

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Působení fenbendazolu na biotransformační enzymy vlasovky
slezové**

Diplomová práce

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

Konzultantka: Mgr. Karolína Štěrbová

Hradec Králové 2023

Bc. Kateřina Šulcová

Zde bych ráda poděkovala doc. Ing. Petře Matouškové Ph.D. za odborný dohled nad vypracováním této práce poskytnutí zajímavého tématu a milý, trpělivý přístup.

Dále chci poděkovat všem, kteří se podíleli na zajištění biologického materiálu a přípravě primerů.

Velké poděkování patří také Mgr. Karolíně Štěrbové za seznámení s jednotlivými metodami, ochotný a přátelský přístup při práci na praktické části, za trpělivost a nespočet konzultací.

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

V Hradci Králové

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Šulcová

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Působení fenbendazolu na biotransformační enzymy vlasovky slezové

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je hlístice parazitující v gastrointestinálním traktu přežvýkavců. U napadených zvířat způsobuje nemoc nazvanou hemonchóza. Ta se projevuje anémií, úbytkem na hmotnosti a celkovým neprospíváním. V mnohých případech může dojít až k uhynutí jedince. K léčbě se používají látky, obecně nazývané anthelmintika, působící proti různým parazitům, především helmintům. Celosvětovým problémem je už řadu let rezistence parazitů vůči všem skupinám těchto léčiv. To je nejspíše následkem častého a neadekvátního používání anthelmintik, kdy dochází k vystavení parazitů sub-letálním dávkám těchto léčiv. Mechanismy rezistence se liší v závislosti na skupině anthelmintika, a jeho mechanismu účinku. Tato práce se zabývá studiem rezistence *H. contortus* vůči fenbendazolu, anthelmintiku ze skupiny benzimidazolů. Jedním z mechanismů by mohla být změna exprese genů některých biotransformačních enzymů a efluxních transportérů.

V této práci byla sledována exprese vybraných genů biotransformačních enzymů a transportérů ze skupin cytochromů P450 (CYP), UDP-glykosyltransferas (UGT) a P-glykoproteinů (Pgp) u dospělců *H. contortus* dvou kmenů, rezistentního IRE (Inbred resistant Edinburgh stain) a citlivého ISE (Inbred Susceptible Edinburgh). Jedinci byli vystaveni fenbendazolu (1 μ M) po dobu 4 a 12 hodin. Expese vybraných genů kódujících biotransformační enzymy byla změřena pomocí kvantitativní PCR. Výsledky byly normalizovány za použití referenčních genů GAPDH a NCBP a vztaženy ke kontrole (0,1% DMSO). Z vybraných genů byla změna v expresi pozorována pouze u genu *pgp-9.2* u samic kmene IRE po 12hodinové inkubaci. Tento efluxní transportér by se mohl podílet na rezistenci samic *H. contortus* k fenbendazolu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Šulcová

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of fenbendazole on biotransformation enzymes of Barber's pole

Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) is a parasitic nematode in the gastrointestinal tract of small ruminants. In infected animals it causes a disease called haemonchoses. Its signs are anaemia, weight loss and animals are in general not thriving. In numerous cases it can cause death. For treatment of this disease substances called anthelmintics are used. Parasite resistance to all groups of these drugs has been a worldwide problem for several years. It is probably due to frequent and inaccurate use of anthelmintics when the parasites are exposed to sub-lethal doses of the drug. Mechanisms of resistance vary depending on anthelmintic group and its mechanism of action. This thesis focuses on studying mechanism of resistance of *H. contortus* to fenbendazole, a benzimidazole anthelmintic. Changes in expression of some biotransformation enzymes and efflux transporters genes could contribute to resistance.

In this study expression of selected genes of biotransformation enzymes and efflux transporters from CYP (cytochromes P450), UGT (UDP-glukosyltransferases) and P-gp (P-glycoprotein) groups in adults of *H. contortus* from two strains, the resistant IRE (Inbred resistant Edinburgh strain) a susceptible ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) was studied. Worms were exposed to fenbendazole (1 μ M) for 4 and 12 hours. Expression of selected genes encoding biotransformation enzymes was analysed by quantitative PCR. The results were normalized by reference genes GAPDH and NCBP and related to control (0,10% DMSO). Change of expression was observed only in the *pgp-9.2* gene in females of IRE strain after 12-hour incubation. This efflux transporter could have a role in fenbendazole resistance in *H. contortus* females.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 2.1. Helminti | 10 |
| 2.1.1. Hlístice (<i>Nematoda</i>)..... | 10 |
| Trávicí soustava | 10 |
| Vylučovací soustava | 11 |
| Svalová soustava..... | 11 |
| Nervová soustava..... | 11 |
| Reprodukční soustava | 12 |
| Vývojový cyklus | 12 |
| 2.1.1.1. Vlasovka slezová (<i>H. contortus</i>) | 13 |
| 2.2. Helmintózy a hemonchóza..... | 14 |
| 2.2.1. Léčba | 14 |
| 2.2.1.1. Benzimidazoly | 15 |
| 2.2.1.1.1. Fenbendazol | 15 |
| 2.2.1.2. Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny | 16 |
| 2.2.1.3. Makrocyclické laktony | 16 |
| 2.2.1.4. Amino-acetonitrilové deriváty..... | 17 |
| 2.2.1.5. Další skupiny | 17 |
| 2.3. Rezistence | 18 |
| 2.3.1. Mechanismy..... | 18 |
| 3. Cíl práce | 21 |
| 4. Experimentální část..... | 22 |
| 4.1. Biologický materiál, přístrojové vybavení, reagentie a chemikálie | 22 |
| Biologický materiál..... | 22 |

| | |
|---|----|
| Přístrojové vybavení | 22 |
| Reagencie a chemikálie | 22 |
| Pracovní pomůcky | 23 |
| 4.2. Pracovní postupy..... | 23 |
| 4.2.1. Izolace dospělců z biologického materiálu..... | 23 |
| 4.2.2. Inkubace s léčivem | 24 |
| 4.2.3. Izolace RNA | 25 |
| 4.2.4. Měření koncentrace a čistoty RNA | 26 |
| 4.2.5. Ošetření DNAsou I | 26 |
| 4.2.6. Reverzní transkripce | 27 |
| 4.2.7. Kvantitativní PCR (qPCR) | 28 |
| Vyhodnocení výsledků | 29 |
| Vlastní analýza..... | 30 |
| 4.3. Statistická analýza..... | 31 |
| 5. Výsledky | 32 |
| 5.1. Expres vybraných genů | 32 |
| 6. Diskuze | 37 |
| 7. Závěr | 40 |
| 8. Použité zkratky..... | 41 |
| 9. Seznam obrázků | 43 |
| 10. Seznam tabulek | 43 |
| 11. Seznam grafů | 44 |
| 12. Použitá literatura | 45 |

1. Úvod

Nákazy způsobené helminty jsou v některých oblastech, především v tropických rozvojových zemích, jedním z největších zdravotních i ekonomických problémů. Nejedná se však pouze o problém těchto oblastí, helmintózy jsou rozšířené i v rozvinutých zemích mírného pásu. U lovné či domácí zvěře se velmi často setkáváme s hromadnými úhyny v následku napadení helminty (HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

Hlístice napadající gastrointestinální trakt přežvýkavců jsou nepočtenější skupinou hlístic a jimi způsobená gastritida patří mezi hlavní příčiny ztrát produktivity u koz a ovcí. Nejohroženějšími skupinami jsou mláďata, jedinci vystavení stresu, s poruchou imunity a v rekonvalescenci. Parazity způsobující největší ekonomické ztráty jsou zástupci čeledi *Trichostrongyloides*, kam patří i vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) (LANKOVÁ S. et al. 2018).

Kontrola hemonchózy je ze značné části závislá na použití anthelmintik. Rezistence červů k používaným anthelmintikům je proto významným faktorem způsobujícím ztráty. *H. contortus* je schopný si k nim rezistenci vyvinout velmi snadno a ve světě jsou rozšířeny kmeny rezistentní ke všem hlavním skupinám těchto léčiv. Pochopení mechanismů rezistence je stálým cílem při studiu různých kmenů *H. contortus*. Navíc bylo zaznamenáno, že doba mezi uvedením nového léčiva a rozvojem rezistence k němu nepřekračuje deset let. Jedná se tedy o důležitý krok pro kontrolu jejího rozvoje (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Obecně mohou nematoda využít jen určitou škálu mechanismů. Lze je rozdělit na specifické, které přímo souvisí s mechanismem účinku dané skupiny anthelmintik, a nespecifické mechanismy týkající se především metabolismu a transportu léčiva skrz membrány. U nespecifických mechanismů se tedy uplatňuje řada indukovatelných enzymů v první a druhé fázi metabolismu i řada transportérů (HARDER A. 2016; KELLEROVÁ P. et al. 2020; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Mezi enzymy metabolizující xenobiotika včetně anthelmintik patří enzymy cytochromy P450 (CYP) v první fázi metabolismu, kdy dochází k modifikaci struktury nejčastěji pomocí oxidace. CYP se však mohou chovat také jako peroxidasy a reduktasy. V druhé fázi dochází ke konjugaci sloučeniny či jejího metabolitu z první fáze s endogenními látkami za působení například UDP-glykosyltransferas (UGT). Glukosidace byla u *H. contortus* zaznamenána jako dráha inaktivace benzimidazolových anthelmintik (MATOUŠKOVÁ P. et al. 2016). Poslední

součástí metabolismu je pak aktivní transport membránami, který zprostředkovávají efluxní transportéry a chrání tak organismus před toxickým působením látek. Patří sem ABC-transportéry (ATP-binding cassette), z nich pak především P-glykoproteiny (Pgp), které jsou spojovány s rezistencí u *H. contortus*. Jejich zvýšená exprese vede k vyšší tvorbě neaktivních metabolitů a při sub-letálních dávkách zlepšuje schopnost červů deaktivovat léčivo, a tedy přežít další setkání s ním (HARDER A. 2016; KELLEROVÁ P. et al. 2020; MATOUŠKOVÁ P. et al. 2016).

Této práci se zabývá změnami v expresi těchto enzymů po vystavení dospělců *H. contortus* sub-letálním dávkám fenbendazolu. A tedy jejich možným podílem v rozvoji rezistence k tomuto léčivu. Konkrétními sledovanými enzymy jsou: CYP7, CYP3, UGT368B2, UGT367A1, UGT371A1, UGT26A2, Pgp9.2 a Pgp10.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Helminți

Helminți jsou mnohobuněční parazitičtí červi spadající do kmene ploštěnci (*Platyhelminthes*), hlístice (*Nematoda*) a vrtejši (*Acanthocephala*) (VOLF, P; HORÁK P a kol. 2007). Patří mezi organizmy, které se parazitickému životu přizpůsobily nejvíce, to vedlo např. k sekundární redukci až naprostému vymizení některých životních funkcí a orgánových soustav (HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

2.1.1. Hlístice (*Nematoda*)

Hlístice jsou jednou z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin živočichů. Parazitují nejen na obratlovcích, ale rovněž na bezobratlých a rostlinách. Některé druhy také žijí volným způsobem života. Zástupci parazitují jak ve střevech, tak v extraintestinálních tkáních. Z toho vyplývá i rozdílné přizpůsobení jednotlivých skupin (BARON S. 1996; HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

Tělo těchto živočichů je nesegmentované, válcovité, protáhlé až nitkovité se zužujícími se konci. Nejběžněji jsou hlístice bílé barvy, tmavší zbarvení je znakem přítomnosti vajíček nebo potravy ve střevě. Povrch pokrývá pevná a pružná kutikula zastávající ochrannou funkci, mimo to působí proti tlaku tělních tekutin a udržuje tvar červa (HORÁK P, SCHOLZ T. 1998). Jedná se o nebuněčnou strukturu, komplexního chemického složení – obsahuje především proteiny a menší množství lipidů. Není rovnoměrně tlustá, nýbrž tvoří podélné lišty, které zároveň rozdělují svalovinu do čtyř sektorů. Také na ní můžeme nalézt struktury tvaru rýh, trnů nebo větších útvarů nazývaných alae. Kutikula je nebuněčnou strukturou, tudíž neroste spolu s jedincem a musí být svlékána. U většiny hlístic k tomu dochází čtyřikrát a podle toho se rozlišují i jednotlivá larvální stádia. Kutikula je vylučována syncytiem, jednovrstvou pokožkou (BARON S. 1996; HORÁK P, SCHOLZ T. 1998; SMRŽ J. 2015; VOLF P., HORÁK P. 2007).

Pod kutikulou nalezneme hypodermis, jež má charakter již zmíněného syncytia a taktéž tvoří čtyři lišty, z nichž je dorzální a vertebrální spojena s nervovým systémem. Poslední vrstvou tělní stěny je svalovina tvořená vrstvou podélných vláken hladké svaloviny (BARON S. 1996).

Trávicí soustava

Hlístice nemají pravou tělní dutinu, ale pseudocoelom, který nemá mesoteliovou výstelku a je vyplněn tekutinou (BARON S. 1996). Tato tekutina zastává funkci oběhové a dýchací

soustavy, na této funkci se podílí také difuze. Po celé délce těla jím prochází trávicí trubice, dále zde nalezneme pohlavní orgány. Obě soustavy jsou volné, upevněné pouze v oblasti vývodů. Trávicí soustava je úplná s ústním otvorem obklopeným senzorickeými papilami, v přední části těla, hltanem s nápadnými svalovými útvary pro pumpování potravy do střeva a análním otvorem, v zadní části těla. Ústní aparát je mimo papil tvořen ústní kapsulou, pysky a často je opatřena výrůstky, trny, zuby nebo sklerity (BARON S. 1996; HORÁK P., SCHOLZ T. 1998; SMRŽ J. 2015).

Vylučovací soustava

Vylučovací soustava je tvořena renetami, žláznatými buňkami, ty jsou napojeny na exkreceční kanálky, chordy. Soustava je zakončena exkrecečním sinem a nepárovým exkrecečním pórem ústícím ven z těla (HORÁK P., SCHOLZ T. 1998). S vylučovacím systémem je také do jisté míry spojen sekreceční systém, který plní funkci v osmoregulaci, antikoagulaci a iontové regulaci. Vylučuje rovněž proteázy, acetylcholin a další látky (BARON S. 1996, SMRŽ J. 2015).

Svalová soustava

Svalovina je uložena pod vrstvou kutikuly a hypodermis, tvořena je vrstvou podélných svalových vláken uspořádaných do čtyř lišt. Každá buňka má kontraktilní část uchycenou ke kutikule a nekontraktilní část obsahující jádro s cytoplazmatickým výběžkem. Ten slouží ke spojení s ostatními buňkami svaloviny a šíření nervového signálu. Pohyb hlístic je uskutečněn mrskáním nebo vlněním těla, probíhajícím současnou relaxací svaloviny na jedné straně těla a kontrakcí na straně druhé. Tyto pohyby rovněž nahrazují peristaltické pohyby střeva (BARON S. 1996, HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

Nervová soustava

Nervová soustava hlístů je gangliového typu. Jejními částmi jsou prstenec nervových ganglií okolo hltanu a z něj vpředu a vzadu vybíhající dvě nervové trubice uložené na výběžcích hypodermis. V hlavové části se nachází větší množství nervových zakončení ve formě mechano- a chemoreceptorů. Kutikula obsahuje řadu žláz s předpokládanou senzorickeou funkcí, v hlavové části nalezneme tzv. amfidy, naopak v ocasní části se nacházejí fazmidy. Pomocí jejich přítomnosti, či nepřítomnosti se hlístice dělí na dvě skupiny, Phasmida a Aphasmda. Nervový vzruch se přenáší na poměrně velkou vzdálenost, i přestože nebyla u většiny nervových buněk prokázána přítomnost Schwannových buněk, šíření vzruchu pomocí

akčního potenciálu, ani amplifikace jeho přenosu (BARON S. 1996; HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

Reprodukční soustava

Hlístice jsou ve většině případů dvojího pohlaví s pohlavním dimorfismem. Vajíčka hlístic jsou v závislosti na vývojovém cyklu různě odolná, chráněná pouze tenkým obalem, či vůči vnějším vlivům velmi odolná vajíčka se silnou stěnou (HORÁK P., SCHOLZ T. 1998). Samci bývají menší než samice, mají zakřivený zadní konec a u některých druhů nalezneme kopulační struktury jako je spikula a burza, obvykle obě jmenované. Samčí pohlavní soustava se dále skládá z nepárového varlete, velké a malé ejakulační žlázy a vývodů, jež ústí do kloaky. Samičí soustava je tvořena většinou dvěma ovarii, trubicovitou dělohou a svalnatou vaginou ústící ve vulvu (BARON S. 1996).

Spermie jsou obvykle amébovitě, nebo tyčovitěho tvaru, nemají axonemu ani akrozom. Pohybují se za pomoci panožek a uvnitř se nachází fibrózní tělísko, organela sloužící jako zásobárna cytoskeletových bílkovin. Oocyty mají tři vrstvy, uvnitř lipidovou, střední chitino-proteinovou a vně lipoproteinovou. Vnější obal vajíčka je tvořen stěnou dělohy a je složen z glykosaminoglykanů a lipoproteinů. Pro oplození je nezbytná kopulace (HORÁK P., SCHOLZ T. 1998).

Vývojový cyklus

Vývojový cyklus zahrnuje všechny kroky od vzniku zygoty, přes růst embrya a jednotlivá larvální stádia až po dospělce (BARON S. 1996). Hlístice mohou mít jak přímý (monoxenní), tak nepřímý (heteroxenní) vývoj (HORÁK, 1998). Po oplození a vzniku zygoty se vytvoří chitinová schránka, pod kterou se nachází membrána, která činí vajíčko nepropustným pro téměř všechny substance, vyjma kyslíku a oxidu uhličitého. U některých druhů navíc vzniká třetí proteinová vrstva na povrchu chitinové schránky. Vyloučené vajíčko může obsahovat, jednobuněčnou zygotu, skupinu blastomer, či plně formovanou larvu. Některé druhy tvoří larvy, které se deponují v tkáních hostitele (BARON S. 1996, SMRŽ J. 2015).

Přímý vývojový cyklus probíhá bez účasti mezihostitele. Oplozené vajíčko je vyloučeno s trusem a za vhodných podmínek (vlhkost, teplota) se vyvíjí až po infekční larvu. Tato larva je následně pozřena hostitelem, či se u některých zástupců může do těla dostat perkutánně bodavým hmyzem. Nepřímý vývoj se vyznačuje nutností mezihostitele, nejběžnější jsou bezobratlí (korýši, kroužkovci, hmyz atd.). Mezihostitel pozře vajíčka, či larvy 1. stádia a v jejich těle pokračuje vývoj až po stádium infekční larvy. Definitivní hostitel se následně

nakazí pozřením volných infekčních larev, či celého mezihostitele. Výhodou je možnost přežívat při nepříznivých podmínkách v mezihostiteli (HORÁK, 1998).

2.1.1.1. Vlasovka slezová (*H. contortus*)

Vlasovka slezová (*H. contortus*) je vysoce patogenním krev sajícím gastrointestinálním parazitem koz a ovcí, případně dalších přežvýkavců, napadající sliznici slezu. Patří do třídy hlístic (Nematoda), podtřídy Secernentea (Phasmidea) a čeledi Trychostrongyloidae (HORÁK P. SCHOLZ T.,1998; LANKOVÁ et al. 2018).

Jedinci jsou nitkovitého tvaru s kutikulou kryjící jejich tělo a poskytující ochranu před trávicími enzymy hostitele. V přední části mají ústní kapsulu s kyjovitým zubem, kterým rozrušují cévy hostitele a živí se jejich krví. Samci jsou menší, měří 10-20 mm, typickým rysem je kopulační burza přítomná na jednom konci těla. Samice dlouhé 18-30 mm, jsou na pohled spirálovitě pruhované a aktivnější. „Pruhování“ je důsledkem bílých vaječníků omotaných kolem střeva naplněného krví (JEŽKOVÁ T. 2022; LANKOVÁ et al. 2018; SENDOW J. 2003).

Přenos parazita probíhá fekálně-orální cestou z kontaminované potravy (pastviny). Jejich vývojový cyklus je přímý. Ve vajíčku vyloučeném s trusem se vyvine larva prvního stupně (L1), následuje dvojitá svlékání kutikuly až po larvální stádium L3 – infekční larvu. Toto stádium je pohyblivé a, nejčastěji ráno a večer, vylézá na stébla trav, se kterými je pozřena a dostává se do těla hostitele. Invazivní larva se následně přichytí na sliznici slezu, kde dospěje. Na rozdíl od dospělců a L3 stádií živících se krví, se larvy L1 a L2 živí bakteriemi v trusu (JEŽKOVÁ T. 2022; SENDOW J. 2003).

H. contortus je celosvětově velmi rozšířený. Nejčastěji ho však díky jeho teplomilnosti nalezneme ve vlhkém tropickém podnebí, sezónně v závislosti na teplotě a vlhkosti vzduchu se však vyskytuje ve většině klimatických zón. S klesající teplotou klesá možnost vývoje infekční L3 larvy a vymezuje se spíše na sezonní epidemie hemonchózy v letních měsících. *H. contortus* pak chladné zimy mírného klimatu přežívá ve formě hypobiotické larvy. Jejich vyšší počty na jaře následně vedou k epidemiím pokud jsou teploty v létě dostatečně vysoké (BASIER R.B. 2016; JEŽKOVÁ 2022). Jeho rozšíření napomohl obchod se zvířaty a vysoká genetická přizpůsobivost. Díky vysokému biologickému potenciálu, samice mohou produkovat až 5 000-10 000 vajíček denně, se epidemie často vyskytují téměř bez varování. Dospělci narušují žaludeční sliznici a způsobují gastritidu, následně se rozvíjí anémie. S tím souvisí vysoká mortalita a následné ekonomické ztráty (BASIER R. B. et al 2016; SENDOW 2003).

2.2. Helmintózy a hemonchóza

Hemonchóza patří do skupiny helmintóz, infekcí způsobených parazitickými červy. Tato onemocnění jsou celosvětovým problémem v oblasti zvířat i lidí, především v ekonomicky slabých subtropických a tropických oblastech. K infekci dochází buď perorální cestou, či perkutánně. Jednotlivé příznaky odpovídají napadenému orgánu a druhu červa, dle toho se také liší. Nejběžnější jsou však bolesti břicha, průjemy, zvracení, podvýživa, únava, hepato- a splenomegalie, pneumonitida, anémie, lymfedém a další (AL AMIN A. S. M. WADHWA R. 2022; STEJSKAL F. 2005).

Hemonchóza vyvolaná *H. contortus* se vyskytuje v akutní i chronické formě. Akutní forma se rozvíjí po pozření množství infekčních larev najednou (až 10 000 či více). Díky vysokým krevním ztrátám je průběh prudký a úmrtnost ve stádě vysoká. Příznakem onemocnění je bledost sliznic a kůže, slabost, letargie a dušnost způsobené anémií (JEŽKOVÁ T. 2022).

Pokud je počet spasených larev menší, samotný průběh je závislý na stavu napadeného zvířete. Vliv má nejen stáří a velikost jedince, ale také genetické predispozice, výživa a celkový zdravotní stav (JEŽKOVÁ T. 2022).

Po narušení sliznice slezu dochází k morfologickým a fyziologickým změnám a k rozvoji gastritidy. Objevují se bělavé povlaky na sliznici a zhoršují se trávicí i absorpční schopnosti. Následně vzniká anémie v důsledku nedostatečné kompenzace ztrát krve. Objevuje se hypertrofie lymfatických uzlin, otoky tělních dutin a podkoží zapříčiněné narušenou rovnováhou onkotického tlaku. U chronického průběhu jsou příznaky nespecifické a podobají se podvýživě, zvíře chřadne a hubne, dochází ke zpomalení růstu. Trus může být tmavý kvůli okultnímu krvácení, u hemonchózy se běžně nevyskytuje průjem. Neléčená může vést až k uhynutí zvířete (BESIER 2016; FOX M.T. 2014; JEŽKOVÁ T. 2022).

2.2.1. Léčba

Základem léčby hemonchózy jsou antiparazitická léčiva, anthelmintika. To se doplňuje o podpůrnou léčbu, kvalitní seno a injekci železa. Nedílnou součástí je však rovněž prevence, kterou je nutno uzpůsobit konkrétnímu chovu, zahrnuje rychlou rotaci pastvin a jejich asanaci, zahrnující kosení nespasených rostlin a odstraňování výkalů. Preventivní odčervování je nevhodné z důvodu rychlého rozvoje rezistence (BESIER R.B. 2016; JEŽKOVÁ T. 2022).

Anthelmintika jsou většinou syntetické látky, jež se váží na specifická místa, způsobují nestabilitu, paralýzu a smrt parazita. Problémem je masivním používáním způsobená, celosvětově rozšířená rezistence na tato léčiva, která léčbu komplikuje (BESIER R.B. 2016; DOBŠÍKOVÁ R. 2012).

V závislosti na cílovou třídu parazita lze anthelmintika rozdělit na antitrematoda, anticestoda a antinematoda. K léčbě hemonchózy se užívá poslední zmíněná skupina. Tato léčiva můžeme podle mechanismu účinku a struktury rozdělit do následujících skupin: benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony a léčiva ostatních struktur. (BESIER R.B. 2016; LAMKA J. 2006)

2.2.1.1. Benzimidazoly

Benzimidazoly byly uvedeny na trh v roce 1961, jedná se o širokospektrá anthelmintika působící na celou řadu dospělců parazitů i vývojovým stádiím, některé z látek působí i ovicidně. V minulosti byly díky této skutečnosti, jejich bezpečnosti, vysoké efektivitě a snadnému podávání široce používány. Důsledkem toho došlo ke globálnímu rozšíření rezistence. Mechanismus účinku těchto léčiv je na buněčné úrovni. Způsobují inhibici polymerace mikrotubulů vedoucí k buněčné smrti. Léčivo se specificky váže na β -tubulin, způsobuje jeho konformační změnu a díky tomu dochází k zastavení další polymerace podjednotek v buňkách. Mikrotubuly jsou velmi důležité pro energetický metabolismus, nitrobuňčný transport, proliferaci, mitózu, udržování tvaru buňky či pohyb buňky. Dochází k vyčerpání energetických rezerv a ochranných faktorů, následně je inhibováno i vylučování odpadních látek. To je zakončeno smrtí parazita. (BESIER R.B. 2016; HARDER A. 2016; LAMKA J. 2006; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013)

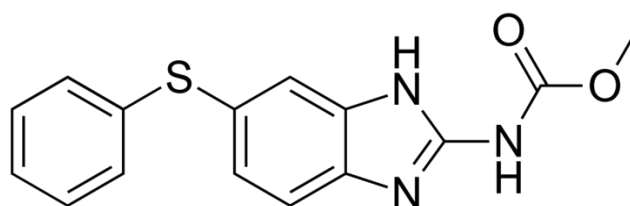
Benzimidazoly jsou většinou podávány orálně, z gastrointestinálního traktu se díky nízké rozpustnosti ve vodě vstřebá pouze malé množství a větší část přetrvává v zažívacím traktu, odkud je následně i nemetabolizované vyloučeno. (ČÁŇOVÁ K. 2017; DOBŠÍKOVÁ R. 2012)

Samostatně používané benzimidazoly už ve většině případů nejsou účinné, jejich užití se nyní omezuje spíše na kombinaci s jinými anthelmintiky. Mezi stále používané zástupce této skupiny patří albendazol, fenbendazol, oxfendazol, mebendazol, parbendazol a kambendazol (BESIER R.B. 2016; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013).

2.2.1.1.1. Fenbendazol

Fenbendazol (FBZ, Obr. 1) patří do skupiny širokospektrých benzimidazolových anthelmintik a je používán především ve veterinární medicíně pro léčbu hlísticových infekcí, působí však i proti jiným helmintům jako jsou např. Tasemnice rodu *Taenia*. Je schválen pro použití u ovcí, dobytka, koní, ryb, psů, koček a králíků (PubChem 2004).

V České republice je registrován pro komerční využití pod názvy Bioveta fenbendazol, Caniquantel, Caniverm, Cestál, Curifen, Gallifen, Helmigal, Panacur, Pigfen, Worm Stop a Zantel (ÚSKVBL 2023).



Obrázek 1 Fenbendazol

Zdroj: <https://cs.m.wikipedia.org/wiki/Fenbendazol>

2.2.1.2. Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Imidazothiazoly a jejich deriváty tetrahydropyrimidiny jsou druhou novodobou skupinou širokospektrých anthelmintik. Představeny byly v druhé polovině 60. let 20. století. Obě skupiny jsou nikotinovými agonisty a s tím souvisí i mechanismus jejich účinku. Působí na acetylcholinové receptory ve svalech parazita a způsobují paralýzu, ve vyšších dávkách pak působí interferenci s metabolismem sacharidů. Jsou dobře absorbovány po orální, parenterální i topické aplikaci a metabolizovány převážně v játrech. Levamisol (imidazothiazol) je z této skupiny u malých přežvýkavců používán nejvíce, ačkoli je jedním z nejtoxičtějších anthelmintik a v některých zemích je pro použití na ovcích dostupný morantel z bezpečnější skupiny tetrahydropyrimidinů. Rezistence parazitů k tomuto léčivu je velmi častá, nicméně *H. contortus* zůstává prozatím k levamisolu citlivý. V budoucnu však lze rozšíření rezistence očekávat (BESIER R.B. 2016; DOBŠÍKOVÁ R. 2012; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013).

2.2.1.3. Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony představily po svém uvedení v 80. letech novou éru. Jedná se o biosyntetická léčiva efektivní vůči většině druhů nematod a všem jejich vývojovým stádiím.

Aktivitu vykazují i proti některým ektoparazitům. Tyto látky působí narušení nervového přenosu, působí na chloridové kanály řízené glutamátem, které jsou specifické pro parazity; dále podporují uvolňování kyseliny gamaaminomáselné (GABA) z presynaptické štěrbině a konečně působí také jako přímí agonisté na GABA receptorech. Tyto pochody vedou ke zvýšenému toku chloridových iontů do neuronu, jeho hyperpolarizaci a inhibici nervového přenosu. Dochází k navození celkové paralýzy svalstva všech vývojových stádií parazita a k jejich úhynu. Makrocyclické laktony jsou metabolizovány v játrech, avšak většina zůstává po perorálním podání v trávicím traktu a je nezměněna vyloučena stolicí. Pro přežvýkavce, koně a prasata se jedná o poměrně bezpečná léčiva. Příkladem těchto anthelmintik jsou ivermektin, moxidektin a doramektin (BESIER R.B. 2016; DOBŠÍKOVÁ R. 2012; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013)

2.2.1.4. Amino-acetonitrilové deriváty

Z této skupiny látek popsaných až v roce 2008 je jako jediný dostupný monepantel. Tyto syntetické sloučeniny jsou vysoce účinné proti všem gastrointestinálním hlísticím. Působí proti nikotinovým acetylcholinovým receptorům Hco-MPTL-1 a způsobují nekontrolovaný tok iontů s následnou depolarizací svalových buněk a paralýzou hlístice. Bohužel i v případě této skupiny už byla pozorována rezistence parazitů k této látce (BESIER R.B. 2016; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013).

2.2.1.5. Další skupiny

Organofosfáty - starší skupinou orálních anthelmintik jsou organofosfáty. Tato léčiva jsou stále využívána v zemích, kde jsou povolena. Mechanismus účinku organofosfátů je založen na inhibici acetylcholinesterasy, z toho plyne jejich potenciální toxicita pro savce stejně jako pro cílené parazity. Při podávání je tudíž třeba opatrnosti. *H. contortus* je k těmto přípravkům v porovnání s jinými hlísticemi citlivější a bylo hlášeno pouze malé množství případů rezistence. Nevýhodou je ale nižší aktivita proti jiným druhům nematod, především jejich larválním stádiím. Patří mezi ně naftalofos, tricolorfon a pyraclyfos (BESIER R.B. 2016).

Salicylanilidy a substituované fenoly – tato skupina zahrnuje množství sloučenin působících inhibici energetického metabolismu. Jedná se o anthelmintika s úzkým spektrem, specificky působí proti krev-sajícím hlísticím. Některé z látek mají prodlouženou aktivitu, což předurčilo tyto látky k vzniku rezistence. Ta je v endemických oblastech častá, avšak v oblastech s nízkým rizikem se tolik nevyskytuje. Mezi tyto látky patří např. klosantel, rafoxanid, disofenol a nitroxynil (BESIER R.B. 2016).

Spiroindoly – tyto hetrocyklické sloučeniny jsou nejnovější skupinou anthelmintik a působí jako nikotinoví cholinergní antagonisté. Příkladem je derquantel, který je však pro komerční využití vyráběn pouze jako kombinace s abamektinem. Derquantel sám o sobě není plně účinný proti všem hlísticím (BESIER R.B. 2016; SCHÁŇKOVÁ Š. 2013).

V minulém odstavci padla zmínka o kombinaci anthelmintik. Tato možnost zahrnuje širokou škálu možností, avšak produkty nejsou ve všech zemích povoleny. Primárním účelem je zajistit účinek v případě rezistence helmintů proti některé z komponent kombinace. I přestože v tomto případě je výskyt rezistence méně častý, dochází k němu a je pak označován termínem multirezistence. Mimo již zmíněnou kombinaci derquantel-abamektin jsou dostupné různé kombinace benzimidazolů, makrocyclických laktonů, levamisolu, klosantelu a organofosfátů (BESIER R.B. 2016).

2.3.Rezistence

Rezistence je obecně definována jako schopnost organismu přežít působení léčiva v dávkách, které by za normálních okolností jedince stejného druhu a stádia zabily. Z hlediska gastrointestinálních parazitů je anthelmintická rezistence geneticky přenosná ztráta citlivosti k léčivu v populaci červů, kteří byli původně citliví (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Rezistence je v dnešní době významným problémem nejen v léčbě parazitárních onemocnění. Ve většině případů došlo k rozvoji rezistence na danou skupinu léčiv v časovém úseku deseti let od zavedení léčiva. Jejich nepřiměřené používání a nesprávné postupy aplikace vedly v čase k rozvoji rezistence a jejímu celosvětovému rozšíření. Což má za následek značné ekonomické ztráty v dotyčných oblastech. Obecně mezi predispozice k rozvoji rezistence patří častá léčba anthelmintiky, nedostatečné dávky, cílení a načasování masové léčby a v neposlední řadě také genetické predispozice samotného parazita. (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Další komplikace přinesl rozvoj multirezistence, tedy rezistence jedince ke dvěma a více skupinám anthelmintik, či léčiv obecně, které mohou mít stejný i rozdílný mechanismus účinku (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021).

2.3.1. Mechanismy

H. contortus byl a stále je intenzivně studován s cílem pochopit mechanismy rezistence k jednotlivým třídám anthelmintik. Studie poukázaly na specifické molekulární mechanismy,

kterými se hlístice brání účinku hlavních skupin anthelmintik, jako jsou benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony (KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Moderní anthelmintika jsou vůči citlivým kmenům účinné z 99%, zbylá menšina jsou nejodolnější jedinci. Ti přežijí, dostávají se do prostředí a kontaminují pastviny. Tímto způsobem dochází ke vzniku rezistentních populací a rozvoji anthelmintické rezistence vlivem selekčního tlaku. Mechanismy rezistence jsou multifaktoriální a závisí na řadě změn včetně změny cílové struktury léčiva s následkem ztráty interakce léčiva s jeho cílem, změny v metabolismu inaktivujícím či odstraňujícím léčivo, případně bránícím jeho aktivaci. Další změny se mohou objevit v distribuci léčiva, kdy je zabráněno tomu, aby se léčivo dostalo k cílové struktuře nebo je zvýšen jeho eflux. Může dojít k zvýšení exprese cílových struktur léčiva za cílem obejít účinek léčiva a poslední cesta zahrnuje expresi strukturně podobných proteinů, které nejsou, na rozdíl od původních, citlivé k působení léčiva (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; HARDER A. 2016; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Rezistence k benzimidazolům byla spojena se změnou genové sekvence pro beta-tubulin, přičemž postačí změna sekvence na jediné pozici. Takto změněný protein má následně nižší afinitu k benzimidazolovým léčivům. Mezi jednotlivými nematody se navíc jednonukleotidové polymorfismy spojené s rezistencí na tyto látky liší. Nejběžnější z nich je výměna fenylyalaninu za tyrozin v pozici 200, dále se vyskytuje totožná výměna, avšak v pozici 167, třetí substitucí je náhrada kyseliny glutamové alaninem v pozici 198 (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; HARDER A. 2016).

U makrocyclických laktonů se předpokládá, že zdrojem rezistence mohou být mutace v genu pro glukózou řízený chloridový kanál. Mimo to jsou s rezistencí spojovány i ABC transportéry, P-glykoprotein především. Tyto transportní proteiny slouží jako efluxní mechanismy transportující lipofilní molekuly přes membrány, tím snižují koncentraci léčiva v buňce a brání mu tak dosáhnout cílové struktury (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; HARDER A. 2016). V genomu *H. contortus* bylo vytipováno 10 Pgp genů, z nich mají význam k anthelmintikům zvláště geny pro Pgp-1, Pgp-2, Pgp-9, Pgp-16 a Pgp-17 (HARDER A. 2016).

Hlístice mají mnoho různých indukovatelných enzymů, které slouží k jejich ochraně před toxickými látkami včetně anthelmintik. V porovnání s ostatními helminty mají poměrně vysoké množství těchto enzymů a rezistentní kmeny vykazovaly v porovnání s citlivými kmeny vyšší tvorbu neaktivních metabolitů (VOKŘÁL I. et al. 2012; VOKŘÁL I. et al. 2013). Mezi tři hlavní detoxikační reakce řadíme modifikaci, konjugaci a exkreci toxické sloučeniny. Těchto

akcí se účastní enzymy cytochromy P450 a dehydrogenázy krátkých řetězců pro modifikaci, UDP-glukuronosyl transferasy a glutathion S-transferasy pro konjugaci. I tento nespecifický mechanismus bývá spojován nejen s rezistencí k makrocyclickým laktonům (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; HARDER A. 2016). U rezistentních kmenů *H. contortus* byla pozorována zvýšená exprese isoformy UGT368B2 (KELLEROVÁ P. et al. 2020).

Co se rezistence vůči nikotinovým agonistům týče předpokládá se, že mechanismem rezistence je změna cílové struktury, receptoru, čímž dojde ke změně afinity mezi receptorem a léčivem. S rezistencí u této skupiny léčiv byly spojeny změny exprese genu pro podjednotky nikotinového acetylcholinového receptoru, stejně tak zkrácené formy podjednotek tohoto receptoru (FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021; KOTZE A.C., PRICHARD R.K. 2016).

Mechanismy rezistence k jednotlivým třídám anthelmintik se většinou liší a díky tomu je možné, že jedna třída léčiva může zůstat účinná i přestože jedinec je rezistentní k jinému typu anthelmintika. Výjimkou jsou nespecifické efluxní dráhy, které mohou vést k rezistenci k několika třídám léčiv a rozvoji tzv. multirezistence (ARSENOPOULOS K.V. et al 2021; FISSIHA W., KINDE M.Z. 2021).

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo sledovat změny v expresi zvolených genů, které kódují biotransformační enzymy cytochromy P450, UDP-glukosyltransferasy a transportéry P-glykoproteiny, v dospělých *H. contortus* kmene citlivého k anthelmintikům (ISE) a kmene k nim rezistentního (IRE) po inkubaci se sub-letální dávkou fenbendazolu.

Dílčí úkoly zahrnovaly izolaci dospělců z biologického materiálu a třídění dle pohlaví; vystavení jedinců působení sub-letální dávky FBZ po dobu 4 a 12 hodin; izolaci RNA, reverzní transkripci, stanovení relativní exprese jednotlivých genů v ovlivněných a kontrolních dospělých za pomoci qPCR a porovnání změn v expresi.

4. Experimentální část

4.1. Biologický materiál, přístrojové vybavení, reagensie a chemikálie

Biologický materiál

Zdravá jehňata, 3-4 měsíce stará, byla infikována perorální suspenzí obsahující přibližně 600 larev třetího stádia (L3) *H. contortus*. Pro tuto studii byl vybrán kmen citlivý k anthelmintikům (ISE) a kmen k nim rezistentní (IRE). Ovce byly chovány v akreditovaných stájích Zemědělské společnosti Býšť ve vnitřních boxech pro prevenci nákazy jinými gastrointestinálními parazity. Pro kontrolu rozsahu infekce byl po pěti týdnech odebrán trus a po sedmi týdnech byla jehňata omráčena a usmrcena. Následně byl odebrán sléz obsahující dospělé jedince *H. contortus*. Se všemi zvířaty bylo zacházeno v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. Ve znění pozdějších předpisů a dle Vyhlášky č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat.

Přístrojové vybavení

Automatické pipety – Eppendorf

Blokový inkubátor - Eppendorf

Centrifuga – Biofuge Stratos Heraeus, Thermo Scientific

Hlubokomrazicí box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific

Homogenizátor - 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

Reagensie a chemikálie

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 médium RPMI-1640 (modifikované) - Sigma-Aldrich

fenbendazol – Sigma-Aldrich

chloroform – Sigma-Aldrich

isopropanol – Sigma-Aldrich

náhodné hexamery – Generi Biotech

primery (2 referenční, housekeeping, geny pro GAPDH a NCBP, 2 geny pro cytochromy P450, 4 geny pro UGP a 2 geny pro Pgp) - Generi Biotech

qPCR Xceed SG Mix – Institute of Applied Biotechnologies

reverzní transkriptasa (RT): ProtoScript® II – New England BioLabs

RT pufr: ProtoScript II – New England BioLabs

směs deoxynukleotidů (dNTPs) - Eurogentec

TriReagent® - Molecular Research Centre

Pracovní pomůcky

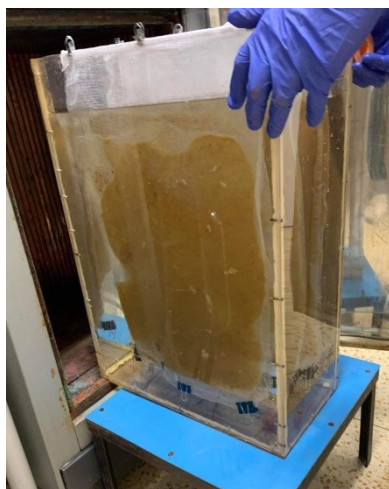
Laboratorní sklo, pinzeta, plastové zkumavky, mikrozukavky, stojany na mikrozukavky, mrazicí stojánky na mikrozukavky, pipety, pipety na malé objemy, pipetovací špičky, skleněné Pasteurovi pipety, PCR destičky, kuličky kovové a keramické, nádoba na led, buničina, rukavice.

4.2. Pracovní postupy

4.2.1. Izolace dospělců z biologického materiálu

Dospělí jedinci *H. contortus* byli získáni ze slezu infikovaných ovcí za použití agarové metody (Obr. 2) (VAN WYK et al. 1980). Po jejich izolaci byli podle morfologických znaků typických pro samce a samice rozříděni. Určení pohlaví bylo provedeno okometricky proti černému pozadí. (Obr. 3). U samic lze pozorovat červenobílé pruhování tvořené krví naplněným střevem, kolem nějž jsou omotány vaječníky. Zároveň jsou samice širší, delší a

aktivnější než samci. Kontrola morfologických znaků byla provedena za použití binokulárního mikroskopu, kde se k identifikaci využila přítomnost vulvy ve střední, nebo koncové části těla u samic a kopulační burzy na konci těla samců.



Obrázek 2 Izolace dospělců agarovou metodou

Zdroj fotografie – Kateřina Šulcová



Obrázek 3 Třídění dospělců dle pohlaví

Nahoře vlevo samci, nahoře vpravo samice, dole třízená směs

Zdroj fotografie – Kateřina Šulcová

4.2.2. Inkubace s léčivem

Po roztřídění byli dospělci inkubováni s léčivem. Pro každý vzorek byly použity 2 ml fenbendazolu rozpuštěného v DMSO a 1000x zředěného v RPMI médiu, aby výsledná koncentrace FBZ byla 1 μ M. Pro kontrolní vzorek byl místo FBZ použit DMSO s výslednou koncentrací 0,1%, odpovídající koncentraci DMSO ve vzorku s FBZ. Do připravených jamek

s FBZ/DMSO byli umístění dospělci: 10 samic, či 15 samců. Inkubace byla provedena při 37°C po dobu 4 h nebo 12 h v atmosféře s 10% CO₂. Po ukončení inkubace byli červi opláchnuti PBS pufrem, osušeni a umístěni do řádně označených 2 ml zkumavek s 1 ml TRIzolu a zamrazení na -80°C.

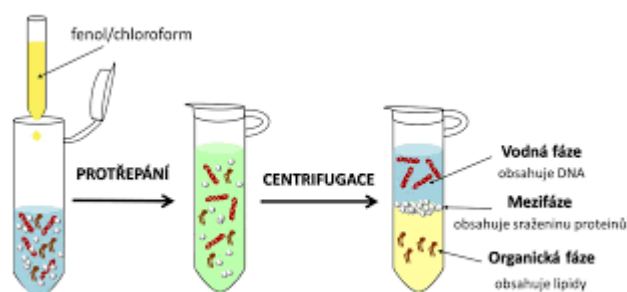
4.2.3. Izolace RNA

K izolaci RNA byla použita směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, označovaná TRIzol. Tato směs umožňuje lýzu buněk a tkání a zároveň zajišťuje vyšší stabilitu RNA. Jedinci byli do této směsi uloženi v předchozím kroku. RNA je velmi náchylná k působení volně se vyskytující RNAsy, a proto je nutné pracovat v k tomu určeném laminárním boxu a rukavicích.

Vzorky červů byly rozmrazeny a v laminárním boxu byly přidány drobné keramické kuličky, které pomohou rozrušit tkáň a homogenizovat obsah zkumavek. Následně byly vloženy do homogenizátoru a homogenizovány 3krát 40 vteřin na 6 m/s, mezi jednotlivými cykly byly zkumavky zchlazeny na ledu, aby nedošlo k znehodnocení vzorku teplem vzniklým během homogenizace.

Po 5ti-minutovém stání při pokojové teplotě již následovala samotná izolace za použití fenol-chloroformové extrakce. Při tomto procesu dojde k oddělení RNA od lipidů a proteinů pomocí přidavku 200 µl s vodou nemísitelného chloroformu. Po intenzivním třepání v ruce a 2-3 minutovém stání byly zkumavky stočeny v chlazené centrifuze při 12 000 g po dobu 15 minut. Během toho došlo k oddělení dolní organické fáze s chloroformem a lipidy, prstence tvořeného precipitovanými proteiny a horní vodné fáze, ve které je obsažena RNA (Obr. 4).

Vodná fáze byla přenesena do nové zkumavky, minimální objem by měl být 400 µl. Zde je nutno postupovat opatrně a nedotknout se pipetou prstence oddělujícího fáze, aby nedošlo ke kontaminaci izolované RNA.



Obrázek 4 fenol-chloroformová extrakce

Zdroj: http://biochemie.lfp.cuni.cz/pages/vyuka/materialy/archivV/Leiden_theorie.pdf

Do přenesené vodné fáze se pak přidalo 500 µl isopropanolu a obsah byl důkladně promíchán na vortexu. Po 10ti-minutovém stání při pokojové teplotě následovala opětovná centrifugace, tentokrát po dobu 10 minut při 12 000 g. Během tohoto procesu dojde k vysrážení RNA na dně zkumavky a vzniku tzv. pelety.

V dalším kroku byl supernatant odstraněn a nahrazen 75 % ethanolem čerstvě připraveným z absolutního ethanolu naředěného DEPC vodou. Vzorek byl v ruce promíchán, aby došlo k oddělení pelety od stěny zkumavky a jejímu důkladnému opláchnutí. Následně se vzorek naposledy centrifugoval při 7 500 g po dobu 5 minut a byl odstraněn supernatant. K tomu byla použita skleněná pipeta s vytaženým koncem, která umožňuje důkladné odstranění kapaliny bez porušení pelety. Po odpaření zbytkového ethanolu byly pelety dle velikosti rozpuštěny v 20-40 µl DEPC vody a zkumavky důkladně promíchány.

Podle dalšího postupu byly vzorky uloženy na led, nebo zamrazeny při -80°C .

4.2.4. Měření koncentrace a čistoty RNA

Čistota a koncentrace izolované RNA byla měřena spektrofotometricky na přístroji Tecan Spark. Pro stanovení míry kontaminace proteiny bylo využito měření absorbance při dvou vlnových délkách. Při 260 nm vykazují absorpční maximum nukleové kyseliny a při 280 nm proteiny. Následně byl stanoven poměr absorbancí A_{260}/A_{280} .

Ideálně by se hodnoty měly pohybovat v rozmezí 1,8-2,0. V případě, že je poměr nižší než 1,75, došlo k velké kontaminaci proteiny nebo organickými látkami. Je možné měřit i míru kontaminace chloroformem za pomoci poměru A_{260}/A_{230} .

4.2.5. Ošetření DNAsou I

Vzorky byly ošetřeny DNAsou, aby byla odstraněna případná kontaminace genomovou DNA. DNAsa selektivně štěpí pouze DNA, RNA tedy zůstane neporušena. K tomuto kroku byla použita endonukleasa DNAsa I. Množství reagentů vychází z naměřené koncentrace RNA v předchozím kroku a opět byla provedena v laminárním boxu v rukavicích.

Do předem připravených zkumavek byly napipetovány objemy vzorku tak, aby pro každý vzorek byly ve zkumavce 4 µg RNA v DEPC vodě, vše je nutno špičkou pipety promíchat. Následně byly přidány 4 µl mastermixu obsahujícího DNAsu a pufr v poměru 1:3. Množství přidávané vody bylo dopočítáno tak, aby byl celkový objem roven 30 µl. Pro ilustraci viz *Tabulka 1*.

Tabulka 1 Příklad výpočtu objemů RNA a vody

| | koncentrace (ng/μl) | 4 μg RNA | μl H ₂ O (do 26 μl) |
|----|---------------------|----------|--------------------------------|
| F1 | 1526,71 | 2,6 | 23,4 |
| F2 | 1799,04 | 2,2 | 23,8 |
| F3 | 1970,60 | 2,0 | 24,0 |
| F4 | 1700,53 | 2,4 | 23,6 |
| M1 | 942,12 | 4,2 | 21,8 |
| M2 | 1049,86 | 3,8 | 22,2 |
| M3 | 566,16 | 7,1 | 18,9 |
| M4 | 705,11 | 5,7 | 20,3 |

Vzniklá směs byla následně důkladně promíchána na vortexu, krátce stočena na stolní centrifuze, aby na stěnách zkumavek neulpívaly kapičky, a zkumavky byly vloženy do inkubátoru na dobu 25 minut při 37°C a třepáním nastaveným na 500 rpm.

Po inkubaci bylo přidáno 1,5 μl 0,1 M EDTA, vzorky byly promíchány a stočeny jako po přidání mastermixu a opět inkubovány po dobu 10 minut při 75°C. Tímto krokem dojde k inaktivaci přidané DNAsy. Po inkubaci je nutno zkumavky umístit na led.

V posledním kroku byly vzorky naředěny DEPC vodou tak, aby výsledná koncentrace RNA byla 0,1 μg/μl. Po přidání vody byly vzorky důkladně promíchány a dle dalšího kroku buď uloženy na led, či zamraženy při -80°C.

4.2.6. Reverzní transkripce

V tomto kroku je RNA činností reverzní transkriptasy převedena na jednořetězcovou cDNA (complementary DNA). Tento proces probíhá v PCR cykléru za použití náhodných hexamerů jako primeru pro amplifikaci.

Vzorky byly znovu rozmrazeny a promíchány na vortexu. Do nových zkumavek byl napipetován 1 μl náhodných hexamerů, následně 5 μl v předchozím kroku ošetřené a naředěné RNA (koncentrace 0,1 μg/μl) a směs byla řádně špičkou pipety promíchána. Zkumavky byly po dobu 5 minut zahřívány v PCR cykléru na teplotu 65°C.

Na přenášení vzorků do laminárního boxu byl použit mrazící stojánek. Dalším krokem bylo přidání 14 μl mastermixu připraveného dle *Tabulky 2*. Po přidání mastermixu byly vzorky promíchány na vortexu, stočeny na stolní centrifuze a umístěny zpět do PCR cykléru.

Tabulka 2 Množství složek pro přípravu mastermixu pro reverzní transkripci

| | 1 vzorek (μ l) | 22 vzorků (μ l) |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| DEPC H ₂ O | 5,5 | 121 |
| RP pufr | 4 | 88 |
| DTT | 2 | 44 |
| dNTPs | 2 | 44 |
| RT | 0,5 | 11 |
| Celkem | 14 | 308 |

Cyklér byl nastaven na program s následujícími kroky: 1. zahřátí na 25°C po dobu 10 minut; 2. zahřívání na 42°C po dobu 50 minut a 3. zahřátí na 80°C po dobu 5 minut. Během těchto kroků dojde nejprve k nasednutí primerů na templátovou RNA v prvním kroku, následně působením reverzní transkriptasy k syntéze komplementárního řetězce DNA a v posledním kroku je reverzní transkriptasa denaturována vysokou teplotou a dochází k zastavení procesu (BERÁNEK M. 2016).

Po ukončení reakce byl každý vzorek naředěn redestilovanou, deproteinovanou vodou (ddH₂O), vzniklá cDNA byla 10x zředěna a byla uchována při -20°C. V tomto stavu jsou vzorky připraveny ke kvantitativní PCR analýze (qPCR).

4.2.7. Kvantitativní PCR (qPCR)

Polymerasová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda. Jejím principem je několikanásobná syntéza konkrétního úseku DNA podle templátového vlákna působením enzymu DNA-polymerasy. Úsek, který chceme amplifikovat, je označen pomocí primerů, krátkých oligonukleotidů (BÁRTOVÁ E. 2011; BERÁNEK M. 2016).

Reakce probíhá v termocykléru a má tři fáze: denaturace, annealing a elongace. Každý krok probíhá za specifických podmínek a postupně dochází k rozvolnění dvoušroubovice během první fáze, nasednutí primerů na komplementární místa během annealingu a nakonec k syntéze samotného nového polynukleotidového řetězce (BÁRTOVÁ E. 2011; BERÁNEK M. 2016).

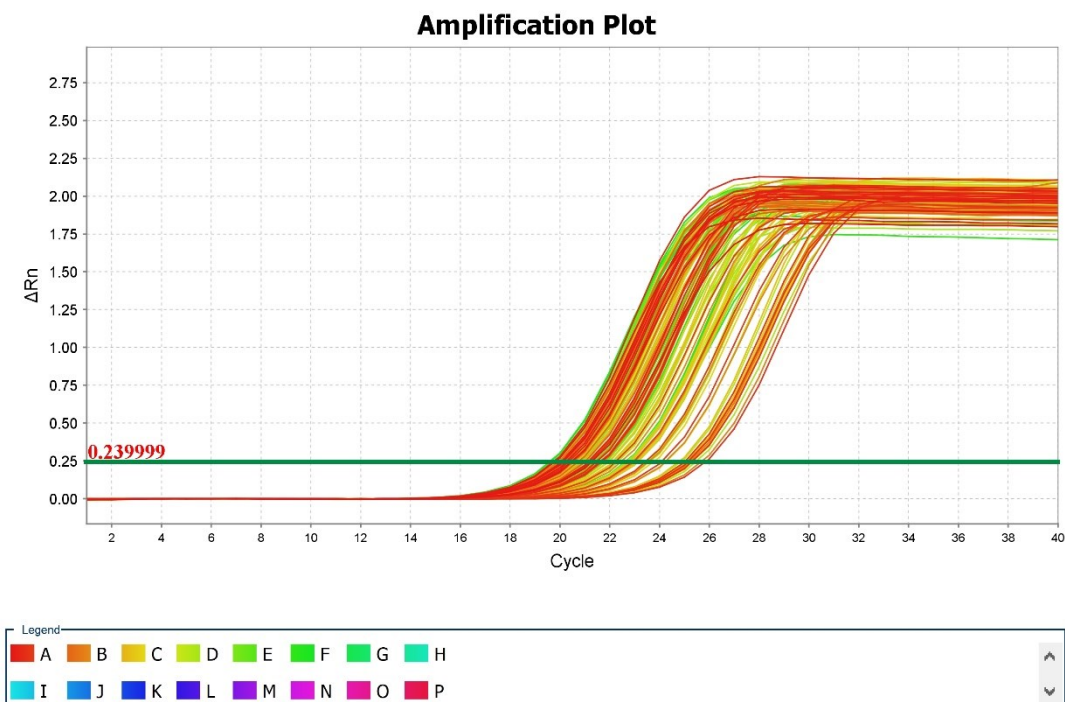
U klasické PCR reakce je produkt detekován až po ukončení reakce. Naopak během kvantitativní PCR, také označované jako PCR v reálném čase, je do reakční směsi navíc přidávána interkalační látka schopná fluorescence, či fluorescenční sonda, které během reakce hybridizují se vznikajícím vláknem. Fluorescence je měřena po každém cyklu. Pokud

k amplifikaci dochází, projeví se to zvyšující se intenzitou fluorescence. Můžeme tak v průběhu reakce (v reálném čase) sledovat průběh reakce. Křivka je pak esovitého charakteru, který je pro PCR typický (4WORKS Solutions; BERÁNEK M. 2016).

V našem případě bylo použito nespecifické barvivo SYBR Green I, které nasedá na dvouřetězcovou DNA (dsDNA), fluorescence pak odpovídá množství dsDNA v reakci. Kvantitativní PCR je schopná poměrně přesně stanovit množství vyšetřované DNA a jako v našem případě, je často párována s reverzní transkripcí pro stanovení exprese genů. Mimo toto má řadu dalších využití: stanovení množství templátové DNA, která do reakce vstoupila; detekce amplifikací a delecí genů a další (BERÁNEK M. 2016).

Vyhodnocení výsledků

Amplifikační křivka (Obr. 5) je grafickým znázorněním reakce, na ose X jsou vyneseny cykly a na Y fluorescenční signál korigovaný na hodnotu pozadí. Hodnocení se provádí v exponenciální fázi, konkrétně v bodě, kdy křivka poprvé přesáhne limit detekce (treshold). Odpovídající cyklus je pak označován C_t (cycle treshold). Platí, že čím více bylo ve vzorku DNA, tím dříve dojde k překonání tohoto bodu a vstupu reakce do exponenciální fáze (4WORKS Solutions; BERÁNEK M. 2016).



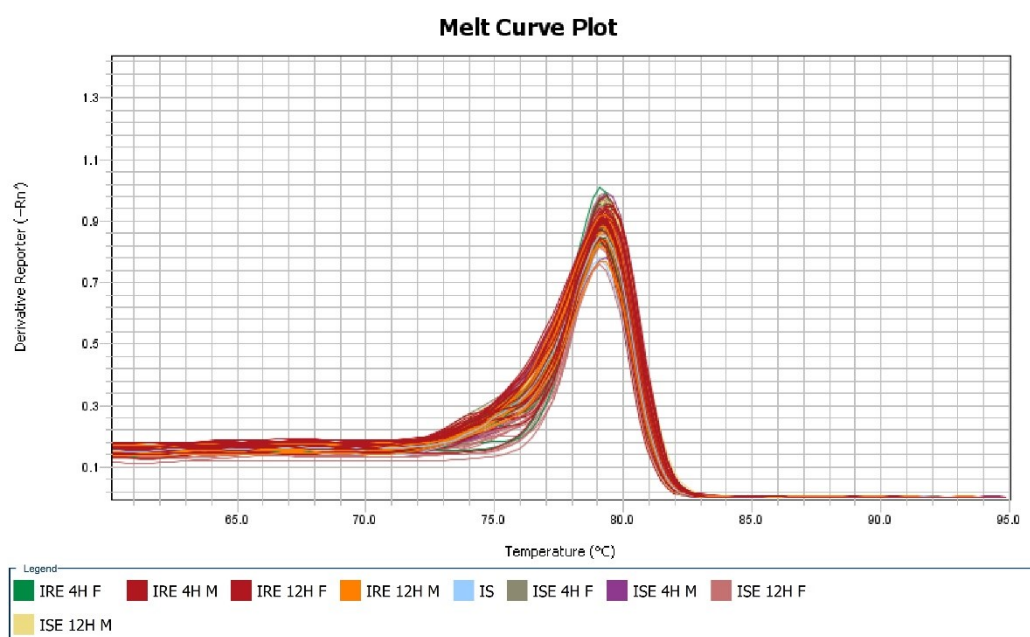
Obrázek 5 Amplifikační křivka

Zdroj: křivka z analýzy

Při absolutní kvantifikaci se vychází z kalibrační křivky, která má vždy nelineární (exponenciální) charakter. V ideálním případě dojde v rámci jednoho cyklu ke zdvojnásobení počtu amplikonů. Tato kvantifikace, však nezohledňuje ztráty, ke kterým došlo v procesu přípravy vzorku a nepočítá s vlivem inhibitorů v reakční směsi (4WORKS Solutions; BERÁNEK M. 2016).

Z toho důvodu se častěji využívá relativní kvantifikace, při které se současně s vyšetřovaným genem stanovuje gen referenční. V případě sledování genové exprese to bývá endogenní kontrolní gen, který musí mít prokázanou na okolních podmínkách nezávislou konstantní expresi (4WORKS Solutions; BERÁNEK M. 2016). V této práci byly použity geny pro glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) a Nuclear cap binding protein (NCBP).

Při použití nespecifických sond jako je námi použitá SYBR Green I, mohou vznikat nespecifické produkty, či dimery primerů. Pro kontrolu se využívá křivky tání (Obr. 6), která využívá různých hodnot teploty tání u jednotlivých produktů. Na křivce je zaznamenána fluorescence při vzrůstající teplotě. V případě, že se zde objeví pouze jeden vrchol, reakce probíhá specificky a jiné produkty se netvoří. V opačném případě dochází ke vzniku nespecifických produktů, které mají většinou teplotu tání nižší než specifický produkt (4WORKS Solutions).



Obrázek 6 Příklad křivky tání

Vlastní analýza

Pro vlastní analýzu byl použit qPCR kit obsahující DNA polymerasu, dNTPs, pufr a nespecifické barvivo SYBR Green I. Dále byly použity specifické primery pro stanovení UGT368B2, UGT367A1, UGT371A1, UGT26A2, CYP7, CYP3, Pgp9.2 a Pgp10 genů. Geny a koncentrace FBZ byly zvoleny na základě předchozí studie genové exprese po inkubaci červů se sub-letálními dávkami albendazolu (ABZ) (KELLEROVÁ P. et al. 2020). Jednotlivé složky směsi byly smíchány a vodou doplněny na konečný objem reakční směsi 6 μ l.

Mastermix byl za použití automatické pipety napipetován pro každý gen v duplikátu do 384 jamkové PCR destičky (Real-time PCR array). Jedná se o miniaturizaci, výrazně tím dojde k ušetření reagensů. Následně byly napipetovány 2 μ l vzorku. Výsledný objem byl 8 μ l. Navíc byla pro každý gen přidána negativní kontrola pro odhalení případné kontaminace, kde byla místo vzorku použita redestilovaná voda.

Tabulka 3 Složení reagensů mastermixu pro qPCR

| | 1 vzorek (μ l) | 22 vzorků (μ l) |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------|
| Redestilovaná H ₂ O | 1,68 | 36,96 |
| qPCR kit | 4,00 | 88 |
| Primer (F+R) | 0,32 | 7,04 |
| Vzorek cDNA | 2,00 | 44 |
| Celkem | 8,00 | 176 |

4.3. Statistická analýza

Získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel a následně hodnoceny za pomoci programu GraphPad Prism (9.5.1.). Vyjádřeny byly jako průměr \pm SD.

Byla využita metoda relativní kvantifikace ($\Delta\Delta C_t$), jež umožňuje stanovit změny v expresi genu u jednotlivých měřených vzorků vůči hladině exprese kontrolního vzorku. Rovněž byla provedena normalizace na referenční gen.

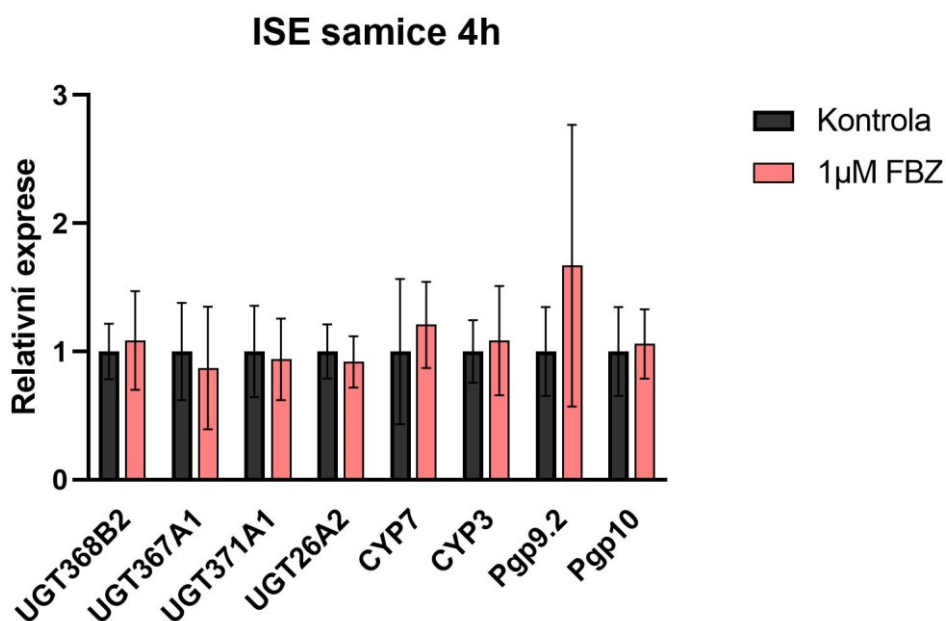
Hodnoty získané měřením duplikátů byly nejprve zprůměrovány a následně dosazeny do výrazu $2^{-(C_{tvz}-C_{tref})}$, kde C_{tvz} je C_t pro vzorek a C_{tref} je C_t pro referenční gen. Neovlivněným vzorkům byla přiřazena hodnota 1,00, k níž byly vztaženy dříve normalizované výsledky ovlivněných vzorků. Následná analýza v programu GraphPad Prism zahrnovala

metodu two-way ANOVA, Dunnettův vícenásobný srovnávací test s hladinou významnosti stanovenou na $P < 0,05$.

5. Výsledky

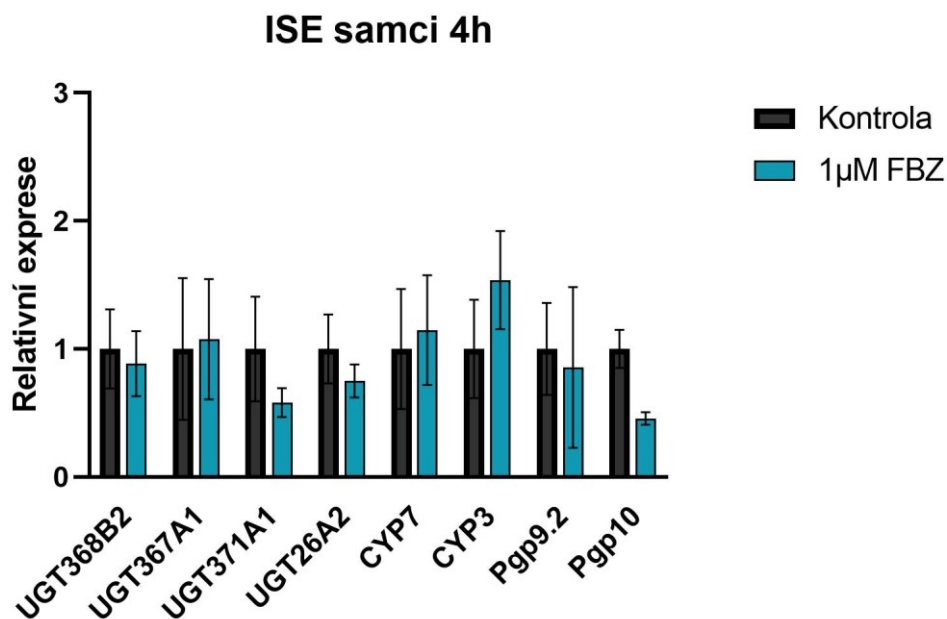
5.1. Expres vybraných genů

Graf 1 znázorňuje relativní expresi vybraných genů biotransformačních enzymů a transportérů samic *H. contortus* kmene ISE po 4hodinové inkubaci s fenbendazolem o koncentraci 1 μ M. Byla porovnána expres mRNA u červů ovlivněných FBZ vůči kontrolním neovlivněným vzorkům. Signifikantní změny exprese nebyly pozorovány u žádného z genů.



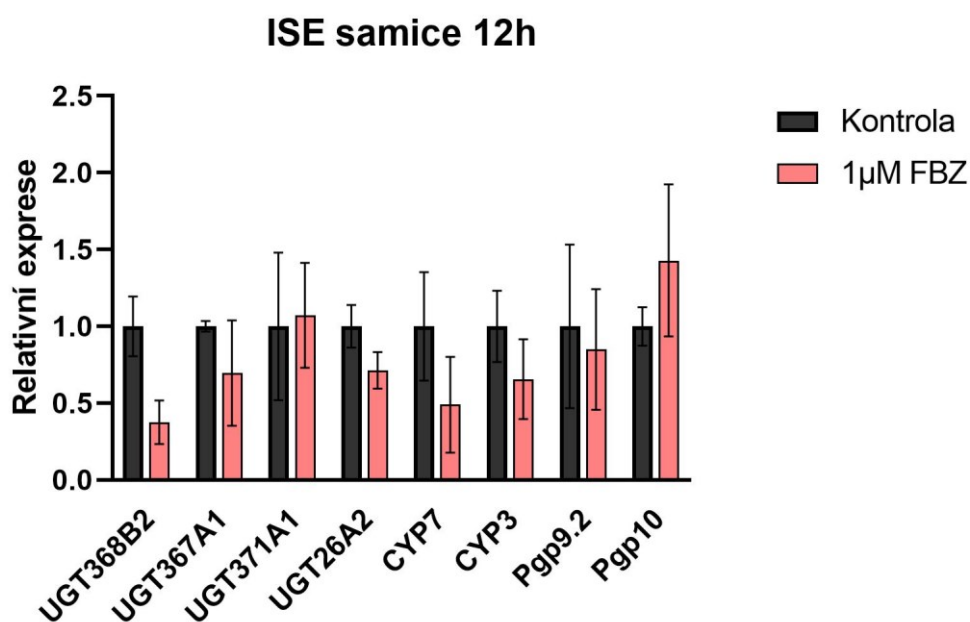
Graf 1 Porovnání exprese vybraných genů u samic *H. contortus* kmene ISE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μ M vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

Graf 2 ukazuje expresi mRNA u samců stejného kmene po 4hodinové inkubaci s FBZ o koncentraci 1 μ M vůči neovlivněné kontrole. Ani u samců nebyly pozorovány signifikantní změny exprese příslušných genů.



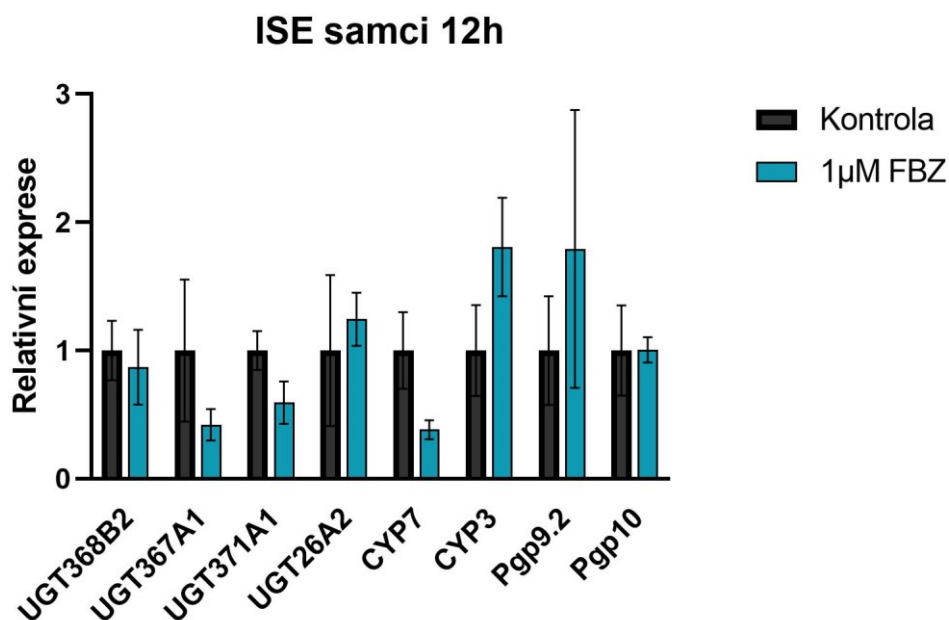
Graf 2 Porovnání exprese vybraných genů u samců *H. contortus* kmene ISE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

Graf 3 znázorňuje relativní expresi vybraných genů u samic *H. contortus* kmene ISE po 12hodinové inkubaci s fenbendazolem o koncentraci 1 μM vůči neovlivněné kontrole. Nebyly zaznamenány žádné významné změny exprese.



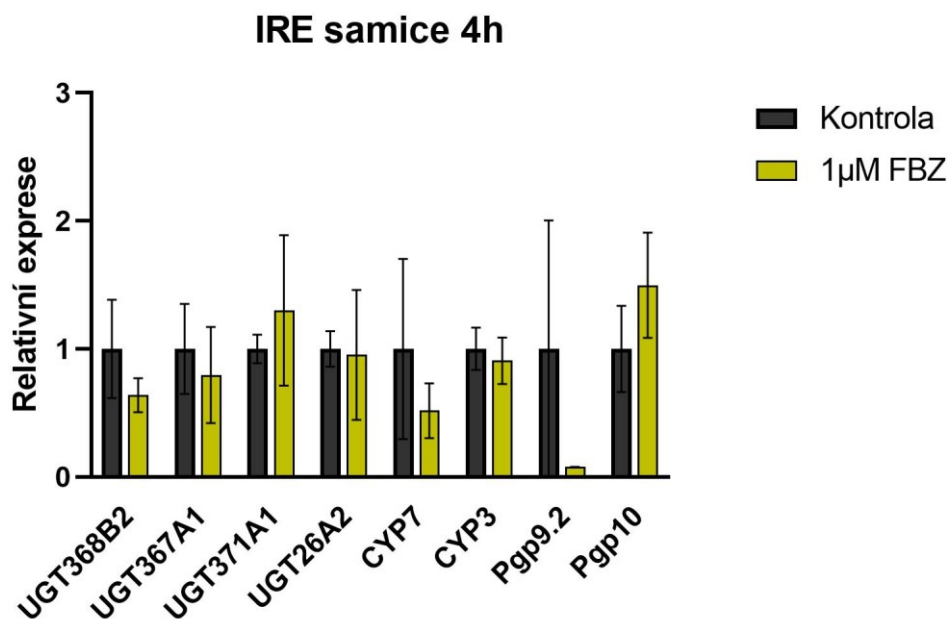
Graf 3 Porovnání exprese vybraných genů u samic *H. contortus* kmene ISE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

Následující Graf 4 ukazuje expresi mRNA u samců stejného kmene po 12hodinové inkubaci s FBZ o koncentraci 1 μ M v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v expresi genů.

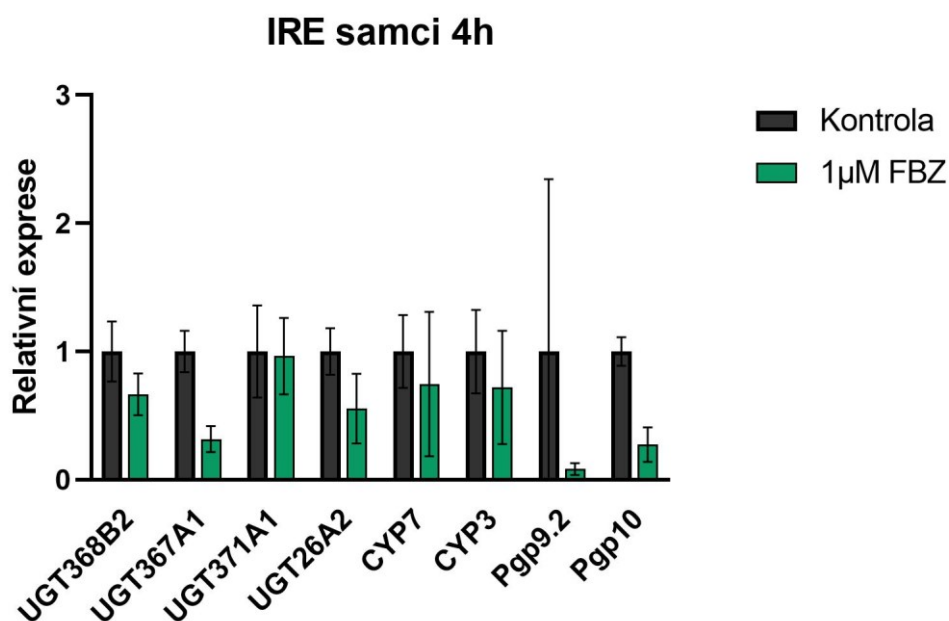


*Graf 4 Porovnání exprese vybraných genů u samců H. contortus kmene ISE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μ M vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)*

V grafech je vyobrazena exprese mRNA u samic (Graf 5) a samců (Graf 6) *H. contortus* kmene IRE po 4hodinové inkubaci s FBZ o koncentraci 1 μ M. Expres byla rovněž porovnána s kontrolními neovlivněnými vzorky. V obou případech nedošlo k zaznamenání významných změn v expresi vybraných genů.

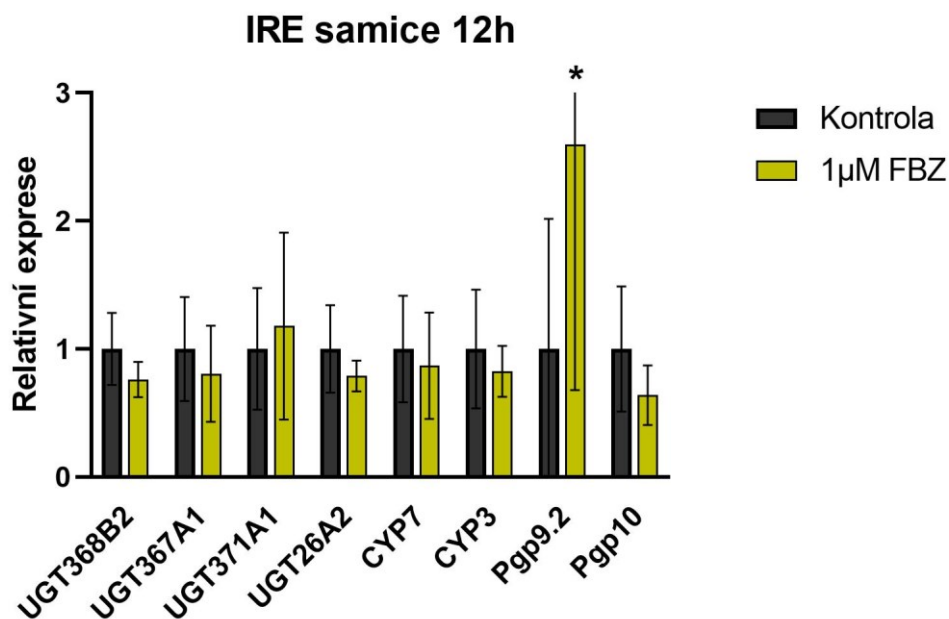


Graf 5 Porovnání exprese vybraných genů u samic *H. contortus* kmene IRE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

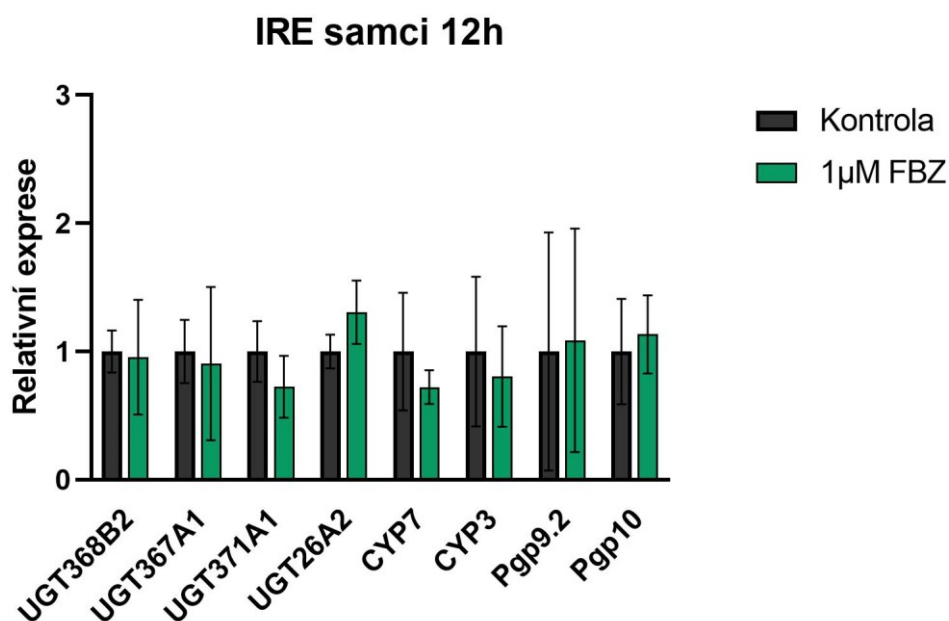


Graf 6 Porovnání exprese vybraných genů u samců *H. contortus* kmene IRE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

Na dalších dvou grafech jsou znázorněny relativní exprese vybraných genů u samic (Graf 7) a samců (Graf 8) *H. contortus* kmene IRE po 12hodinové inkubaci s FBZ porovnány s neovlivněnou kontrolou. V tomto případě byla zaznamenána signifikantně zvýšená exprese genu Pgp9.2 u samic. Žádné další významné změny exprese pozorovány nebyly.



Graf 7 Porovnání exprese vybraných genů u samic *H. contortus* kmene IRE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)



Graf 8 Porovnání exprese vybraných genů u samců *H. contortus* kmene IRE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna ($P < 0,05$)

6. Diskuze

Stále se rozvíjející rezistence *H. contortus* k anthelmintikům je dána několika faktory. Jedním z rizik pro její vznik je dlouhodobé vystavování parazita sub-letálním dávkám, což může být zapříčiněno neadekvátní léčbou či přítomností reziduí léčiv v pastvě (KELLEROVÁ P. et al. 2019). S mechanismem rezistence k benzimidazolovým anthelmintikům jsou specificky spojovány jednonukleotidové polymorfismy v genu pro beta-tubulin 1 (SHALABY H.A. 2013). Nejedná se však o jediný způsob vzniku rezistence u nematod. Řada studií prokázala účast nespecifických mechanismů jako je zvýšení exprese biotransformačních enzymů, metabolizujících tyto látky, a efluxních transportérů. Ukázalo se, že hrají u hlístic významnou roli v rozvoji rezistence nejen na anthelmintika z rodiny benzimidazolů. (KELLEROVÁ P. et al. 2020).

Biotransformační enzymy slouží k ochraně organismu před potenciálně negativními účinky xenobiotik. U dospělců rezistentního kmene *H. contortus* byla při porovnání metabolismu benzimidazolových léčiv pozorována vyšší schopnost tvořit metabolity I. a II. fáze biotransformace než tomu tak bylo u kmene citlivého (VOKŘÁL I. et al. 2012). Studie Kellerové a kol. z roku 2020 pak prokázala, že vystavením dospělců *H. contortus* sub-letálním dávkám albendazolu, jednoho z benzimidazolových anthelmintik, dochází ke zvýšení exprese hned několika enzymů, jež se podílí na biotransformaci tohoto léčiva. Díky tomu dojde k rychlejší metabolizaci a eliminaci látky z těla parazita (KELLEROVÁ P. et al 2020).

Cílem této práce bylo sledovat změny v expresi genů, které kódují biotransformační enzymy CYP, UGT a transportéry Pgp u dospělců *H. contortus* citlivého (ISE) a k anthelmintikům rezistentního (IRE) kmene po jejich expozici sub-letální dávce fenbendazolu. Koncentrace FBZ i sledované geny byly zvoleny na základě dříve zmíněné studie Kellerové a kol. z roku 2020.

Významný podíl CYP, hlavní skupiny biotransformačních enzymů, na rozvoji lékové rezistence byl prokázán u řady druhů (KELLEROVÁ P. et al 2019). Oxidace anthelmintik byla pozorována hned u několika helmintů a u některých byla rovněž spojena s rozvojem rezistence k těmto léčivům (MATOUŠKOVÁ P. et al 2016). Studie Kellerové a kol. z roku 2019 nejprve prokázala zvýšení genové exprese CYP po vystavení sub-letálním dávkám makrocyclického laktonu ivermektinu (KELLEROVÁ P. et al 2019). V následující studii pak byla prokázána změna exprese CYP genů po inkubaci se sub-letálními dávkami albendazolu (KELLEROVÁ P. et al 2020). V obou případech došlo ke zvýšení exprese genů *cyp-3* a *cyp-7* u obou pohlaví.

V případě této práce však nebyly zjištěny žádné významné změny exprese zmíněných genů. Ve studii Stasiuk a kol. z roku 2019 byly studovány biotransformační dráhy benzimidazolů, přičemž bylo opakovaně ukázáno, že hlavní cestou biotransformace je u nematod konjugace s hexózou. Byly však prokázány i jiné způsoby metabolizace jako je oxidace prostřednictvím CYP (STASIUK S.J. et al. 2019). Na této reakci se v případě albendazolu a fenbendazolu mohou podílet rozdílné izoformy těchto enzymů, což by mohlo být příčinou toho, že jsme po expozici FBZ nepozorovali žádné signifikantní změny exprese u obou pohlaví i kmenů *H. contortus*.

Další skupinou enzymů vybranou do této práce jsou UGT zprostředkovávající zmíněnou glykosidaci, která je u hlístic častou cestou biotransformace malých sloučenin a jejich zvýšená exprese by pak mohla přispívat k ochraně organismu před benzimidazoly (STASIUK S.J. et al. 2019). Změna exprese několika UGT genů byla hlášena u dospělců *H. contortus* po expozici sub-letálními dávkami ABZ (KELLEROVÁ P. et al 2020). Bohužel obdobně jako u CYP nebyla ani u UGT zaznamenána žádná významná změna exprese vybraných UGT genů v obou kmenech i pohlavích.

Kromě těchto dvou skupin enzymů se tato práce věnovala také sledování změn exprese efluxních transportérů Pgp. U *H. contortus* bylo identifikováno několik Pgp genů, jejichž exprese byla změněna vlivem vystavení nízkým dávkám ivermektinu (KELLEROVÁ P. et al 2019). V následující studii Kellerové a kol. pak byla zaznamenána zvýšená exprese *pgp-9.2* u samců, *pgp-10* a *pgp-11* u samic po expozici ABZ (KELLEROVÁ P. et al 2020). V této práci byla pozorována pouze signifikantní změna exprese u genu *pgp-9.2* u samic kmene IRE *H. contortus*. K indukci exprese došlo až po 12hodinové inkubaci s FBZ. U kratší expozice nebyly žádné významné změny zjištěny, transkriptomická odpověď se nezměnila ani u samců stejného kmene. Protože rozdílná exprese genů pro Pgp (KELLEROVÁ P. et al 2019), CYP (STUHLÍKOVÁ L.R. 2018) a UGT (MATOUŠKOVÁ P. et al. 2018) už byla zaznamenána v několika dřívějších studiích, sledované rozdíly exprese Pgp genů v této práci přispívají k důkazům o pohlavně specifické detoxikaci.

Skutečnost, že došlo ke změně exprese tohoto genu pouze u kmene rezistentního k benzimidazolům nikoli u kmene citlivého souhlasí s již známým vztahem Pgp s rezistencí obecně a přispívá k teorii, že tyto transportéry hrají jistou roli v rezistenci k benzimidazolům.

V porovnání se studií Kellerové a kol. (2020) věnované albendazolu nebyly u fenbendazolu sledovány změny v expresi žádného z vybraných genů pro CYP a UGT. V případě Pgp jsme pozorovali změnu v expresi *Pgp-9.2* u samic, naopak Kellerová a kol. tuto

změnu zaznamenali po expozici albendazolu u samců (KELLEROVÁ P. et al 2020). To poukazuje na rozdíly v genové expresi po expozici různými léčivy ze skupiny benzimidazolů.

Rozdíly sledované jak mezi pohlavím, tak u různé délky expozice ukazují na význam sledování exprese u obou pohlaví zvláště a v několika časových intervalech. Otázkou stále zůstává míra, do jaké se změna exprese genů transportérů podílí na rezistenci k léčivu. Námi zjištěné výsledky dále korespondují s již zmíněnou studií Stasiuk a kol. z roku 2019, která zjistila změnu transkripce v reakci na vystavení FBZ pouze u vývojového stádia L3 *H. contortus*.

V souvislosti se sub-letálními dávkami léčiva je možnost rozvoje rezistence zmíněna ve studiích Kellerové a kol. z roku 2019 a 2020 a v této práci. S ohledem na výsledky a poměrně úzký výběr genů by bylo vhodné v tématu pokračovat a studii dále rozšiřovat s volbou jiných genů či se zaměřit na studium exprese u zmíněného vývojového stádia L3.

7. Závěr

Cílem této práce bylo sledovat změny v expresi genů biotransformačních enzymů CYP a UGT a efluxních transportérů Pgp u dospělců *H. contortus* dvou různých kmenů, rezistentního k benzimidazolům IRE a citlivého kmene ISE, po expozici sub-letální dávce fenbendazolu.

Vzhledem k výsledkům zjištěným v práci lze říct, že na rozdíl od albendazolu, FBZ v sub-letální dávce (1 μ M) vybrané zástupce ze dvou skupin biotransformačních enzymů CYP a UGT neindukuje. Signifikantní změna byla pozorována pouze u genu *pgp-9.2*. Indukce tohoto genu byla pozorována pouze u samic *H. contortus* kmene IRE po 12hodinové inkubaci. S ohledem na indukci efluxního transportéru pouze u kmene IRE se můžeme domnívat, že může souviset s rozvojem rezistence u samic *H. contortus*. Vhodné by však bylo širší testování např. s různými koncentracemi FBZ.

8. Použité zkratky

| | |
|-----------------------|---|
| ABC | ATP binding cassette (ATP-vazebné kazetové transportéry) |
| ABZ | albendazole (albendazol) |
| cDNA | complementary DNA (komplementární DNA) |
| Ct | cycle of treshold (cyklus s nárůstem fluorescence nad práh pozadí) |
| CYP | cytochrome P450 (cytochrom P450) |
| ddH ₂ O | double-distilled water (redestilovaná voda) |
| DEPC | diethylpyrocarbonate (diethylpyrokarbonát) |
| DEPC H ₂ O | diethylpyrocarbonate treated water (voda ošetřená 0,1 % diethylpyrokarbonátem) |
| DMSO | dimethylsulfoxid (dimethylsulfoxid) |
| DNA | deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleoná kyselina) |
| dsDNA | double-strand DNA (dvouvláknová DNA) |
| dNTPs | deoxyrnucleotides (směs deoxynukleotidů) |
| DTT | dithiotreitol |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)) |
| FBZ | fenbendazole (fenbendazol) |
| GABA | gamma aminobutyric acid (kyselina gama-aminomáselná) |
| GAPDH | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa) |
| IRE | inbred resistant Edinburgh stain |
| ISE | inbred susceptible Edimburgh stain |
| L1, L2, L3 | first, second, third larval stage (larvální stádium prvního, druhého, třetího stupně) |
| mRNA | messenger RNA (mediátorová RNA) |
| NCBP | nuclear cap binding protein |
| P | p-value (hladina významnosti) |

| | |
|------|--|
| PBS | phosphate buffered saline (fosfátový pufr) |
| Pgp | P-glycoprotein |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) |
| RNA | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina) |
| RT | reverse transcriptase (reverzní transkriptasa) |
| SD | standard deviation (směrodatná odchylka) |
| UDP | uridine diphosphate (uridindifosfát) |
| UGT | UDP-glucuronosyltransferase/glucosyltransferase (glukuronosyltransferasa/glukosyltransferasa) |
| UV | ultraviolet (ultrafialové záření) |

9. Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| <u>Obrázek 1 Fenbendazol</u> | 16 |
| <u>Obrázek 2 Izolace dospělců agarovou metodou</u> | 24 |
| <u>Obrázek 3 Třízení dospělců dle pohlaví</u> | 24 |
| <u>Obrázek 4 fenol-chloroformová extrakce</u> | 25 |
| <u>Obrázek 5 Amplifikační křivka</u> | 29 |
| <u>Obrázek 6 Příklad křivky tání</u> | 30 |

10. Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| <u>Tabulka 1 Příklad výpočtu objemů RNA a vody</u> | 27 |
| <u>Tabulka 2 Množství složek pro přípravu mastermixu pro reverzní transkripci</u> | 27 |
| <u>Tabulka 3 Složení reagentů mastermixu pro qPCR</u> | 31 |

11. Seznam grafů

| | |
|--|----|
| <i>Graf 1 Porovnání exprese vybraných genů u samic H. contortus kmene ISE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 33 |
| <i>Graf 2 Porovnání exprese vybraných genů u samců H. contortus kmene ISE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 34 |
| <i>Graf 3 Porovnání exprese vybraných genů u samic H. contortus kmene ISE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 34 |
| <i>Graf 4 Porovnání exprese vybraných genů u samců H. contortus kmene ISE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 35 |
| <i>Graf 5 Porovnání exprese vybraných genů u samic H. contortus kmene IRE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 36 |
| <i>Graf 6 Porovnání exprese vybraných genů u samců H. contortus kmene IRE po 4 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 36 |
| <i>Graf 7 Porovnání exprese vybraných genů u samic H. contortus kmene IRE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 37 |
| <i>Graf 8 Porovnání exprese vybraných genů u samců H. contortus kmene IRE po 12 h expozici FBZ o koncentraci 1 μM vůči kontrole; * signifikantní změna (P < 0,05)</i> | 37 |

12. Použitá literatura

- 4WORKS Solutions. Real-time PCR. LAB Guide Průvodce laboratoří. [online]. [cit. 28.2.2023]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- AL AMIN A.S.M., WADHWA R. Helminthiasis. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [online]. [Updated 2022 Jul 18]. [cit. 26.2.2023]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560525/>
- ARSENOPOULOS K.V., FTHENAKIS G.C., KATSAROU E.I., PAPADOPOULOS E. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals (Basel)*. 2021. 11(2)/363.
- BARON S., editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.
- BÁRTOVÁ E. PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie*. VFU Brno. 2011. [cit. 28.2.2023]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
- BERÁNEK M. *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. Karolinum. Praha. 2016. ISBN: 978-80-246-3246-9.
- BESIER R.B., KAHN L.P., SARGISON N.D., VAN WYK J.A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Adv Parasitol*. 2016. 93/181-238.
- ČÁŇOVÁ K., ROZKYDALOVÁ L., RUDOLF E. Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica*. Hradec Králové. 2017. 60(1)/5-11.
- DOBŠÍKOVÁ R., ŠIROKÁ Z., BLAHOVÁ J. *Farmakologie v produkci potravin*. Veterinární a farmaceutická univerzita. Brno. 2012.
- FISSIHA W., KINDE M.Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infect Drug Resist*. 2021. 14/5403-5410.
- FOX M.T. *Gastrointestinal Parasites of Sheep and Goats*. Merck Manual, Veterinary Manual. 2014. [online]. [Modified Oct 2022]. [cit. 26.2.2023] Dostupné z: <https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/gastrointestinal-parasites-of-sheep-and-goats>

HARDER A. Biochemistry of *Haemonchus contortus* and other parasitic nematodes, *Adv. parasitol.* 2016. 93/69-94. ISSN 0065-308X.

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

JEŽKOVÁ T. Hemonchóza. *Veterinární průvodce*. 2022. [online]. [cit. 25.2.2023] Dostupné z: <https://zverolekarka.com/hemonchoza/>

KELLEROVÁ P., MATOUŠKOVÁ P., LAMKA J., VOKŘÁL I., SZOTÁKOVÁ B., ZAJÍČKOVÁ M., PASÁK M., SKÁLOVÁ L. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults. *Vet Parasitol.* 2019. 273/24-31.

KELLEROVÁ P., STUHLÍKOVÁ L.R., MATOUŠKOVÁ P., ŠTĚRBOVÁ K., LAMKA J., NAVRÁTILOVÁ M., VOKŘÁL I., SZOTÁKOVÁ B., SKÁLOVÁ L. Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. *Vet Res.* 2020. 51(1)/94.

KOTZE A.C., PRICHARD R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv Parasitol.* 2016. 93/397-428.

LAMKA J., DUCHÁČEK L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3.vyd. Karolinum. Praha. 2006: 151 s.

LANKOVÁ S.; LANGROVÁ I. a kol. *Postup helmintologické pitvy a postmortální detekce helmintů vyskytujících se u domácích zvířat v České republice*. ČZU a VÚŽV. Powerprint. Praha. 2018. ISBN: 978-80-7403-208-0.

MATOUŠKOVÁ P., LECOVÁ L., LAING R., DIMUNOVÁ D., VOGEL H., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ L., NGUYEN L.T., KELLEROVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B., VARADY M., SKÁLOVÁ L. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2018. 8/420–429.

MATOUŠKOVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SKÁLOVÁ L. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends Parasitol.* 2016. 32(6)/481-491.

SENDOW J. "*Haemonchus contortus*". *Animal Diversity Web*. 2003. [online]. [cit. 25.2.2023] Dostupné z: https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus_contortus/

SHALABY H.A. Anthelmintics resistance; how to overcome it? J Parasitol. Iran. 2013. 8/18-32.

SCHÁŇKOVÁ Š., LANGROVÁ I., VADLEJCH J. Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metody in vitro. Praha. 2013. ISBN 978-80-213-2412-1.

SMRŽ J. Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů. Karolinum Press. Praha. 2015. ISBN 978-80-246-2258-3

STASIUK S.J., MACNEVIN G., WORKENTINE M.L., GRAY D., REDMAN E., BARTLEY D., MORRISON A., SHARMA N., COLWELL D., RO D.K., GILLEARD J.S. Similarities and differences in the biotransformation and transcriptomic responses of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus* to five different benzimidazole drugs. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2019. 11/13-29.

STEJSKAL F. Současná léčba helmintóz. Klin Farmakol Farm. 2005. 19: 111–115

STUHLÍKOVÁ L.R., MATOUŠKOVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B., SEČKAŘOVÁ A., DIMUNOVÁ D., NGUYEN L.T., VÁRADY M., SKÁLOVÁ L. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. Int. J. Parasitol. Drug. 2018. 8/50–58.

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv - aktuálně registrované VLP. [online]. [cit. 14.3.2023] Dostupné z: <https://uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>

<https://uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp/vyhledane-pipravky-vlp?nazev=&latka=Fenbendazolium&datumOd=&datumDo=®cislo=&drzitel=&baleni=&atcKod=&olFrom=&olTo=&olUnit=0&vyhledat=>

VAN WYK J.A., GERBER H.M., GROENEVELD H.T. A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. Onderstepoort J Vet Res. 1980. 47(3)/147-58.

VOKŘÁL I., BARTÍKOVÁ H., PRCHAL L., STUHLÍKOVÁ L., SKÁLOVÁ L., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M., KUBÍČEK V. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. Parasitology. 2012. 139/1309–1316.

VOKŘÁL I., JIRASKO R., STUHLÍKOVÁ L., BÁRTÍKOVÁ H., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M., SKÁLOVÁ L. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet Parasitol.* 2013. 196/373–381.

VOLF P., HORÁK P. a kol. Paraziti a jejich biologie. Triton. Praha. 2007. 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9

VOKŘÁL I., BÁRTÍKOVÁ H., PRCHAL L., STUHLÍKOVÁ L., SKÁLOVÁ L., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M., KUBÍČEK V. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology.* 2012. 139(10)/1309-16.