rozšíření infekce v těle. Pokud byl rozsah infekce dostatečný, byl trus využit k získání vajíček a larev a na konci sedmého týdne bylo možné tato infikovaná jehňata omráčit a zabít. Usmrcené ovci byl odebrán slez obsahující dospělé *H. contortus*. Následný zisk červů a další zpracování probíhal v prostorách laboratoře. Práce s jehňaty byla po celou dobu 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. zabývající se ochranou pokusných zvířat.

4.1.2 Chemikálie a reagenty

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) – 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

2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty (dNTPs) – Eurogentec

TriReagent® - Molecular Research Centre

4.1.3 Technické vybavení

Automatické pipety – Eppendorf

Blokový inkubátor – Eppendorf

Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus, Thermo Scientific

Hlubokomrazící 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 systém, Applied Biosystems

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

Vortex – BioSan

4.1.4 Pracovní pomůcky

buničina

keramické kuličky

kovové kuličky

laboratorní sklo

mikrozkumavky a stojany na mikrozkumavky

mrazící stojánky na mikrozkumavky

nádoba na led

PCR destičky

pinzeta

pipetovací špičky

pipety na malé objemy

pipety

plastové zkumavky

rukavice

skleněné Pasteurovy pipety

4.2 Metody

4.2.1 Izolace vajíček z ovčího trusu

Ovčí trus se získával nasazováním sáčků pomocí skřipců na ovčí vlnu. Při izolaci vajíček z ovčího trusu se nejdříve nasbíraný trus ze sáčků vysypal do velké kádinky, následně se do nich přilila voda a jemně se za pomoci ručního mixéru vzniklá směs rozmixovala. Při samotné práci se k izolaci používala 3 velká síta. První síto mělo otvory o průměru 250 μm , druhé 100 μm a nakonec poslední síto k nejjemnějšímu prosetí disponovalo otvory o průměru 25 μm .

Pod každým sítem byla mísa k zachycení tekutiny. Krouživými pohyby rukou se vždy prosívaly výkaly od tekuté složky. Ta byla následně přenesena na jemnější síto. Zbytky výkalů z 1. a 2. síta se vyhazovaly do odpadu, zatímco vzniklý sediment z povrchu posledního síta byl přenesen do kónických zkumavek. Ty byly tímto roztokem naplněny asi do půlky jejich objemu a zbytek se doléval po okraj vodou. Na úplném konci izolace se veškeré zbytky z posledního síta vpravovaly pomocí stříčky také do kónických zkumavek, které již tímto roztokem byly naplňovány do plna. Takto připravené zkumavky s naředěným roztokem se centrifugovaly 3 minuty na 1600 otáček. Po skončení centrifugace se vzniklý supernatant na jedenkrát slil do odpadu a k sedimentu se přidával Sheatherův flotační roztok s obsahem sacharózy zhruba do objemu tří čtvrtin kónické zkumavky. Následně se to velmi pečlivě promíchalo kovovou tyčinkou. Po řádném promíchání se zkumavky doplnili flotačním roztokem až po okraj a pak se opět nechaly stočit při tisíci otáčkách na 3 minuty. Při centrifugaci s vodou se vajíčka usazovala na dno, zatímco u stáčení s flotačním roztokem zůstávala vajíčka na povrchu tekutiny. Čili se z povrchu tekuté složky každé stočené zkumavky vždy odebraly asi 3 ml roztoku do nové čisté kónické zkumavky. Ta se po odebraných vzorcích znovu doplnila flotačním roztokem. Po opětovném promíchání se proces centrifugace s flotačním roztokem opakoval 3x. Nakonec se vajíčka, která byla odebraná z povrchu tekutiny, a vypláchnutá víčka doplnila vodou a centrifugovala 3 minuty při 1600 otáčkách. Proces se při nečiré tekuté složce opakoval až do co nejlepšího vyčerení. Tímto způsobem se dosáhlo přečištění vajíček, ke kterým se v závěru přidaly 2 ml studené vody. V takto připraveném roztoku následně docházelo k počítání vajíček.

4.2.2 Zakládání koprokultury a získávání larev L3

Nejprve se promícháním vytvořila směs dubových nebo bukových pilin spolu s ovčími výkaly a přidala se voda. Vody k navlhčení směsi muselo být však tak akorát. Vyšší množství vody mohlo způsobit vznik plísně, a naopak malé množství vody mohlo zapříčinit úplné

vyschnutí směsi. Následně se směs rozdělovala do sáčků naplněných do 1/3 až 1/4. Sáček se poté uzavřel a byl na něm vytvořen otvor pro nutný přísun vzduchu ke směsi. Sáčky se nechaly inkubovat v termostatu 7 dní při +27°C. Každý den bylo potřeba směs protřepáním provzdušnit a v případě velké suchosti směsi přidat vodu pomocí stříčky. Nepřetržitý přísun světla ke kultivaci nebyl nutný. Po sedmi dnech došlo ve směsi k vylíhnutí a vyvinutí larev 3. stádia.

Po uplynutí doby inkubace se na připravenou misku opatřenou mřížkou a síťovanou hadrou rovnoměrně vysypala získaná směs s vyvinutými L3 v šířce vrstvy 1–2 cm. Směs se při nanášení na síťovaný hadr nesměla dostat pod něj, v tomto případě by došlo ke znečištění získaných L3 vodou. Následně se směs navlhčila přilítím zhruba dvou centimetrů vody z vodovodu (cca 1 litr). Teplota vody nesměla být příliš studená, ideálně okolo 30°C. Takto připravené misky se nechaly kultivovat 24 hodin při laboratorní teplotě a průběžně se kontrolovala hladina vody, aby byla směs dostatečně navlhčená. V případě potřeby se přidala voda stříčkou. V misce však nesmělo být vody příliš, aby nevzniklo bahno. Při 24hodinové kultivaci docházelo k prostupu larev do vody. Po uplynutí této doby se směs v hadře do vody vyždímala a mřížka se opláchla stříčkou, aby se veškeré zachycené L3 dostaly do vodného roztoku.

Získaný výluh se přelil do kónické odměrky o objemu 1 litr, miska se několikrát propláchla stříčkou pro získání veškerého zbytku výluhu a odměrka se po zbytek objemu doplnila vodou. Vodný roztok se v kónické odměrce nechal sedimentovat 6–12 hodin. Po sedimentaci se supernatant slil na výsledný maximální objem 200 ml. Tento roztok se opět doplnil vodou do objemu 1000 ml a nechal se znovu 6–12 hodin sedimentovat. Tento postup se opakoval do té doby, než byla voda čirá. Poslední získaný supernatant přelítím už nebyl doplněn vodou, ale nechal se sedimentovat samotný, a to minimálně 6 hodin. Přečišťování vody trvalo asi 3–4 dny.

Připravila se zhruba 800 ml kónická odměrka naplněná vodou a do ní se vložilo 10 µm síto. Síto při vkládání do odměrky muselo být zcela suché, jinak by došlo k vytvoření bublin. Síto se rychle ponořilo do kónické odměrky, aby voda dosahovala výšky v sítu po zhruba 1 cm od jeho horního okraje. Dále se pomocí pipety postupně odebíral sediment z odměrky s larvami do síta druhé odměrky (viz obrázek 12).

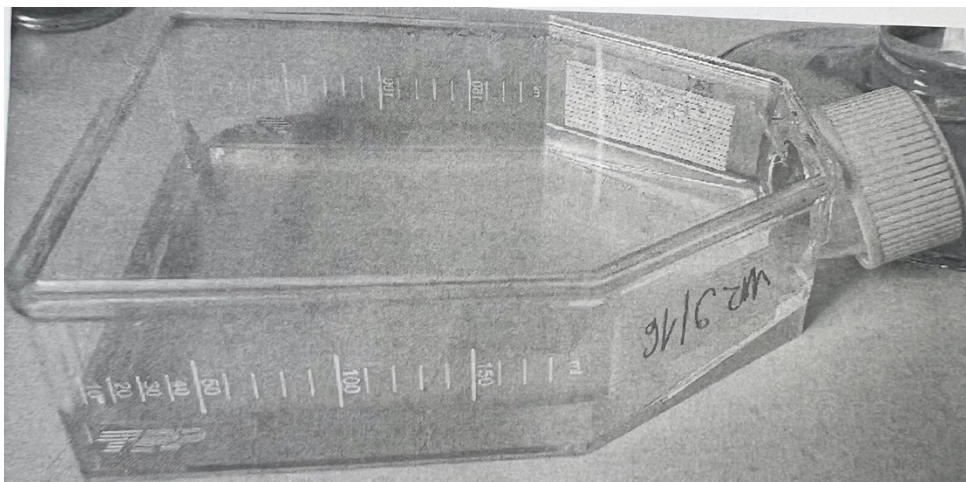


Obrázek 12 – Odebírání sedimentu s larvami pomocí pipety z první kónické odměrky do síta druhé kónické odměrky

Zdroj: přejato z pracovních postupů – katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, upraveno

Následně živé larvy po přesátí v 800 ml kónické odměrce klesly na dno a mrtvé larvy zůstaly plavat na povrchu. V této kónické odměrce opatřené čistou vodou přežily larvy 3 dny (v roztoku opatřeném sedimentem by larvy vydržely na živu kratší dobu, neboť sediment snižuje přístup vzduchu). Do skončení této doby se proto musely larvy ze dna odměrky pipetou přesunout do kultivační lahvičky (viz obrázek 13), jejíž uzávěr musel zůstat pootevřený z důvodu nutnosti přísunu vzduchu. Kultivační lahvička s larvami se skladovala v ledničce při teplotě 0–8°C. Jednou za týden se roztok s larvami promíchal. Ideální doba skladování larev za

těchto podmínek je maximálně půl roku. Delší doba skladování pak snižuje schopnost larev nakazit hostitele.



Obrázek 13 – Vodný roztok L3 v kultivační lahvičce

Zdroj: přejato z pracovních postupů – katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, upraveno

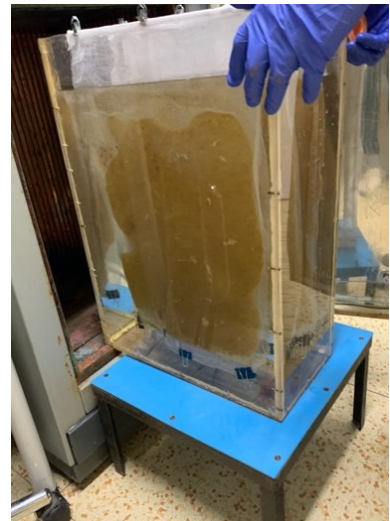
4.2.3 Izolace dospělců a jejich třídění

Odebrané ovčí slezy se v laboratoři oplachovaly fyziologickým roztokem, kam se ze slezu dospělé larvy uvolňovali. Následně se larvy sbírali postupně do velké kádinky s fyziologickým roztokem. Po jejich sedimentaci v kádince se odsálo co nejvíce vody a sediment se několikrát proplachoval fyziologickým roztokem.

Po slítí přebytečné vody se přidal v poměru 1:1 připravený agar zahřátý na 48 °C. Takto připravená směs se v tenkých vrstvách vpravila na navlhčené gázy uložené v mísách (viz obrázek 14). Poté se tyto gázy se směsí pomocí kovové tyčky a skřípců věšely do skleněné nádoby (viz obrázek 15). V této fázi bylo velice důležité, aby se gáza nedotýkala dna, neboť by se do ní červi, kteří se shlukovali právě na dně, zamotali (viz obrázek 16). Cílem této metody bylo, aby všichni dospělci přešli na dno, kde vytvářeli viditelné shluky. Následně se tyto shluky červů odsávaly do kádinky a zalily se roztokem fosfátového pufru (PBS) (viz obrázek 17).

Následovalo třídění dospělců na samečky a samičky (viz obrázek 18). Pouhým okem bylo jasně vidět, že tělo samiček bylo delší, větší, vevnitř jakoby vlnité. Celkově barva jejich těla byla jasnější, neboť jejich střeva měla červenou barvu a vajíčka byla žlutá (viz obrázek 19). Také v 1/3 jejich těla se vyskytovala vulvární patka (*vulva*), což bylo viditelné spíše pod mikroskopem. Naopak samečci byli viditelně menší, méně zbarvení (viz obrázek 20) a pod

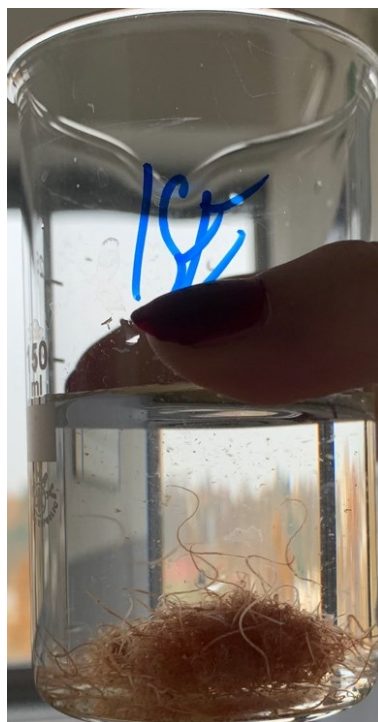
mikroskopem se na jejich konci vyskytovala tzv. kopulační burza (*bursa copulatrix*). Počítání červů probíhalo jejich přenesením pomocí velmi jemných pinzet ze shluků z kádinky do Petriho misek plněných PBS a dále do jamek příslušných destiček plněných také roztokem PBS (rozdělení probíhalo podle kmenů a pohlaví). Červi byli při rozdělování v kádinkách zahříváni a po roztržení se ukládali do termostatu.



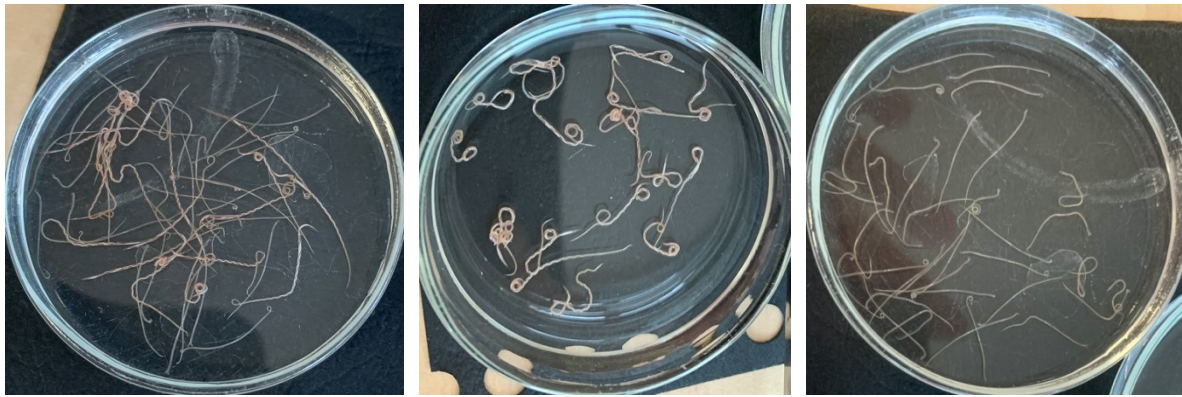
Obrázek 14 – Směs dospělců a nečistot v agaru nanesená na gáze

Obrázek 15 – Vpravování gázy se směsí dospělců a nečistot v agaru do skleněné nádoby

Obrázek 16 – Umístění gázy se směsí dospělců a nečistot v agaru ve skleněné nádobě



Obrázek 17 – Získaný shluk dospělců kmene ISE v kádince



Obrázek 18 – Dospělé hlístice na Petriho misce v PBS

Obrázek 19 – Samičky

Obrázek 20 – Samečci

4.2.4 Izolace RNA

V průběhu práce bylo nezbytně nutné dodržovat čistotu pracovního prostředí a rychlost práce, neboť ke znečištění vzorku RNAsami dochází velmi snadno a rychle. Proto bylo nutné tuto laboratorní techniku vykonávat v laminárním boxu a samozřejmě také po celou dobu v rukavicích. K izolaci celkové RNA (transferová RNA (tRNA), mRNA, ribosomální RNA (rRNA), mikroRNA) bylo využito reagentie trizolu.

Samotný pracovní postup začal vytažením vzorků vajíček, larev a dospělců z mrazícího boxu. Vzorky se uchovávaly ve zkumavkách Eppendorf při -80°C . Po rozmrazení se do vzorků ihned přidaly kovové kuličky o střední velikosti a následně se daly zkumavky zhomogenizovat. Dále pokračovala práce v laminárním boxu, kde se nejprve zhomogenizované vzorky nechaly zhruba 5 minut odležet a pak se ke vzorkům přidalo 200 μl chloroformu a opět následovalo stání vzorků v časovém rozmezí 2-3 minut při laboratorní teplotě. Dalším krokem byla centrifugace při 4°C , 12 000 g, 15 minut. Po stočení se velmi opatrně odpipetovala horní fáze do nové zkumavky. V tomto kroku bylo klíčové nenasát špičkou pipety střední nebo spodní fázi roztoku ze zkumavky, protože by došlo ke znečištění a daný vzorek by se musel celý zpracovat znovu. K odebrané horní fázi se dále přidalo 500 μl isopropanolu. Nyní bylo nutné důkladné protřepání zkumavky a opět stání vzorku při laboratorní teplotě v minimální délce trvání 10 minut. Poté následovala centrifugace při 4°C , 12 000 g, 10 minut. Okamžitě po skončení centrifugace bylo nutné opatrným odlitím či odsátím pomocí pipety odstranit veškerou vodnou fázi (supernatant) a zbylou peletu promýt jedním mililitrem 75 % ethanolu. Takto vzniklý roztok se protřepal a stočil ve vychlazené centrifuze (4°C , 7 500 g, 5 min.). Dále bylo nutné opět odstranit supernatant včetně veškerých kapek ulpělých na stěnách zkumavky, a to nejlépe

pomocí vyrobených pipet s vytaženým koncem. Následovalo sušení pelet na vzduchu a v okamžiku začínajícího zprůhledňování pelety se ihned přidalo 20 μ l diethylpyrokarbonátové (DEPC) vody, ve které se peleta rozpustila. Takto vyizolovaná RNA se důkladně promíchala, nechala stát 5 minut při laboratorní teplotě, a nakonec se ještě jednou promíchala.

4.2.5 Měření koncentrace a čistoty RNA Nanodropem

K měření koncentrace a čistoty připravené RNA se používal spektrofotometr: NanoDrop ND-1000 UV. Opět bylo nutné v průběhu celého pracovního postupu pracovat v rukavicích. Po nastavení počítače k zahájení měření se nejprve změřil slepý vzorek v podobě vody, proti kterému se měřily připravené vzorky RNA. Následně po změření kontroly se postupně nanášely na spektrofotometr kapky jednotlivých vzorků, kde se měřila jejich koncentrace včetně čistoty. Při správném měření a zpracování postupů by se hodnota čistoty (podíl absorbancí při 260 pro DNA a při 280 pro proteiny) měla pohybovat okolo 2. Hodnota koncentrace by měla mít ideálně hodnotu >500 ng/ μ l.

4.2.6 Ošetření DNAsou I

Jednotlivé připravené vzorky z předešlých kroků bylo nyní nutné přechistit vzorkem DNAsy, a to zejména z důvodu odstranění případné kontaminace v podobě genomové DNA. Celý pracovní postup se prováděl v rukavicích a v laminárním boxu, aby čistota práce byla co nejvyšší.

V případě zmrazených vzorků se po jejich rozmrazení a promíchání přidalo dané množství DEPC vody a RNA. Důležitými kroky u tohoto pracovního postupu bylo neustálé promíchávání špičkou a míchání přidávaných a vzniklých roztoků. Následně se přidala do roztoku směs pufru a DNAsy (3:1). Takto připravená směs se nechala inkubovat při 37 °C 25 minut na předem přehřátém termobloku s intenzitou třepání 500 rpm. Po inkubaci se do zkumavek s roztokem přidalo 1,5 μ l 0,1M roztoku EDTA. Následovala opět inkubace, tentokrát při teplotě 75 °C v délce trvání 10 minut. Po inkubaci se ihned zkumavka s roztokem uložila na led. Závěrečným krokem bylo přidání DEPC H₂O a promíchání.

4.2.7 Reverzní transkripce

Principem reverzní transkripce je vytvoření komplementární DNA z RNA v našem případě za použití specifického primeru.

Pokud byly vzorky zmrazené, musely se opět nechat rozmrazit a promíchat na míchačce. Do zkumavek se nejprve odpipetoval 1 μl náhodných hexamerů a 5 μl RNA a vzniklá směs se musela velmi dobře promíchat špičkou. Dále byly vzorky vloženy do cykléru pro PCR nastaveného na teplotu 65 °C na dobu pěti minut. Během zahřívání byl připraven mastermix smísením 5,5 μl H₂O, 4 μl pufru, 2 μl DTT, 2 μl dNTPS a 0,5 μl reverzní transkriptázy. Po uplynutí pěti minutové inkubace vzorků v PCR cykléru byla přidána do každé zkumavky směs připraveného roztoku o objemu 14 μl . Po zamíchání a stočení vzorků následovaly 3 série inkubací, a to za podmínek 25 °C po dobu 10 minut, 50 minut na 42 °C a nakonec 5 minut při teplotě 80 °C. Po skončení poslední inkubace se do vzorků přidalo po 180 μl redestilované H₂O. Přídavkem tohoto objemu redestilované vody se vzorky připravené cDNA zředily 10x. Tímto postupem se připravená cDNA pro uchování vložila do teploty -20 °C.

4.2.8 Kvantitativní PCR (qPCR)

V případě, že qPCR nebyla provedena bezprostředně po skončení reverzní transkripce, muselo nejprve dojít k rozmrazení vzorků cDNA. Během toho byl připraven roztok mastermixu. Ten se skládal z redestilované vody, qPCR kitu (DNA polymeráza, směs dNTPs, pufr a fluorescenční barvivo SYBR Green jako indikátor) a „reverse“ a „forward“ primerů. Dále byly použity specifické primery pro 20 SDR genů a dva referenční geny GAPDH a RNA polymerasa II (AMA). Jednotlivé komponenty byly připravovány pro každý gen zvlášť.

K provedení analýzy qPCR byla použita 384 jamková destička, mezi jejíž výhody patří zejména miniaturizace metody a tím obrovská úspora reagensů a financí. Každý vzorek se do destičky pipetoval v duplikátu. Pro stanovení relativní exprese jednoho genu byla tedy nutná analýza 34 vzorků. Konkrétně se pro analýzu jednoho genu připravil master-mix ze 57,12 μl redestilované vody, 136 μl qPCR kitu a 10,88 μl „reverse“ a „forward“ primerů. Výsledný objem směsi master-mix pro 34 vzorků činil 204 μl . Do každé jamky se pipetovalo 6 μl mastermixu a 2 μl vzorku cDNA. Finální objem každé jamky byl 8 μl . Součástí analýzy všech genů byla negativní kontrola. Do ní se napipetoval pouze master-mix a cDNA byla nahrazena redestilovanou vodou. Negativní kontrola sloužila zejména pro případný záchyt kontaminace použitých reagensů. Pokud by nebyla negativní kontrola provedena a reagensie k provedení qPCR by byly kontaminované, došlo by k vydání falešných výsledků. K pipetování byla použita automatická pipeta. Vždy po naplnění jamkové destičky došlo k jejímu pečlivému překrytí folií. Takto připravená 384 jamková destička byla umístěna do PCR přístroje.

4.3 Statistická analýza

Veškeré získané hodnoty byly zpracovány prostřednictvím programu Microsoft Excel. Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 8.0.1. V této diplomové práci bylo pracováno s naměřenými hodnotami, které byly vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

V případě této diplomové práce bylo použito metody relativní kvantifikace. Jejím prostřednictvím docházelo ke stanovení změn genové exprese vybraných vzorků a tyto hodnoty byly vztaženy ke genové expresi kontrolního vzorku. Před stanovením relativní exprese kontrolního vzorku byla provedena jeho normalizace pomocí referenčních genů GAPDH a AMA.

Nejdříve se vypočítal průměr naměřených hodnot Ct a získané hodnoty se dále použily do výpočtu $\Delta\Delta Ct = 2^{(\Delta Ct)}$. ΔCt ve vzorci představuje rozdíl průměru Ct stanovovaného genu a průměru Ct referenčních genů (GAPDH a AMA).

5. VÝSLEDKY

5.1 Exprese referenčních genů

Pro zjištění relativní genové exprese SDR enzymů bylo potřeba měření normalizovat pomocí stanovení exprese vybraných referenčních genů GAPDH a AMA pro jednotlivá vývojová stadia *H. contortus* kmene ISE a IRE.

Výsledky qPCR jsou v tabulce uvedeny jako průměrné hodnoty Ct s jejich SD, a to nejprve každého genu zvlášť (viz tabulka 1) a následně obou genů dohromady (viz tabulka 2).

Expresse GAPDH a AMA byly stabilní, a proto je bylo možné použít jako geny referenční, k nimž se stahovaly výsledky relativní genové exprese SDR enzymů.

Tabulka 1 – Expresse referenčního genu GAPDH a referenčního genu AMA u všech vývojových stádií *H. contortus* kmene ISE a IRE

	Vývojová stádia	GAPDH	AMA
	<i>H. contortus</i>	Ø Ct ± SD	
ISE	vajíčka	22,5 ± 0,4	22,1 ± 0,3
	L1	20,2 ± 0,5	23,2 ± 0,3
	L3	21,4 ± 0,3	22,7 ± 0,2
	xL3	19,8 ± 0,3	21,3 ± 0,4
	samice	22,4 ± 1,0	24,9 ± 0,9
	samci	21,5 ± 0,3	25,5 ± 0,3
IRE	vajíčka	22,5 ± 0,2	22,1 ± 0,2
	L1	19,3 ± 0,3	22,8 ± 0,2
	L3	19,3 ± 0,4	22,3 ± 0,2
	xL3	18,3 ± 0,4	21,5 ± 0,3
	samice	20,9 ± 0,3	23,7 ± 0,3
	samci	20,1 ± 0,4	24,3 ± 0,5

Tabulka 2 – Expresse referenčních genů GAPDH a AMA u všech vývojových stádií *H. contortus*

	Vývojová stádia <i>H. contortus</i>	GAPDH + AMA Ø Ct ± SD
ISE	vajíčka	22,3 ± 0,4
	L1	21,7 ± 0,4
	L3	22,1 ± 0,3
	xL3	20,6 ± 0,3
	samice	23,7 ± 0,9
	samci	23,5 ± 0,3
IRE	vajíčka	22,3 ± 0,2
	L1	21,1 ± 0,2
	L3	20,8 ± 0,3
	xL3	19,9 ± 0,4
	samice	22,3 ± 0,3
	samci	22,2 ± 0,4

5.2 Relativní exprese vybraných SDR genů

Stanovovala se relativní exprese konkrétně dvaceti SDR genů u všech vývojových stádií *H. contortus* pomocí metody qPCR. Měření probíhalo za účelem zjištění změn (nárůstu či úbytku) relativní genové exprese SDR enzymů během ontogeneze a k jejich vzájemnému porovnání mezi kmenem citlivým a rezistentním a jednotlivými vývojovými stádii.

Výsledné hodnoty Ct pro SDR 1 – SDR 20 jsou níže v tabulkách uvedeny jako průměr ± SD biologických duplikátů vajíček, larev a dospělců. Výsledky jsou uvedeny pro kmen ISE (viz tabulka 3) a pro kmen IRE (viz tabulka 4).

U citlivého kmene (viz tabulka 3) vykázal vysokou relativní genovou expresi enzym SDR 3, a to ve hlavně u L3. Vysokou expresi vykázaly také geny SDR 1 a SDR 18 u vývojového stádia L1 a SDR 5 u samců. Naopak velmi malou nebo žádnou relativní expresi vykázaly geny SDR 12 a SDR 20, a to u všech vývojových stádií.

Tabulka 3 – Relativní exprese SDR genů vztažené na průměr relativní exprese referenčních genů pro každé vývojové stádium *H. contortus* kmene ISE

Vývojová stádia <i>H. contortus</i> kmene ISE	Vajíčka	L1	L3	xL3	Samice	Samci
	Ø Ct ± SD					
SDR 1	0,142 ± 0,008	0,469 ± 0,054	0,277 ± 0,032	0,330 ± 0,017	0,053 ± 0,005	0,061 ± 0,004
SDR 2	0,019 ± 0,002	0,068 ± 0,013	0,085 ± 0,013	0,118 ± 0,014	0,026 ± 0,004	0,007 ± 0,001
SDR 3	0,164 ± 0,007	0,655 ± 0,083	0,853 ± 0,080	0,713 ± 0,108	0,159 ± 0,030	0,206 ± 0,035
SDR 4	0,001 ± 0,000	0,048 ± 0,003	0,012 ± 0,001	0,005 ± 0,000	0,012 ± 0,002	0,037 ± 0,005
SDR 5	0,020 ± 0,001	0,296 ± 0,033	0,271 ± 0,033	0,203 ± 0,028	0,241 ± 0,039	0,623 ± 0,081
SDR 6	0,226 ± 0,028	0,265 ± 0,047	0,139 ± 0,018	0,110 ± 0,010	0,077 ± 0,020	0,041 ± 0,012
SDR 7	0,018 ± 0,001	0,043 ± 0,002	0,052 ± 0,003	0,035 ± 0,002	0,028 ± 0,004	0,016 ± 0,002
SDR 8	0,042 ± 0,001	0,087 ± 0,005	0,051 ± 0,004	0,050 ± 0,004	0,021 ± 0,004	0,028 ± 0,003
SDR 9	0,017 ± 0,001	0,034 ± 0,002	0,030 ± 0,003	0,033 ± 0,003	0,013 ± 0,002	0,011 ± 0,001
SDR 10	0,001 ± 0,000	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,016 ± 0,004	0,005 ± 0,002	0,002 ± 0,001
SDR 11	0,023 ± 0,001	0,036 ± 0,003	0,061 ± 0,004	0,059 ± 0,007	0,011 ± 0,003	0,009 ± 0,003
SDR 12	0,002 ± 0,000	0,006 ± 0,001	0,001 ± 0,000	nd	nd	nd
SDR 13	0,004 ± 0,001	0,028 ± 0,004	0,008 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,014 ± 0,007	0,004 ± 0,000
SDR 14	0,215 ± 0,010	0,074 ± 0,003	0,185 ± 0,014	0,157 ± 0,001	0,023 ± 0,003	0,012 ± 0,000
SDR 15	0,008 ± 0,000	0,117 ± 0,001	0,041 ± 0,004	0,045 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,009 ± 0,003
SDR 16	nd	0,016 ± 0,001	0,116 ± 0,007	0,102 ± 0,003	0,006 ± 0,000	0,001 ± 0,000
SDR 17	0,028 ± 0,001	0,109 ± 0,004	0,043 ± 0,005	0,044 ± 0,004	0,036 ± 0,006	0,011 ± 0,001
SDR 18	0,310 ± 0,014	0,598 ± 0,026	0,371 ± 0,049	0,526 ± 0,016	0,106 ± 0,015	0,035 ± 0,005
SDR 19	0,019 ± 0,008	0,027 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,007 ± 0,006	0,014 ± 0,011
SDR 20	0,003 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,000	nd

Tabulka 4 – Relativní exprese SDR genů vztažené na průměr relativní exprese referenčních genů pro každé vývojové stádium *H. contortus* kmene IRE

Vývojová stádia <i>H. contortus</i> kmene IRE	Vajíčka	L1	L3	xL3	Samice	Samci
	Ø Ct ± SD					
SDR 1	0,222 ± 0,016	0,792 ± 0,059	0,083 ± 0,004	0,076 ± 0,006	0,081 ± 0,010	0,105 ± 0,008
SDR 2	0,020 ± 0,002	0,106 ± 0,013	0,050 ± 0,006	0,044 ± 0,011	0,020 ± 0,006	0,009 ± 0,002
SDR 3	0,170 ± 0,023	0,883 ± 0,140	0,133 ± 0,021	0,113 ± 0,019	0,140 ± 0,016	0,167 ± 0,035
SDR 4	0,001 ± 0,000	0,035 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,003 ± 0,000	0,012 ± 0,001	0,028 ± 0,004
SDR 5	0,022 ± 0,002	0,241 ± 0,010	0,136 ± 0,017	0,145 ± 0,015	0,223 ± 0,012	0,557 ± 0,040
SDR 6	0,298 ± 0,032	0,276 ± 0,027	0,077 ± 0,015	0,072 ± 0,022	0,095 ± 0,021	0,037 ± 0,010
SDR 7	0,018 ± 0,001	0,061 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,033 ± 0,010	0,020 ± 0,002
SDR 8	0,039 ± 0,001	0,104 ± 0,004	0,018 ± 0,001	0,016 ± 0,002	0,020 ± 0,002	0,024 ± 0,001
SDR 9	0,024 ± 0,002	0,035 ± 0,001	0,011 ± 0,000	0,011 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,015 ± 0,001
SDR 10	0,002 ± 0,001	0,008 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,006 ± 0,000	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,002
SDR 11	0,025 ± 0,002	0,043 ± 0,003	0,044 ± 0,002	0,041 ± 0,004	0,010 ± 0,002	0,007 ± 0,000
SDR 12	0,008 ± 0,000	0,023 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
SDR 13	0,009 ± 0,002	0,063 ± 0,009	0,004 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,032 ± 0,012	0,012 ± 0,003
SDR 14	0,098 ± 0,027	0,047 ± 0,001	0,053 ± 0,005	0,051 ± 0,002	0,023 ± 0,011	0,005 ± 0,002
SDR 15	0,009 ± 0,002	0,167 ± 0,014	0,018 ± 0,002	0,013 ± 0,001	0,013 ± 0,002	0,014 ± 0,002
SDR 16	0,002 ± 0,001	0,050 ± 0,003	0,270 ± 0,027	0,212 ± 0,042	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,000
SDR 17	0,034 ± 0,005	0,144 ± 0,015	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,003	0,033 ± 0,008	0,014 ± 0,004
SDR 18	0,426 ± 0,025	0,872 ± 0,016	0,088 ± 0,013	0,080 ± 0,007	0,134 ± 0,027	0,062 ± 0,008
SDR 19	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,000	nd	nd	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
SDR 20	0,004 ± 0,000	0,007 ± 0,001	0,001 ± 0,000	nd	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000

U kmene rezistentního byly nejvíce exprimované enzymy SDR 1, SDR 3 a SDR 18 (viz tabulka 4). Téměř žádná exprese byla zjištěna u SDR 10, SDR 19 a SDR 20. Opakovaně se to týkalo všech vývojových stádií změřených u těchto enzymů. Veškeré výsledky rezistentního kmene jsou k dispozici v tabulce 4.

5.3 Změny v expresi vybraných SDR genů během ontogeneze

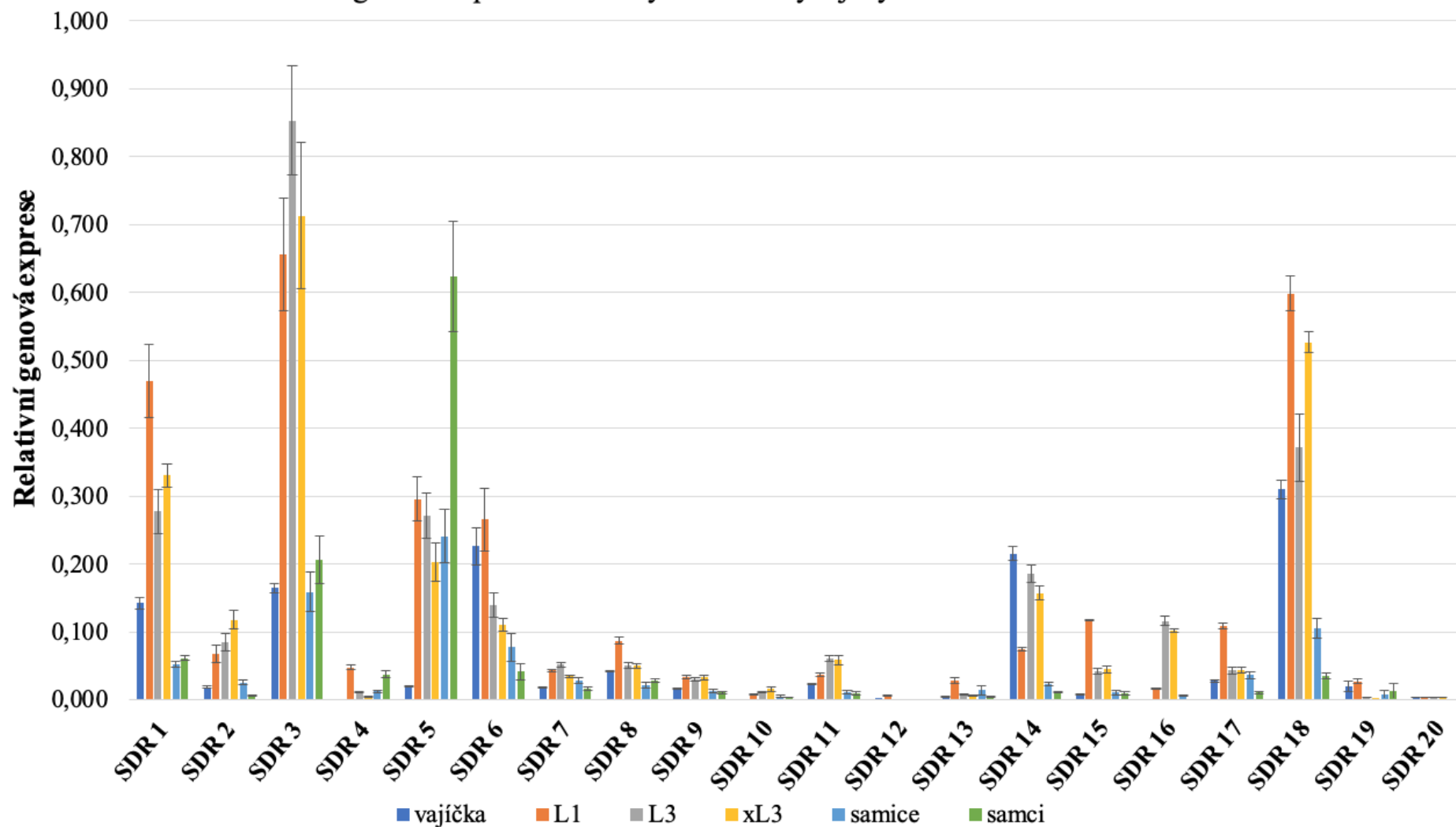
Relativní genová exprese dvaceti SDR genů byla porovnáвана u všech vývojových stádií *H. contortus*. Výsledné hodnoty Ct jsou v grafech uvedeny jako průměry biologických duplikátů pro kmen ISE (viz obrázek 21) a kmene IRE (viz obrázek 22).

U citlivého kmene gen SDR 1 byl exprimován relativně významně ve všech vývojových stádiích, přičemž jeho exprese byla nejvyšší u larev, trochu nižší u vajíček a nejnižší u dospělců. Exprese genu SDR 2 byla celkově nízká. Nejvyšší hodnotou disponovaly xL3 a následně ostatní larvy. Srovnatelné hodnoty u SDR 2 vykazaly vajíčka a samice. U samců zde byla relativní exprese velmi nízká. Gen SDR 3 dosahoval vůbec nejvyšší hodnoty relativní exprese pro citlivý kmen, a to nejvyšší u larev 3. stádia, dále u xL3 a L1. Nízkou expresi prokázal gen SDR 4 u 1. larválního stádia a u samců. I u ostatních vývojových stádií byl exprimován velmi málo. Genová exprese enzymu SDR 5 dospělých samců byla druhou nejvyšší po expresi enzymu SDR 3 u L3 citlivého kmene. U ostatních vývojových stádií byl tento gen exprimován také významně, nejvíce u L1 a nejméně u xL3. K relativně vysoké expresi genu SDR 6 došlo také u L1 následovaného stádiem vajíček, nejnižší exprese SDR 6 byla zjištěna u dospělců. Exprese genu SDR 7 byla celkově velmi nízká, nejznatelnější u L3, nejméně pak u vajíček. Gen SDR 8 byl nejvíce exprimován u L1, nejméně u dospělců. Opět k velmi nízké expresi, a to u všech vývojových stádií, došlo u genů SDR 9 i SDR 10. Také exprese genu SDR 11 byla v nízkých hodnotách, významnější exprese byla pozorována jen u L3 a xL3. Enzymy SDR 12 a SDR 13 byly rovněž málo exprimovány. Výraznější míra genové exprese byla zjištěna u SDR 14. U tohoto enzymu byla nejvyšší exprese zjištěna u vajíček, naopak nejnižší expresi vykazoval gen SDR 14 u dospělců. K vyšší expresi došlo u L1 a dalších larev v případě SDR 15 a u L3 a xL3 v případě genu SDR 16. Geny SDR 15 a 16 se ve zbylých vývojových stádiích exprimovaly velmi málo. Exprese genu SDR 17 byla nejzřetelnější u L1, dále pak u ostatních larev a samic. Nejméně se gen SDR 17 exprimoval u vajíček a samců. Gen SDR 18 byl nejvíce exprimován u larev 1. stádia, následně u neopouzdrěných a opouzdrěných larev 3. stádia. Velmi vysokou hodnotu relativní exprese vykázal gen SDR 18 také u vajíček. Nejméně se pak

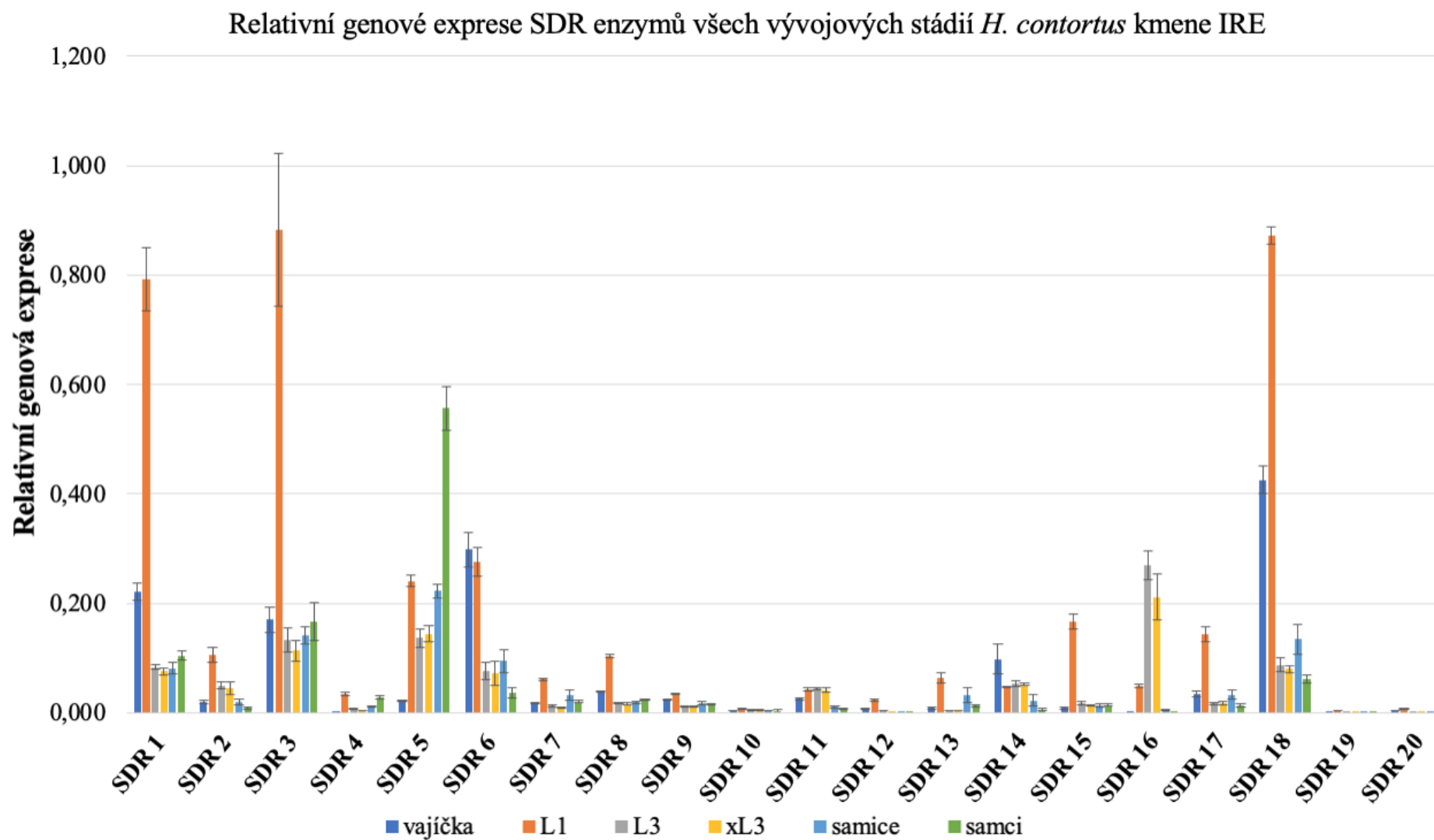
projevila exprese tohoto genu u samců. Expese enzymu SDR 19 a SDR 20 byla velmi nízká až nulová.

U rezistentního kmene gen SDR 1 vykázal třetí nejvyšší nárůst exprese, a to ve stádiu L1. K vysoké expresi došlo ale také u ostatních vývojových stádií, nejvíce ve stádiu vajíček. Gen SDR 2 vykázal nízkou expresi u všech vývojových stádií. Nejvyšší expresí z rezistentního kmene disponoval gen SDR 3 v 1. vývojovém stádiu larvy. Byl ale velmi významně exprimován i v ostatních stádiích. U SDR 4 došlo k velmi malé expresi ve stádiu L1 a dospělých samců. Vajíčka nebyla exprimována vůbec. Signifikantní nárůst relativní exprese vykázal gen SDR 5, a to nejvíce u dospělých samců. Pouze ve stádiu vajíček byla expese několikanásobně nízká. Vajíčka ze všech vývojových stádií naopak vykázala nejvyšší hodnotu u SDR 6. Genová exprese ostatních stádií byla však také relativně vysoká. Geny SDR 7–13 disponovaly velmi nízkou expresí. Stádium L1 u SDR 7, 8 a 13 se z těchto genů projevilo nejvíce, geny SDR 8 a 12 pak téměř v ostatních vývojových stádiích nejméně. K relativně vysoké expresi došlo u SDR 14 ve vývojovém stádiu vajíček následované larvami. U dospělců zde gen vykázal velmi nízké hodnoty exprese. Taktéž gen SDR 15 se projevil signifikantním nárůstem exprese, a to ve stádiu L1. Ostatní vývojová stádía disponovala nízkými hodnotami exprese, nejméně však vajíčka. U genu SDR 16 došlo k relativně významné expresi ve všech larválních stádiích, nejvíce u L3. Daný gen se projevil nepatrnou až žádnou expresí vajíček a dospělců. K signifikantnímu nárůstu exprese došlo také u genu SDR 17 vývojového stádía L1. Ostatní stádía se tolik neprojevila. Expese genu SDR 18 byla velmi významná ve stádiu L1, kde expese činila 2. nejvyšší hodnotu rezistentního kmene. Následně také ve stádiu vajíček došlo k velmi vysokému nárůstu exprese. I ostatní stádía se projevila relativně vysokou genovou expresí, nejvíce dospělé samice a nejméně dospělí samci. Vůbec k nejnižším až nulovým expresím kmene IRE došlo u genů SDR 19 a SDR 20, a to ve všech vývojových stádiích.

Relativní genové exprese SDR enzymů všech vývojových stádií *H. contortus* kmene ISE



Obrázek 21 – Relativní genová exprese vybraných SDR enzymů u všech vývojových stádií *H. contortus* kmene ISE



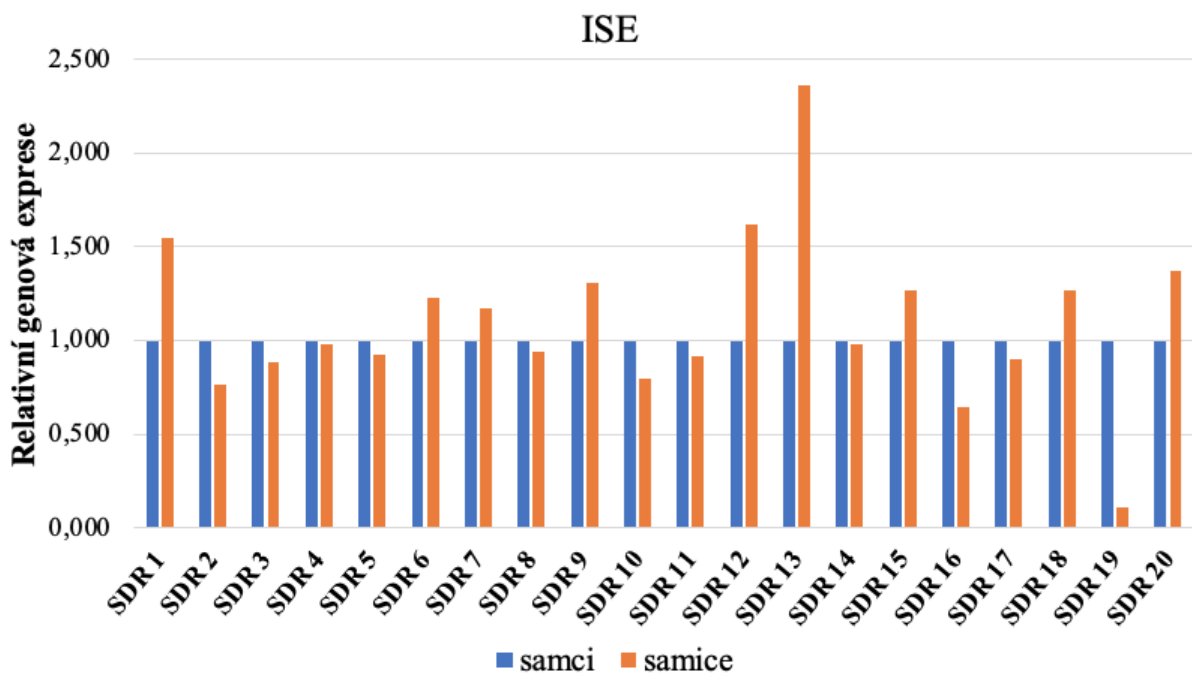
Obrázek 22 – Relativní genová exprese vybraných SDR enzymů u všech vývojových stádií *H. contortus* kmene IRE

5.4 Rozdíly v expresi vybraných SDR genů mezi samci a samicemi

Výsledné naměřené hodnoty relativní genové exprese 20 SDR enzymů se následně použily také k jejich porovnání mezi samci (modrá) a samicemi (oranžová) v rámci jednotlivých kmenů ISE a IRE.

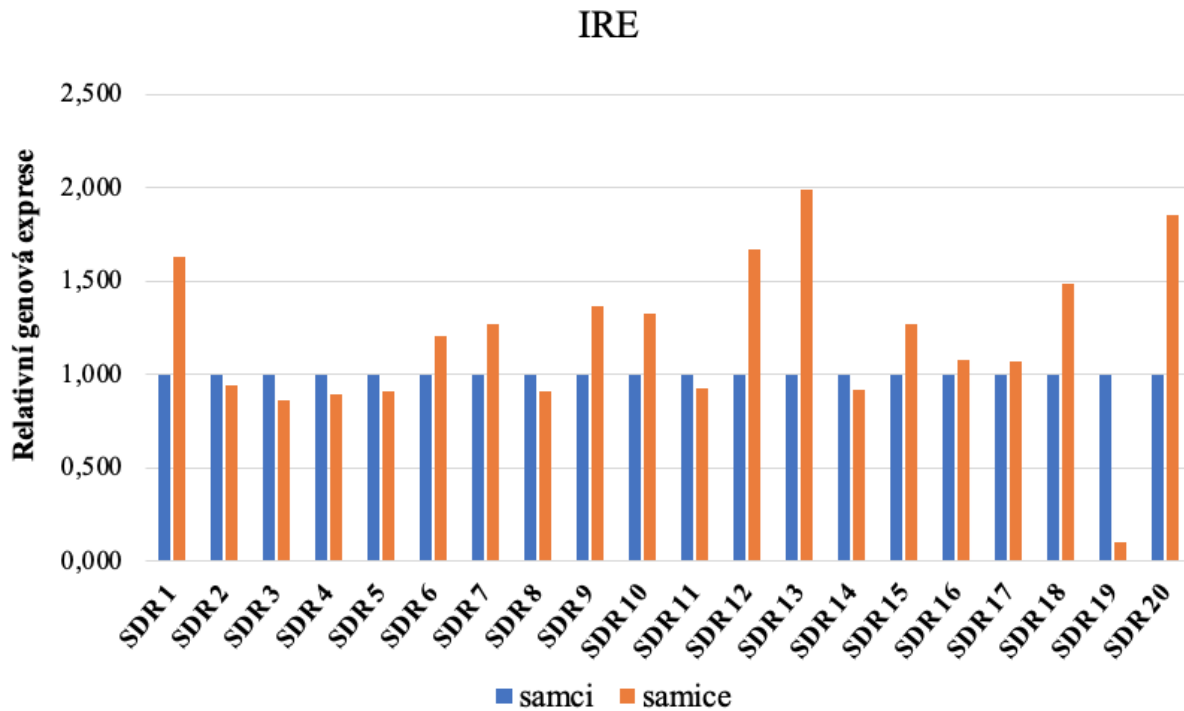
Výsledné hodnoty Ct všech SDR genů jsou níže v grafech uvedeny jako průměry biologických duplikátů u dospělých samců a samic kmenů ISE (viz obrázek 23) a IRE (viz obrázek 24).

U citlivého kmene (viz obrázek 23) je vidět, že samice *H. contortus* disponovaly ve třech případech značně vyšší relativní genovou expresí oproti samcům, a to u SDR 1, SDR 12 a SDR 13. Naopak v případě SDR 19 měly samice oproti samcům mnohonásobně sníženou genovou expresi. Samci měly i v dalších případech vyšší expresi například u SDR 16. Relativní genová exprese SDR 4, SDR 5, SDR 8 a SDR 14 se u samic i samců (kmene ISE) téměř shodovala.



Obrázek 23 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů mezi dospělými samicemi a samci *H. contortus* kmene ISE

U rezistentního kmene (viz obrázek 24) vyšly výsledky takřka obdobně jako u kmene citlivého. Enzymy SDR 1, SDR 12, SDR 13, SDR 18 a SDR 20 samic *H. contortus* kmene IRE vykazaly velmi výraznou expresi oproti samcům téhož kmene. Stejně tak, jak tomu bylo u kmene ISE, i u kmene IRE byla genová exprese SDR 19 výrazně nižší u samic oproti samcům.

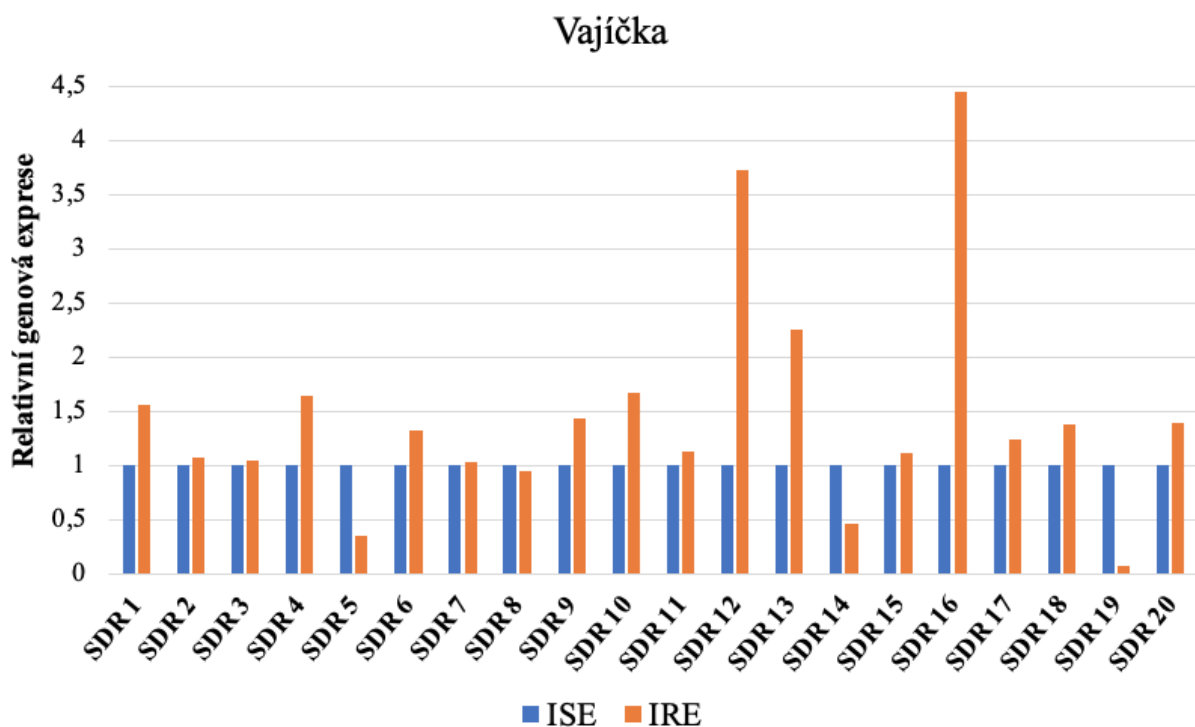


Obrázek 24 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů mezi dospělými samicemi a samci *H. contortus* kmene IRE

5.5 Rozdíly v expresi vybraných SDR genů mezi kmeny ISE a IRE

Porovnání exprese 20 isoformů SDR u rezistentního kmene IRE vůči citlivému kmeni ISE u jednotlivých vývojových stádií *H. contortus* demonstrují obrázky 25–30.

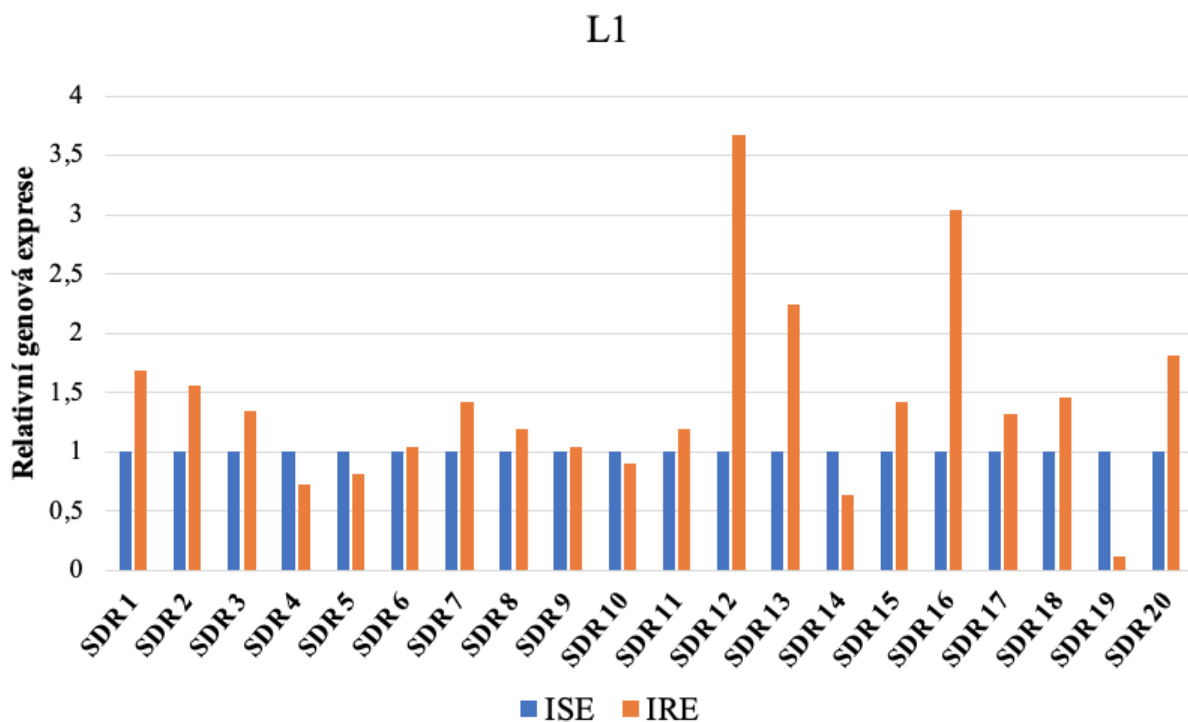
Opět jsou naměřené hodnoty použity jako průměry Ct biologických duplikátů všech vývojových stádií pro 20 SDR enzymů.



Obrázek 25 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu vajíčka *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE

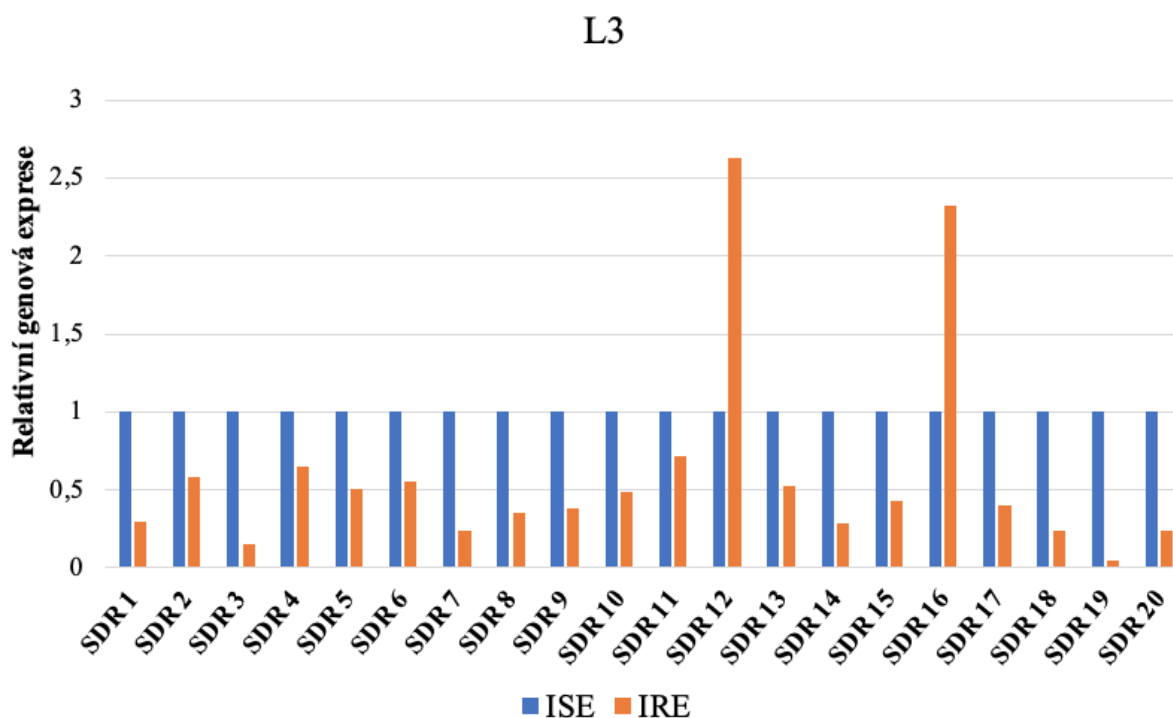
Na obrázku 25 jsou uvedeny relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 ve vývojovém stádiu vajíček *H. contortus* v porovnání mezi kmenem ISE a IRE. Z výsledků je zřejmé, že exprese většiny SDR enzymů u vajíček byly vyšší u kmene IRE než u kmene ISE, a to nejvíce u SDR 12, SDR 13 a SDR 16. Naopak byl zjištěn výrazný pokles genové exprese SDR 19 u IRE oproti ISE. U vajíček kmene ISE také SDR 5 a SDR 14 vykazovaly vyšší genovou expresi než u vajíček kmene IRE. Velmi vyrovnanou expresi vykazovaly enzymy SDR 2, SDR 3, SDR 7 a SDR 8 obou kmenů.

Obrázek 26 znázorňuje porovnání relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 ve vývojovém stádiu L1 *H. contortus* mezi kmenem citlivým a rezistentním. Výsledky byly velmi obdobné jako u vajíček, neboť k velmi výraznému zvýšení exprese u kmene IRE oproti kmene ISE došlo u enzymů SDR 12, 13 a 16. Podobně jako u vajíček *H. contortus* došlo i zde k výrazně snížené genové expresi u SDR 19 u rezistentního kmene. U enzymů SDR 4, 5 a 14 byla genová exprese vyšší u kmene ISE než u IRE. Vyrovnané hodnoty genové exprese u L1 larev kmenů ISE i IRE vykazoval enzym SDR 9.



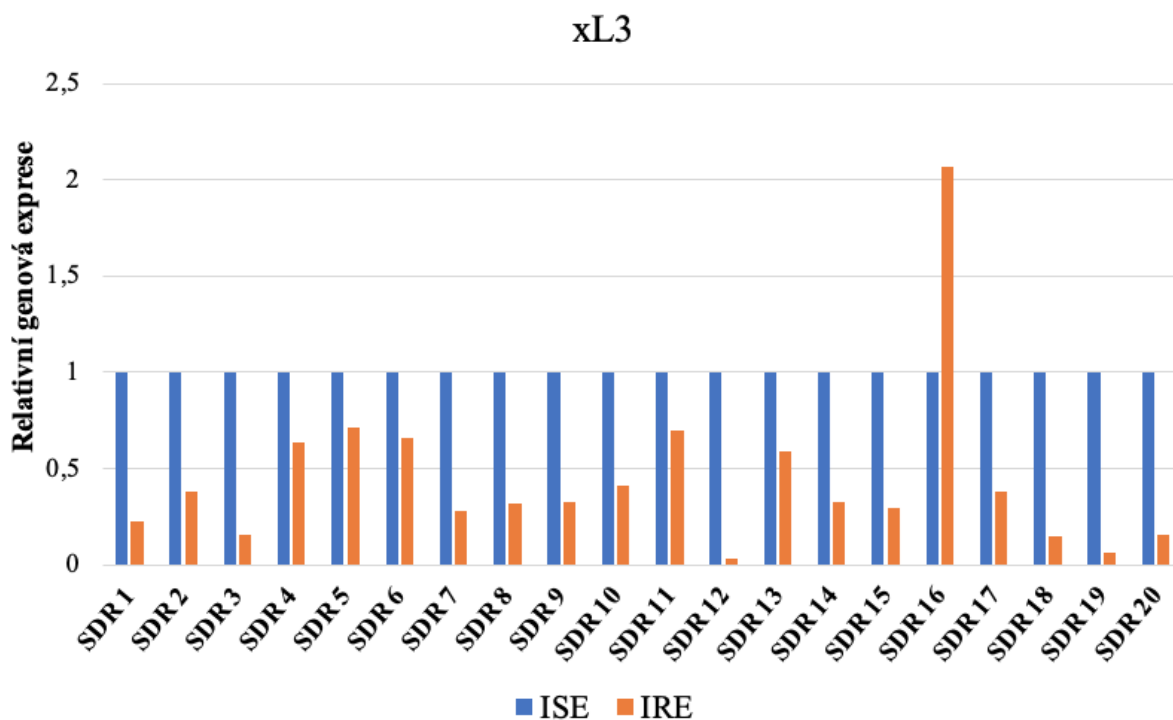
Obrázek 26 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu L1 *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE

Na obrázku 27 jsou uvedeny relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 ve vývojovém stádiu L3 *H. contortus* v porovnání mezi kmenem ISE a IRE. Překvapivě u L3 kmen ISE v převážné většině disponoval vyššími hodnotami relativní exprese většiny enzymů SDR ve srovnání s kmenem IRE. Pouze u SDR 12 a SDR 16 byla zjištěna vyšší exprese u IRE než u ISE. Naopak nejslabší expresi u kmene IRE vůči kmeni ISE vykazovaly enzymy SDR 3 a SDR 19.

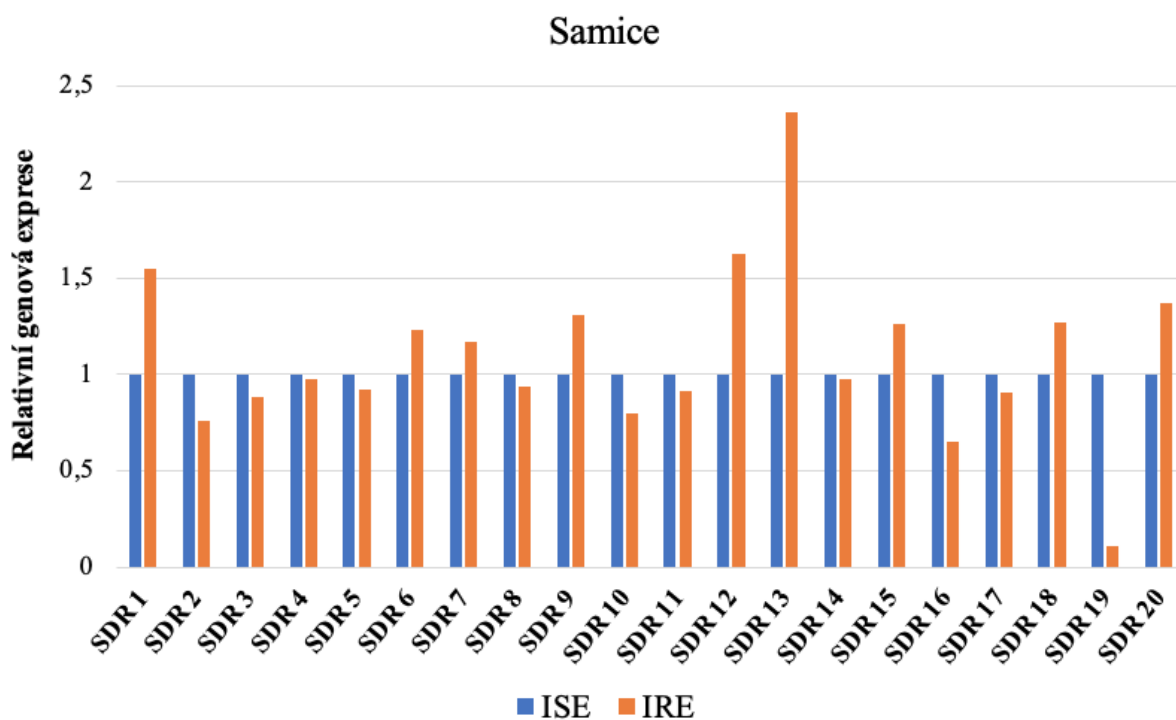


Obrázek 27 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu L3 *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE

Obrázek 28 ukazuje relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 ve vývojovém stádiu xL3 *H. contortus* v porovnání mezi kmenem citlivým a rezistentním kmenem. Podobně jako u larev L3 i u larev xL3 byla u kmene IRE vyšší relativní exprese většiny SDR oproti citlivému kmeni ISE. Pouze enzym SDR 16 vykazoval zhruba dvojnásobně vyšší expresi u kmene IRE vůči ISE. Naopak u enzymů SDR 12 a SDR 19 byla relativní genová exprese u IRE velmi nízká.



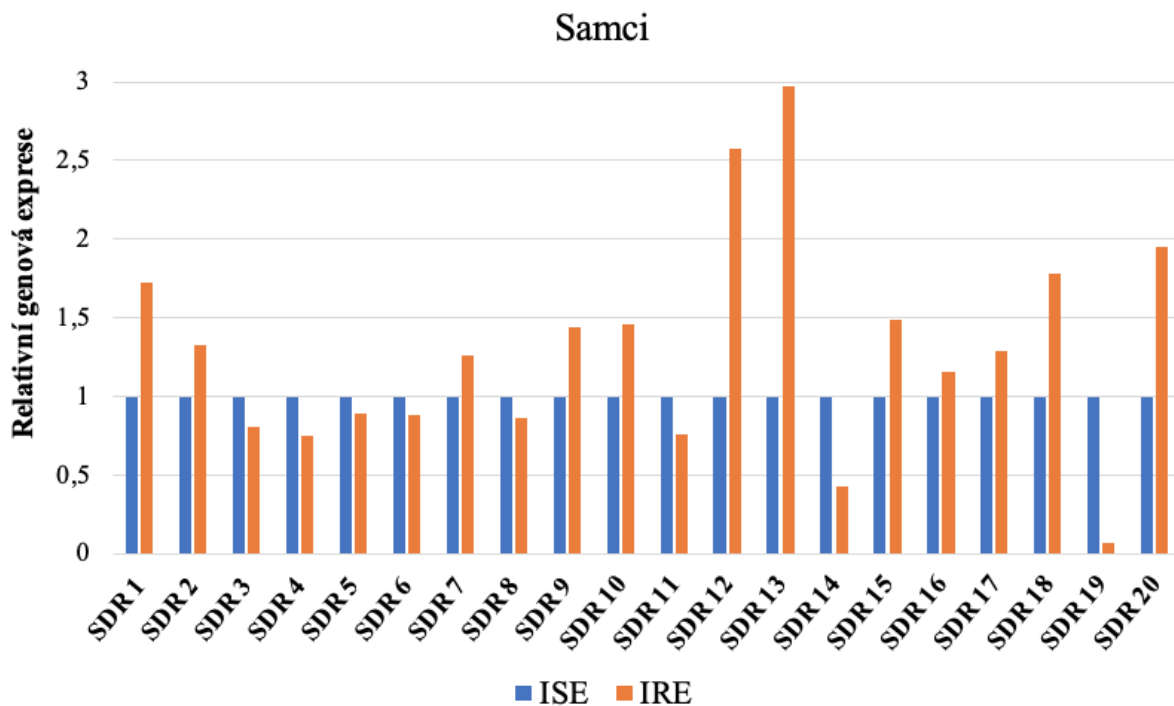
Obrázek 28 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu xL3 *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE



Obrázek 29 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů u dospělých samic *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE

Na obrázku 29 jsou znázorněny relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 dospělých samic *H. contortus* v porovnání mezi kmenem ISE a IRE. Enzymy SDR 1, 12, 13, 18 a 20 kmene IRE byly více exprimovány u rezistentního kmene oproti kmeni citlivému. K více jak dvojnásobnému zvýšení exprese však došlo pouze u enzymu SDR 12 a SDR 13. Samice rezistentního kmene naopak měly několikanásobně sníženou genovou expresi enzymu SDR 19.

Na obrázku 30 jsou uvedeny relativní genové exprese enzymů SDR 1 – SDR 20 dospělých samců *H. contortus* v porovnání mezi kmenem citlivým a rezistentním. U samců byl opět nejpatrnější nárůst relativní genové exprese rezistentního kmene u SDR 12 a SDR 13. Shodně jako u samic byla velmi nízká genová exprese SDR 19 kmene IRE vůči kmeni ISE. Dále také exprese SDR 14 byla o více než polovinu menší u rezistentního kmene oproti kmeni citlivému.



Obrázek 30 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů u dospělých samců *H. contortus* mezi kmenem ISE a IRE

6. DISKUSE

Velmi vážným problémem při léčbě hemonchóz je stále se zvyšující rezistence vlasovky slezové na podávaná anthelmintika všech hlavních skupin. Rezistence je obecně definována jako schopnost organismu vypořádat se s běžnou dávkou anthelmintika, která by za normálních okolností vyvolala změnu ve prospěch organismu. V praxi lze s ohledem na rezistenci na anthelmintika u gastrointestinálních parazitů hlístic, jako je například *H. contortus*, na rezistenci nahlížet jako na změnu v reakci při léčbě anthelmintiky. Tato změna se projevuje sníženou účinností léčiva či celkovou neúčinností. Vážným dopadem této rezistence jsou zvyšující se finanční náklady za léčbu hemonchóz a zvýšený úhyn skotu a malých přežvýkavců po celém světě. Příčin vzniku rezistence na podávaná anthelmintika je několik. Především je to však podávání těchto léčiv hospodářským zvířatům v nepřiměřených dávkách a také jejich časté a neodůvodněné užívání (Kotze a Prichard 2016; Yan et al. 2021).

Mechanismy vzniku lékové rezistence mohou být založeny na farmakodynamice nebo farmakokinetice. Farmakokineticky zprostředkovaná rezistence spočívá ve zvýšené expresi, resp. aktivitě enzymů metabolizujících xenobiotika, tj. biotransformačních enzymů a lékových transportérů. Hlístice jsou známy tím, že jejich výbava čítá řadu enzymů metabolizujících xenobiotika. Funkce těchto enzymů je především detoxikace a eliminace xenobiotik. Tyto enzymy zprostředkovávají hlísticím účinnou obranu i vůči negativnímu působení anthelmintik (Kellerová et al. 2019; Stuchlíková Raisová et al. 2018).

Pro udržitelnou a úspěšnou léčbu parazitóz je nezbytné detailní poznání parazitů včetně jejich genomu, transkriptomu, proteomu, lipidomu a metabolomu. Pokroky v této oblasti přináší značné výhody ve všech aspektech boje proti infekcím způsobených různými druhy parazitů. Rozdíly v molekulárních strukturách a metabolických drahách u parazitů a jejich hostitelů mohou přispět k identifikaci potenciálních nových cílů lékové a/nebo vakcinační terapie. Rozdíly v molekulárních strukturách a metabolických drahách u kmenů citlivých a rezistentních vůči léčivům mohou pomoci poznat mechanismy lékové rezistence u parazitů (Matoušková et al. 2016).

Cílem této diplomové práce bylo stanovení exprese vybraných genů z nadrodiny SDR u všech vývojových stádií *H. contortus* a porovnání této exprese mezi kmenem ISE (citlivý kmen na anthelmintika) a kmenem IRE (rezistentní kmen na anthelmintika).

Z porovnání exprese jednotlivých SDR v jednotlivých vývojových stádiích je zřejmé, že během ontogeneze se exprese těchto enzymů výrazně mění. U většiny SDR larvy disponovaly několikanásobně vyššími hodnotami genové exprese oproti vajíčkům i dospělcům. Tato vysoká

exprese u volně žijících larev může souviset s jejich nutnou ochranou před reaktivními karbonyly, které se ve vnějším prostředí vyskytují. Ve studii Michaela a Subramanyam (2013) se vyhodnocoval oxidativní stres a indukce antioxidantních enzymů způsobených vnějšími vlivy, např. nízkými teplotami apod. Expozice chladu, hypoxie a jaderného polyedrického viru po dobu 24 hodin vedla u larev k významnému zvýšení tvorby peroxidu vodíku se současným zvýšením peroxidace lipidů a hladin karbonylu ve střevě. Antioxidantní enzymy, jako je superoxidodismutasa a katalasa, se také významně zvýšily ve tkáních a zvýšené antioxidantní enzymy se vrátily na kontrolní hodnoty během zotavení. Ontogenní stadia larev vykazovala klesající schopnost tkání překonat oxidační stres vyvolaný stresory. Významné zvýšení aktivity antioxidantních enzymů během krátkého stresového období naznačilo tedy možný přechodný obranný mechanismus larev, aby se zabránilo poškození buněk vyvolané oxidačním stresem (Michaela a Subramanyam 2013).

Při porovnání exprese SDR mezi samci a samicemi byla ve většině případů pozorována vyšší exprese u samic než u samců. Pouze enzymy SDR 1, 3, 4, 5 a 8 vykazují vyšší hodnotu genové exprese u samců než u samic.

Při porovnání mezi kmeny došlo k vyšší genové expresi u rezistentního kmene u SDR 1 a SDR 3 v 1. vývojovém stádiu larvy, dále u genu SDR 16 ve stádiu L3 a xL3. Také vajíčka a L1 u SDR 18 vykazovala vyšší expresi u kmene IRE oproti kmeni ISE.

Studie Stuchlíkové Raisové et al. (2018) porovnávala metabolismus benzimidazolových léčiv mezi kmenem citlivým a kmenem rezistentním hlístice *H. contortus*. Z výsledků této studie je zřejmá vyšší produkce metabolitů I. a II. fáze biotransformace anthelmintika albendazolu i flubendazolu u dospělých jedinců *H. contortus* rezistentního kmene vůči kmeni citlivému. Flubendazol je u dospělců *H. contortus* transformován na metabolit s redukovanou karbonylovou skupinou. Redukovaný flubendazol byl ve větší míře tvořen u dospělců kmene IRE oproti dospělcům kmene ISE (Stuchlíková Raisová et al. 2018). Na redukcii flubendazolu by se mohly podílet SDR enzymy, proto nás zajímalo, zda bude u IRE kmene vyšší exprese některého z těchto enzymů. Z výsledků této diplomové práce je patrné, že u dospělců kmene IRE dochází ke zvýšené expresi řady SDR oproti dospělcům kmene ISE. Také u vajíček kmene IRE byly zjištěny vyšší hodnoty exprese SDR 1, SDR 6 a SDR 18 oproti kmeni ISE. K nárůstu exprese u L1 kmene IRE oproti kmeni ISE došlo u SDR 1, SDR 3 a SDR 18. U vývojového stádia L3 a xL3 tomu tak však nebylo, zde byla exprese většiny SDR nižší, důvod je však neznámý.

Redukce karbonylových sloučenin byla také studována v subcelulárních frakcích dospělého *H. contortus* ve studii Cvilinka et al. (2008). Pro hodnocení aktivit enzymů

redukujících karbonyl bylo použito několik modelových substrátů. U *H. contortus* byla zjištěna schopnost redukovat karbonylovou skupinu všech modelových substrátů. Redukce karbonylové skupiny představuje především deaktivaci cestu chránící organismy před toxickým účinkem reaktivních aldehydů a ketonů. Proto může významná aktivita enzymů redukujících karbonyl pomoci *H. contortus* působit proti účinku anthelmintik nebo jiných xenobiotik nesoucích karbonylové skupiny (Cvilink et al. 2008).

Jak už je známo, xenobiotické sloučeniny z vnějšího prostředí (např. léky, potravinářské doplňky, kontaminanty životního prostředí a jiné) vstupují na trvalo do zvířecího organismu. Zde je převážná většina těchto xenobiotik metabolizována specifickými enzymy na polárnější sloučeniny, aby se z těl zvířat snadněji vylučovaly (Cvilink et al. 2009). V genomu helmintů bylo identifikováno mnoho genů pro enzymy redukujících karbonylové sloučeniny. Nejméně 70 genů kódujících SDR bylo detekováno v genomu hlístice *H. contortus*, ale také 24 genů kódujících AKR (Matoušková et al. 2016). Kromě tedy SDR enzymů se na redukcii karbonylových sloučenin u *H. contortus* mohou podílet i aldo-ketoreduktasy (AKR).

Aktivity reduktas vůči anthelmintikům nesoucím karbonylové skupiny jako je flubendazol (FLU) a mebendazol (MEB) a vůči dalším substrátům, byly testovány i u námi studovaného helminta *H. contortus*. Ve studii Vokřála et al. (2012) se u této hlístice zjistily reduktasové aktivity vůči FLU, MEB, metyraponu, naloxonu a 4-pyridinkarboxaldehydu. Některé z těchto aktivit byly indukovány u hlístic dříve vystavených subletálními dávkami FLU *in vivo*. Studie zjistila zvýšení redukce FLU a naloxonu u kmenů rezistentních oproti kmenům citlivým (Vokřál et al. 2012). Barski et al. (2008) pojednává o nadrodině AKR a jejich roli v metabolismu xenobiotik. Redukce reaktivních karbonylů pomocí AKR vede k jejich deaktivaci a ke zkrácení doby jejich setrvání v buňce. Úloha AKR při detoxikaci nebezpečných xenobiotik je stále více markantní (Barski et al. 2008). Je pravděpodobné, že aplikace moderních technologií, jako jsou knock-out a transgenní technologie, *in vivo* siRNA, fluorescenční substráty a inhibitory, v kombinaci s metabolomickou analýzou přinesou další informace týkající se fyziologických funkcí těchto proteinů.

Závěrem lze říci, že metabolismus anthelmintik a enzymy metabolizující xenobiotika u hlístic by si zasloužily více pozornosti. Podrobnější informace mohou přispět k zefektivnění farmakoterapie. Další údaje o rozdílech xenobiotik mezi parazity a jejich hostiteli mohou být cenné pro návrh nových potenciálních anthelmintik. Nakonec i hlubší znalost mezidruhových rozdílů helmintů by mohla pomoci objasnit různé účinnosti léků u jejich jednotlivých parazitů (Cvilink et al. 2009).

7. ZÁVĚR

- Vajíčka, larvy a dospělci *H. contortus* byli získáni izolací.
- Proběhlo třídění dospělců *H. contortus* na základě pohlaví.
- Byla vyizolována RNA a připravena cDNA.
- Byla stanovena relativní genová exprese vybraných SDR enzymů u vajíček, larev, samců a samic pomocí metody qPCR.
- Během ontogeneze *H. contortus* docházelo k nejvyšší expresi většiny SDR v larválních stádiích. Gen SDR 5 byl nejvíce exprimován u dospělých samců a u genu SDR 18 došlo k významné expresi ve stádiu vajíčka.
- Při porovnání exprese vybraných SDR mezi samci a samicemi *H. contortus* bylo zjištěno, že exprese většiny SDR byla vyšší u samic než u samců. Naopak gen SDR 19 vykazoval u samic expresi několikanásobně nižší než u samců.
- Při porovnání exprese SDR mezi kmeny ISE a IRE byla zjištěna výrazně zvýšená exprese SDR 1, SDR 12 a SDR 13 u dospělců kmene IRE oproti ISE. U většiny nižších vývojových stádií kmene IRE byly vyšší exprese SDR 12, SDR 13 a SDR 16 oproti ISE.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Anglický význam zkratky	Český význam zkratky
ACR	<i>acyl-CoA reductases</i>	acyl-CoA reduktasy
ADH	<i>alcohol dehydrogenases</i>	alkoholdehydrogenasy
AKR	<i>aldo-keto reductases</i>	aldo-keto reduktasy
AMA	<i>RNA polymerase II</i>	RNA polymerasa II
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>	adenosintrifosfát
BDH ₂	<i>3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2</i>	3-hydroxybutyrátdehydrogenasa typ 2
17 β -HSD12	<i>17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 12</i>	17 β -hydroxisteroiddehydrogenasa typ 12
CAD	<i>cinnamyl alcohol dehydrogenases</i>	cinnamylalkoholdehydrogenasy
CBR1	<i>carbonylreductase 1</i>	karbonylreduktasa 1
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>	komplementární deoxyribonukleová kyselina
Co-A	<i>coenzyme A</i>	koenzym A
Ct	<i>threshold cycle</i>	X
CYP	<i>cytochromes P450</i>	cytochromy P450
DEPC	<i>diethylpyrocarbonate</i>	diethylpyrokarbonát
DHT	<i>dihydrotestosterone</i>	dihydrotestosteron
DMSO	<i>dimethylsulfoxide</i>	dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	<i>2'-deoxy nucleoside 5'-triphosphates</i>	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty
DOX	<i>doxorubicin</i>	doxorubicin
DOXOL	<i>doxorubicinol</i>	doxorubicinol
dsDNA	<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
DTT	<i>dithiothreitol</i>	dithiotreitol
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetate</i>	ethylendiamintetraacetát
FLU	<i>flubendazole</i>	flubendazol
FMO	<i>flavin monooxygenases</i>	flavinové monooxygenasy
GALE	<i>UDP-galactose-4-epimerase</i>	UDP-galaktosa-4-epimerasa
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
GST	<i>glutathione-S-transferases</i>	glutathion-S-transferasy
HSD	<i>hydroxysteroid dehydrogenase</i>	hydroxysteroiddehydrogenasa
IRE	<i>Inbread Resistant Edinburgh, MHco5</i>	X
ISE	<i>Inbread Susceptible Edinburgh, MHco3</i>	X

LTD	<i>leukotriene B4 dehydrogenases</i>	leukotrien B4 dehydrogenasy
MDR	<i>medium-chain dehydrogenases/reductases</i>	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
MEB	<i>mebendazole</i>	mebendazol
MRF	<i>myogenic regulatory factors</i>	proteiny mitochondriální odezvy
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD(H)	<i>nikotinamid adenin dinucleotid</i>	nikotinamidadenindinukleotid
NAD(P)(H)	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NNAL	<i>4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol</i>	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	<i>4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone</i>	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NTC	<i>negative template control</i>	negativní kontrola
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	pufrovaný fosfátový fyziologický roztok
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	polymerázová řetězová reakce
PDH	<i>polyol dehydrogenases</i>	polyoldehydrogenasy
pK _a	<i>acid dissociation constant</i>	disociační konstanta kyseliny
QOR	<i>quinone oxidoreductase</i>	chinonoxidoreduktasy
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>	kvantitativní polymerasová řetězová reakce
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	ribonukleová kyselina
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>	ribosomální ribonukleová kyselina
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktivní formy kyslíku
RT	<i>reverse transcription</i>	reverzní transkripce
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SD	<i>standard deviation</i>	směrodatná odchylka
SDR	<i>short-chain dehydrogenases/reductases</i>	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
ssDNA	<i>single-stranded deoxyribonucleic acid</i>	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
tRNA	<i>transfer RNA</i>	transferová ribonukleová kyselina
UDP	<i>uridine diphosphate</i>	uridindifosfát
UGT	<i>UDP-glucuronosyltransferases</i>	UDP-glukuronosyltransferasy
UTP	<i>uridine triphosphate</i>	uridintrifosfát
UV	<i>ultraviolet</i>	ultrafialové
YADH	<i>yeast alcohol dehydrogenase</i>	kvasinkové/tetramerní alkoholdehydrogenasy

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Rozlišení samce a samice	11
Obrázek 2 – Podrobná morfologie samce a samice	12
Obrázek 3 – Životní cyklus vlasovky slezové	13
Obrázek 4 – Stádia larvy	13
Obrázek 5 – Postižená sliznice oka u ovce	15
Obrázek 6(A) – $(\alpha/\beta)_8$ -válec AKR1B10 v krystalové struktuře (pohled shora)	20
Obrázek 6(B) – $(\alpha/\beta)_8$ -válec AKR1B10 v krystalové struktuře (pohled z boku)	20
Obrázek 7 – Katalytický mechanismus AKR1C9	21
Obrázek 8(A) – Struktura 3-hydroxybutyrátdehydrogenasy typu 2 (BDH2) s klasickým složením SDR navázaná na NAD(H).....	23
Obrázek 8(B) – Struktura UDP-galaktosa-4-epimerasy (GALE)	23
Obrázek 9 – Katalytický mechanismus SDR enzymů	24
Obrázek 10 – Průběh PCR	26
Obrázek 11 – Amplifikační graf PCR reakce	28
Obrázek 12 – Odebírání sedimentu s larvami pomocí pipety z první kónické odměrky do síta druhé kónické odměrky	35
Obrázek 13 – Vodný roztok L3 v kultivační lahvičce	36
Obrázek 14 – Směs dospělců a nečistot v agaru nanesená na gáze	37
Obrázek 15 – Vpravování gázy se směsí dospělců a nečistot v agaru do skleněné nádoby	37
Obrázek 16 – Umístění gázy se směsí dospělců a nečistot v agaru ve skleněné nádobě	37
Obrázek 17 – Získaný shluk dospělců kmene ISE v kádince	37
Obrázek 18 – Dospělé hlístice na Petriho misce v PBS	38
Obrázek 19 – Samičky	38
Obrázek 20 – Samečci	38
Obrázek 21 – Relativní genová exprese vybraných SDR enzymů u všech vývojových stádií <i>H. contortus</i> kmene ISE	48
Obrázek 22 – Relativní genová exprese vybraných SDR enzymů u všech vývojových stádií <i>H. contortus</i> kmene IRE	49
Obrázek 23 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů mezi dospělými samicemi a samci <i>H. contortus</i> kmene ISE	50
Obrázek 24 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů mezi dospělými samicemi a samci <i>H. contortus</i> kmene IRE	51

Obrázek 25 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu vajíčka <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	52
Obrázek 26 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu L1 <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	53
Obrázek 27 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu L3 <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	54
Obrázek 28 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů ve vývojovém stádiu xL3 <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	55
Obrázek 29 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů u dospělých samic <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	55
Obrázek 30 – Porovnání relativní genové exprese vybraných SDR enzymů u dospělých samců <i>H. contortus</i> mezi kmenem ISE a IRE	56

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Expresse referenčního genu GAPDH a referenčního genu AMA u všech vývojových stádií <i>H. contortus</i> kmene ISE a IRE	42
Tabulka 2 – Expresse referenčních genů GAPDH a AMA u všech vývojových stádií <i>H. contortus</i>	43
Tabulka 3 – Relativní exprese SDR genů vztažené na průměr relativní exprese referenčních genů pro každé vývojové stádium <i>H. contortus</i> kmene ISE	44
Tabulka 4 – Relativní exprese SDR genů vztažené na průměr relativní exprese referenčních genů pro každé vývojové stádium <i>H. contortus</i> kmene IRE	45

11. POUŽITÁ LITERATURA

- ANAGNOSTIS P., KATSIKI N., ADAMIDOU F., ATHYROS V. G., KARAGIANNIS A., KITA M. a MIKHAILIDIS D. P. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders? *Metabolism* [online]. 2013, 62(1), 21-33 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00260495. Dostupné z: doi: 10.1016/j.metabol.2012.05.002
- ARSENOPOULOS K. V., FTHENAKIS G. C., KATSAROU E. I. a PAPADOPOULOS E. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals* [online]. 2021, 11(2) [cit. 2022-08-17]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi: 10.3390/ani11020363
- ASHMORE J. H, LUO S., WATSON CH. J. W. a LAZARUS P. Carbonyl reduction of NNK by recombinant human lung enzymes: identification of HSD17 β 12 as the reductase important in (R)-NNAL formation in human lung. *Carcinogenesis* [online]. 2018, 39(8), 1079-1088 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi: 10.1093/carcin/bgy065
- BARSKI O. A., TIPPARAJU S. M. a BHATNAGAR A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2008, 40(4), 553-624 [cit. 2022-10-31]. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi: 10.1080/03602530802431439
- BÁRTÍKOVÁ H., VOKŘÁL I., KUBÍČEK V., SZOTÁKOVÁ B., PRCHAL L., LAMKA J., VÁRADY M. a SKÁLOVÁ L. Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology* [online]. 2012, 187(3-4), 473-479 [cit. 2022-10-20]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vetpar.2012.02.008
- BESIER R. B., KAHN L. P., SARGISON N. D. a VAN WYK J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology* [online]. 2016, 93, 181-238 [cit. 2022-08-17]. ISSN 0065-308X. Dostupné z: doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.024
- BHATIA C., OERUM S., BRAY J., KAVANAGH K. L., SHAFQAT N., YUE W. a OPPERMANN U. Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, 234, 114-125 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.013
- BRAY J. E., MARSDEN B. D. a OPPERMANN U. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-*

- Biological Interactions* [online]. 2009, 178(1-3), 99-109 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.058
- BROPHY P. M., MACKINTOSH N. a MORPHEW R. M. Anthelmintic metabolism in parasitic helminths: proteomic insights. *Parasitology* [online]. 2012, 139(9), 1205-1217 [cit. 2022-10-30]. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi: 10.1017/S003118201200087X
- BUSTIN S. A. A-Z of quantitative PCR. 5. vydání, California: *International University Line*, 2004, 882 s. [cit. 2022-10-21]. ISBN 0-9636817-8-8
- CARLTON P. M., DAVIS R. E., AHMED S. a STROME S. Nematode chromosomes. *Genetics* [online]. 2022, 221(1) [cit. 2022-11-19]. ISSN 1943-2631. Dostupné z: doi: 10.1093/genetics/iyac014
- CVILINK V., KUBÍČEK V., NOBILIS M., KRÍZOVÁ V., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M., KUBENOVÁ M., NOVOTNÁ R., GAVELOVÁ M. a SKÁLOVÁ L. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* [online]. 2008, 151(2-4), 242-248 [cit. 2023-01-25]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vetpar.2007.10.010
- CVILINK V., LAMKA J. a SKÁLOVÁ L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2009, 41(1), 8-26 [cit. 2022-10-30]. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi: 10.1080/03602530802602880
- DUDOVÁ S. a HÁJEK R. Využití metody Rea-Time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* [online]. 2008, 21(1), 220–222 [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3337.pdf>
- EDWARDSON D., NARENDRULA R., CHEWCHUK S., MISPEL-BEYER K., MAPLETOFT J. a PARISENTI A. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current Drug Metabolism* [online]. 2015, 16(6), 412-426 [cit. 2022-11-17]. ISSN 13892002. Dostupné z: doi: 10.2174/1389200216888150915112039
- EMERY D. L., HUNT P. W. a LE JAMBRE L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology* [online]. 2016, 46(12), 755-769 [cit. 2022-08-18]. ISSN 00207519. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpara.2016.07.001
- FAMACHA[®]. American Consortium for Small Ruminant Parasite Control. *Acsrpc.org* [online]. 2016 [cit. 2022-10-21]. Dostupné z: <https://www.wormx.info>

- FILLING CH., BERNDT K. D., BENACH J., KNAPP S., PROZOROVSKI T., NORDLING E., LADENSTEIN R., JÖRNVALL H. a OPPERMANN U. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, 277(28), 25677-25684 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M202160200
- GALLEGO O., RUIZ F. X., ARDEVOL A., DOMINGUEZ M., ALVAREZ R., DE LERA A., ROVIRA C., FARRES J., FITA I. a PARES X. Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, 104(52), 20764-20769 [cit. 2022-11-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.0705659105
- GAREH A., ELHAWARY N. M., TAHOUN A., RAMEZ A. M., EL-SHEWEHY D., ELBAZ E., KHALIFA M., ALSHARIF K. F., KHALIFA R. M. A., DYAB A. K., MONIB M. E. M., ARAFA M. I. a ELMAHALLAWY E. K. Epidemiological, Morphological, and Morphometric Study on *Haemonchus* spp. Recovered From Goats in Egypt. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2021, 8 [cit. 2022-08-17]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi: 10.3389/fvets.2021.705619
- HOFFMANN F. a MASER E. Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase reductase Superfamily. *Drug metabolism reviews* [online]. 2007, 39(1), 87-144 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi: 10.1080/03602530600969440
- HORÁK P. a SCHOLZ T. Biologie helmintů. 1. vydání, Praha: *Karolinum*, 1998, 139 s. [cit. 2022-10-21]. ISBN 80-7184-782-8
- HUGHES P. L., MCKENNA P. B. a DOWLING A. F. A survey of the prevalence of emerging macrocyclic lactone resistance and of benzimidazole resistance in sheep nematodes in the lower North Island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* [online]. 2005, 53(1), 87-90 [cit. 2022-10-17]. ISSN 0048-0169. Dostupné z: doi: 10.1080/00480169.2005.36475
- CHEN G. Xenobiotic metabolism and disposition. *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2020, 31-42 [cit. 2022-11-02]. ISBN 9780128136027. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-813602-7.00003-X
- CHOE K. P., LEUNG CH. K. a MIYAMOTO M. M. Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator, SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance. *Drug Metabolism Reviews* [online]. 2012, 44(3), 209-

- 223 [cit. 2022-10-30]. ISSN 0360-2532. Dostupné z: doi: 10.3109/03602532.2012.684799
- ILIEV P., IVANOV A. a PRELEZOV P. Effects of temperature and desiccation on survival rate of *Haemonchus contortus* infective larval stage. *Trakia Journal of Science* [online]. 2018, 16(1), 17-21 [cit. 2022-08-17]. ISSN 13121723. Dostupné z: doi: 10.15547/tjs.2018.01.004
- JÖRNVALL H., NORDLING E. a PERSSON B. Multiplicity of eukaryotic ADH and other MDR forms. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2003, 143-144, 255-261 [cit. 2022-11-02]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/S0009-2797(02)00242-9
- KASSNER N., HUSE K., MARTIN H-J., GÖDTEL-ARMBRUST U., METZGER A., MEINEKE I., BROCKMÖLLER J., KLEIN K., ZANGER U. M., MASER E. a WOJNOWSKI L. Carbonyl Reductase 1 Is a Predominant Doxorubicin Reductase in the Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2008, 36(10), 2113-2120 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi: 10.1124/dmd.108.022251
- KAVANAGH K. L., JÖRNVALL H., PERSSON B. a OPPERMANN U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2008, 65(24) [cit. 2022-11-17]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi: 10.1007/s00018-008-8588-y
- KELLEROVÁ P., MATOUŠKOVÁ P., LAMKA J., VOKŘÁL I., SZOTÁKOVÁ B., ZAJÍČKOVÁ M., PASÁK M. a SKÁLOVÁ L. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults. *Veterinary parasitology* [online]. 2019, 273, 24-31 [cit. 2023-01-25]. ISSN 0304-4017. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vetpar.2019.07.006
- KIONTKE K. a FITCH D. H. A. Nematodes. *Current Biology* [online]. 2013, 23(19), R862-R864 [cit. 2022-08-17]. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cub.2013.08.009
- KNOLL M. a PLEISS J. The Medium-Chain Dehydrogenase/Reductase Engineering Database: A systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship. *Protein Science* [online]. 2008, 17(10), 1689-1697 [cit. 2022-11-02]. ISSN 09618368. Dostupné z: doi: 10.1110/ps.035428.108
- KOTZE A. C. a PRICHARD R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends* [online]. 2016, 397-428 [cit. 2022-10-06]. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.012

- MATOUŠKOVÁ P., LECOVÁ L., LAING R., DIMUNOVÁ D., VOGEL H., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ L., NGUYEN L. T., KELLEROVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B., VÁRADY M. a 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* [online]. 2018, 8(3), 420-429 [cit. 2022-11-02]. ISSN 22113207. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.005
- MATOUŠKOVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J. a SKÁLOVÁ L. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology* [online]. 2016, 32(6), 481-491 [cit. 2023-01-25]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pt.2016.02.004
- MATSUNAGA T., SHINTANI S. a HARA A. Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online]. 2006, 21(1), 1-18 [cit. 2022-11-17]. ISSN 13474367. Dostupné z: doi: 10.2133/dmpk.21.1
- MICHEAL A. S. a SUBRAMANYAM M. V. V. Antioxidant enzymes as defence mechanism against oxidative stress in midgut tissue and hemocytes of *Bombyx mori* larvae subjected to various stressors. *Archives of insect biochemistry and physiology* [online]. United States: Blackwell Publishing, 2013, 84(4), 222-234 [cit. 2023-03-10]. ISSN 0739-4462. Dostupné z: doi: 10.1002/arch.21138
- MOELLER G. a ADAMSKI J. Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2009, 301(1-2), 7-19 [cit. 2022-11-17]. ISSN 03037207. Dostupné z: doi: 10.1016/j.mce.2008.10.040
- NORDLING E., JÖRNVALL H. a PERSSON B. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). *European Journal of Biochemistry* [online]. 2002, 269(17), 4267-4276 [cit. 2022-11-02]. ISSN 00142956. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03114.x
- OPPERMANN U. Carbonyl Reductases: The Complex Relationships of Mammalian Carbonyl- and Quinone-Reducing Enzymes and Their Role in Physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2007, 47(1), 293-322 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105316
- OSWALD N. What Is a Cq (Ct) Value? *BiteSizeBio.com* [online]. 2020 [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/24581>
- PAWAIYA R. V. S., SINGH D. D., GANGWAR N. K., GURURAJ K., KUMAR V., PAUL S., SHARMA N., MISHRA A. K., KUMAR A., SHARMA D. K. a SINHJ S. V.

- Retrospective study on mortality of goats due to alimentary system diseases in an organized farm. *Small Ruminant Research* [online]. 2017, 149, 141-146 [cit. 2022-10-13]. ISSN 09214488. Dostupné z: doi: 10.1016/j.smallrumres.2017.02.007
- PENNING T. M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, 234, 236-246 [cit. 2022-10-31]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024
- PERSSON B. a KALLBERG Y. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2013, 202(1-3), 111-115 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2012.11.009
- PERSSON B., KALLBERG Y., BRAY J. E., BRUFORD E., DELLAPORTA S. L., FAVIA A. D., DUARTE R. G., JÖRNVALL H., KAVANAGH K. L., KEDISHVILI N., KISIELA M., MASER E., MINDNICH R., ORCHARD S., PENNING T. M., THORNTON J. M., ADAMSKI J. a OPPERMANN U. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2009, 178(1-3), 94-98 [cit. 2022-11-01]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.040
- POLLAK N., DÖLLE CH. a ZIEGLER M. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal* [online]. 2007, 402(2), 205-218 [cit. 2022-10-31]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi: 10.1042/BJ20061638
- RIVEROS-ROSAS H., JULIAN-SANCHEZ A., VILLALOBOS-MOLINA R., PARDO J. P. a PINA E. Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2003, 270(16), 3309-3334 [cit. 2022-11-02]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03704.x
- SHI H., HUANG X., CHEN X., YANG Y., WANG Z., YANG Y., WU F., ZHOU J., YAO CH., MA G. a DU A. Acyl-CoA oxidase ACOX-1 interacts with a peroxin PEX-5 to play roles in larval development of *Haemonchus contortus*. *PLOS Pathogens* [online]. 2021, 17(7) [cit. 2022-10-13]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.ppat.1009767
- SHIMODAIRA M., NAKAYAMA T., SATO N., AOI N., SATO M., IZUMI Y., SOMA M. a MATSUMOTO K. Association of HSD3B1 and HSD3B2 gene polymorphisms with essential hypertension, aldosterone level, and left ventricular structure. *European*

- Journal of Endocrinology* [online]. 2010, 163(4), 671-680 [cit. 2022-11-17]. ISSN 0804-4643. Dostupné z: doi: 10.1530/EJE-10-0428
- SMITH M. Polymerase Chain Reaction. *Genome.gov* [online]. 2022 [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- SRŠEŇ Š. a SRŠŇOVÁ K. *Základy klinickej genetiky*. 2. vydání, Žilina: *Osveta*, 1995, 259 s. ISBN 80-217-0477-2
- STEPANOV I., UPADHYAYA P., CARMELLA S. G., FEUER R., JENSEN J., HATSUKAMI D. K. a HECHT S. S. Extensive Metabolic Activation of the Tobacco-Specific Carcinogen 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone in Smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* [online]. 2008, 17(7), 1764-1773 [cit. 2022-11-17]. ISSN 1055-9965. Dostupné z: doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2844
- STUHLÍKOVÁ RAISOVÁ L., MATOUŠKOVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B., SEČKAŘOVÁ A., DIMUNOVÁ D., THUY NGUYEN L., VÁRADY M. a 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* [online]. 2018, 8(1), 50-58 [cit. 2022-10-18]. ISSN 22113207. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.01.005
- ŠORMOVÁ R. P-glykoprotein a rezistence na anthelmintika u *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová). *Středoškolská odborná činnost; Obor zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství* [online]. 2020 [cit. 2022-10-13]. Dostupné z: <https://socv2.nidv.cz/archiv42/getWork/hash/1b48ff71-6cfe-11ea-9fea-005056bd6e49>
- TER-MINASSIAN M., ASOMANING K., ZHAO Y., CHEN F., SU L., CARMELLA S. G., LIN X., HECHT S. S. a CHRISTIANI D. C. Genetic variability in the metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL). *International Journal of Cancer* [online]. 2012, 130(6), 1338-1346 [cit. 2022-11-17]. ISSN 00207136. Dostupné z: doi: 10.1002/ijc.26162
- VOIGT K., GEIGER M., JÄGER M. C., KNUBBEN-SCHWEIZER G., STRUBE Ch. a ZABLITSKI Y. Effectiveness of Anthelmintic Treatments in Small Ruminants in Germany. *Animals (Basel)* [online]. 2022, 12(12), 1501 [cit. 2022-08-17]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi: 10.3390/ani12121501

- VOKŘÁL I., BÁRTÍKOVÁ H., PRCHAL L., STUHLÍKOVÁ L., SKÁLOVÁ L., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M. a KUBÍČEK V. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology* [online]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2012, 139(10), 1309-1316 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi: 10.1017/S0031182012000595
- WALKER E. A. a STEWART P. M. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2003, 14(7), 334-339 [cit. 2022-11-17]. ISSN 10432760. Dostupné z: doi: 10.1016/S1043-2760(03)00134-6
- WOLSTENHOLME A. J., FAIRWEATHER I., PRICHARD R., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. a SANGSTER N. C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* [online]. 2004, 20(10), 469-476 [cit. 2022-10-18]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pt.2004.07.010
- YAN X., LIU M., HE S., TONG T., LIU Y., DING K., DENG H. a WANG P. An epidemiological study of gastrointestinal nematode and *Eimeria* coccidia infections in different populations of Kazakh sheep. *PLOS ONE* [online]. 2021, 16(5) [cit. 2022-10-14]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0251307