

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

Diplomová práce

2024

Bc. Markéta Babičková

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

**Sledování exprese aldo-ketoreduktas u vlasovky
slezové**

**The expression analysis of aldo-keto reductases in
*Haemonchus contortus***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Markéta Babičková

Studijní program: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

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

Rok obhajoby: 2024

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne

Bc. Markéta Babičková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou chci poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a ochotu pomoci mi při zpracování mé diplomové práce, která vznikla za finanční podpory GAČR 20-14581Y. Dále chci poděkovat pracovníkům na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kde jsem mohla vykonávat praktickou část své práce. Dále děkuji své rodině, která mě velmi podporovala.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Markéta Babičková

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

Název diplomové práce: Sledování exprese aldo-ketoreduktas u vlasovky slezové

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je krev sající hlístice vyskytující se převážně u hospodářských zvířat. Tato hlístice způsobuje onemocnění zvané hemonchóza. Během svého vývoje si vytvořila rozvíjející se rezistenci na anthelmintika, což i přes dobré strategie je stále větší celosvětový problém. Aldo-ketoreduktasy (AKR) se řadí do super rodiny NADPH-dependetních oxidoreduktas katalyzujících oxidačně-redukční reakce aldehydů a ketonů v různých organismech od bakterií po savce. U savců jsou hojně exprimovány v různých tkáních. Jejich zásadní role je hlavně v metabolismu hormonů, xenobiotik, eobiotik, oxidativních molekul anebo role v lékové rezistenci. Některé druhy AKR jako je např. aldosaředuktasa (ADR) jsou schopné organismus poškodit. Bohužel je o těchto enzymech v *H. contortus* popsáno velmi málo, a proto se tato diplomová práce zabývá zkoumáním domnělých genů AKR v této hlístici. Pomocí sekvenace genomu se určilo 22 genů z nadrodiny AKR. Byly zjištěny exprese všech AKR ve vajíčkách, larvách a dospělých. Dále se porovnávala exprese AKR ve vývojových stádiích u kmene citlivého (ISE) a kmene *H. contortus* rezistentního na benzimidazoly (IRE). AKR1, AKR3 a AKR10 byly exprimovány ve všech stádiích nejvíce, zatímco ostatní AKR pouze okrajově. Při porovnání exprese mezi kmeny ISE a IRE se objevily dvě AKR u kmene IRE s velmi vysokou expresí u dospělců. Jde o AKR17 a AKR19, které mohou souviset s lékovou rezistencí. Dle získaných výsledků by bylo zajímavé se vybraným AKR věnovat více do hloubky.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical sciences

Candidate: Bc. Markéta Babičková

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

Title of diploma theses: The expression analysis of aldo-keto reductases in *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus is a blood-sucking nematode found mainly in livestock. This nematode causes a disease called haemonchosis. During its evolution, it has developed emerging resistance to anthelmintics, a is growing global problem despite good strategies. Aldo-ketoreductases (AKRs) belong to the super family of NADPH-dependent oxidoreductases catalyzing oxidation-reduction reactions of aldehydes and ketones in various organisms from bacteria to mammals. In mammals, they are abundantly expressed in various tissues. Their essential role is mainly in the metabolism of hormones, xenobiotics, eobiotics, oxidative molecules or a role in drug resistance. Some species, such as aldoseduktasa (ADR), are also capable of damaging the organism. Unfortunately, very little has been described about these enzymes in *H. contortus*, and therefore this thesis deals with the investigation of putative AKR genes in this nematode. Genome sequencing identified 22 genes from the AKR superfamily. Expressions of all AKRs were detected in eggs, larvae and adults. Furthermore, the expression of AKR in the developmental stages of the drug-susceptible strain (ISE) and the benzimidazole-resistant strain (IRE) of *H. contortus* was compared. AKR1, AKR3 and AKR10 were expressed the most in all stages, while the other AKRs were only marginally expressed. When expression was compared between ISE and IRE strains, two AKRs appeared in the IRE strain with very high expression in adults. These are AKR17 and AKR19, which may be associated with drug resistance. According to the results, it would be interesting to pay more attention to selected AKRs in the future.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Helminți	10
2.1.1	Nematoda	12
2.2	<i>Haemochus spp.</i>	14
2.2.1	Vlasovka slezová	14
2.3	Helmintické infekce	16
2.3.1	Přenos	17
2.3.2	Klinické příznaky	18
2.3.3	Patogeneze	18
2.3.4	Diagnostika	18
2.3.5	Léčba	19
2.3.6	Rezistence na anthelmintika	20
2.3.7	Farmaceutická kontrola	21
2.3.8	Nechemická kontrola	22
2.3.9	Hemonchóza	22
2.3.10	Systém FAMACHA	23
2.4	Metabolismus xenobiotik	24
2.4.1	Fáze metabolismu xenobiotik	25
2.4.2	Aldo-ketoreduktasy	27
3	CÍLE PRÁCE	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Biologický materiál	33
4.2	Chemikálie, technické vybavení a pomůcky	33
4.2.1	Chemikálie	33
4.2.2	Technické vybavení	34
4.2.3	Pomůcky	35
4.3	Metodika	36

4.3.1	Reverzní transkripce	36
4.3.2	Kvantitativní PCR v reálném čase	37
4.3.3	Statistické zpracování dat	41
5	VÝSLEDKY	42
5.1	Způsob vyhodnocení naměřených dat	42
5.2	Sekvenční analýza a lokalizace genomu	46
5.3	Porovnání exprese AKR v různých životních cyklech ISE kmene	47
5.4	Porovnání exprese mezi kmeny IRE a ISE.....	49
6	DISKUZE.....	54
7	ZÁVĚR	56
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1 ÚVOD

Diplomová práce předkládá obsáhlé informace o helmitech konkrétně o *Haemonchus contortus*, anthelmintických infekcích, lékových rezistencích a studovaných genech aldo-ketoreduktas.

Helminti jsou parazitičtí červi tvořící heterogenní skupinu organismů. Do této skupiny patří hojně studovaná krev sající hlístice *Haemonchus contortus*. Jedná se o nebezpečného parazita, který parazituje na mladých a malých hospodářských zvířatech. Během svého života se z teplých a vlhkých tropů a subtropů dostal díky migraci i do chladnějších podnebí a můžeme se s ním setkat i v severní Evropě. Tato hlístice způsobuje u ovcí a koz onemocnění zvané hemonchóza. V důsledku napadení trpí zvířata hlavně anémií nebo subkutánním otokem, dochází k intoleranci zátěže z důvodu nedostatku krve nebo krvácení a dochází až k úhynu zvířat. Pomocí určitých lékových a nechemických strategií se zabraňuje jejich šíření. Mezi hojně využívané léky patří benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony a aminoacetonitrilové deriváty. I přes jejich vysokou účinnost, místy čelí léčba vysoké rezistenci v důsledku nadužívání anthelmintik. Na katedře biochemických věd se problematice rezistence věnují v rámci několika projektů. Projekt GAČR Dr. Raisové Stuchlíkové se zabýval studiem redukujících enzymů u *H. contortus*. Redukující enzymy u tohoto parazita si získaly zvláštní pozornost na možnou souvislost s rezistencí na fenbendazol, neboť rezistentní kmeny toto anthelmintikum metabolizují efektivněji než kmen citlivý. Z tohoto důvodu se studují nejen AKR, které jsou předmětem mé diplomové práce, ale také další rodiny reduktas, například reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem, protože zatím není zřejmé, které enzymy jsou za větší schopnost redukovat flubendazol zodpovědné. AKR jsou schopné metabolizovat nejen eobiotické látky ale také xenobiotika. Jde o NADPH-dependentní oxidoreduktasy, které jsou v různých hladinách exprimované v orgánech a tkáních, kde vykonávají katalytické aktivity. Během mé experimentální práce jsem zjišťovala a porovnávala exprese 22 genů AKR v různých vývojových stádiích. Také jsem porovnávala exprese u kmenů *H. contortus* s různou citlivostí na léky.

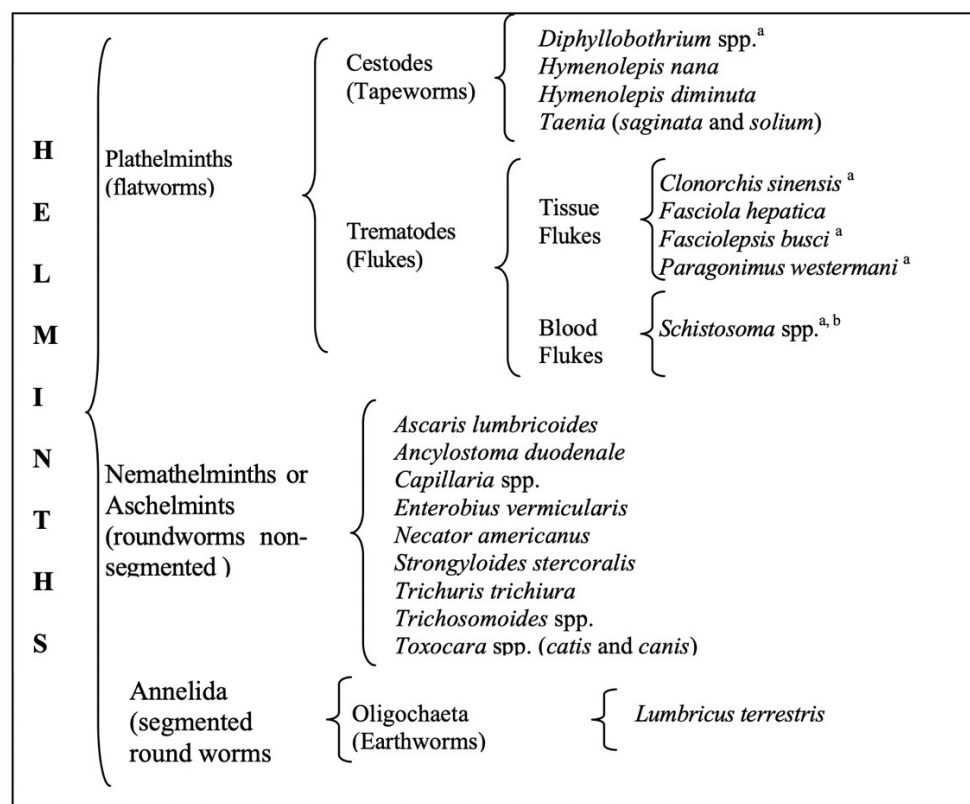
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Helmiti

Parazitičtí helminti neboli červi tvoří různorodou skupinu organismů, které infikují zejména člověka ale i domestikovaná zvířata po celém světě. Jsou to původci parazitárních nemocí nazývané helmintózy [1].

Společným znakem helmintů je oboustranná souměrnost a různě utvářený kožněsvalový vak. Helminti dorůstají velikosti od 1 mm do několika metrů. Jsou to relativně velké mnohobuněčné organismy, které způsobují poškození tkáně. Díky společné evoluci helmintů a hostitelů se helminti naučili produkovat řadu různých, vysoce specializovaných molekul, které mění mikroprostředí kolem sebe, mění hustotu tkáně nebo jsou schopni ovlivňovat imunitní buňky [2, 3, 4, 5].

Rozděluje je do tří taxonomických skupin: *Plathelminthes* – ploštěnci, *Nemathelminthes* – oblovci a *Annelida* – kroužkovci [3].



Obrázek 1 - obecná klasifikace helmintů [3]

Parazitě, kteří nejvíce infikují člověka, jsou první dvě zmíněné skupiny. Podle údajů organizace WHO patří do významných lidských parazitů, protože se jimi nakazilo více než 25 % světové populace [6]. Helminti výrazně obírají hostitele o živiny, vitamíny a další významné látky. Produkují toxiny metabolismu, které působí toxicky na orgánové soustavy hostitele. Jejich různá stadia jsou schopná vyvolávat imunitní reakci v hostitelském organismu. Helmit je schopen silně hostitele oslabit, tím je hostitel náchylnější k dalším onemocněním, což může vést až ke smrti. Parazitární nemoci jsou spíše chronického charakteru, tedy vleklá, dlouhotrvající onemocnění [4, 6].

Pro svůj vývoj využívá parazit jiný organismus buď jako konečného hostitele nebo mezihostitele. Cílem každého parazita je neusmrtit svého hostitele. Jeho hlavním úkolem je nalézt rovnováhu mezi ním a hostitelem, využívat ho pro svou reprodukci a zachování svého druhu [6].

Helminti se řadí do endoparazitů, což znamená, že žijí uvnitř hostitele. Dle orgánové nebo systémové lokalizace jsou parazitě [6]:

1. střevní – objevují se v gastrointestinálním traktu výhradně v tenkém a tlustém střevě. Vyskytují se ve vnitřním prostoru střeva, střevních kryptách a jsou schopni se zanořit do střevní sliznice. Střevo poškozují především mechanicky [4, 6].
2. krevní – objevují se v krevním řečišti (larvy filárií) nebo bývají permanentně přichyceni na stěně cév (motolice krevnička močová). Ovlivňují i složení krve například pokles hemoglobinu a tím způsobená anémie [4, 6].
3. tkáňoví – objevují se ve vnitřních orgánech (motolice jaterní) [6].

Helminti mají i dobrou biologickou adaptaci důsledkem střídání vnějších podmínek a podmínek uvnitř hostitele. Nejvíce se musí umět přizpůsobit červi se složitým vývojovým cyklem. Adaptace je trojího typu: progresivní, regresivní a úniková [6].

Progresivní adaptace dává parazitovi možnost proniknout do těla hostitele a udržet se v něm. Řadí se sem penetrační žlázy larválních stádií, trny, přísavky, zuby, zubní destičky atd. Zajímavostí je, že se sem řadí i pohyb článků u tasemnice [6].

Do **regresivní adaptace** se zařazují různé morfologické změny, které helminti využívají pro zjednodušení svého života. Například u nich došlo ke zjednodušení trávicího traktu pro čerpání živin z hostitele. Druhá zajímavost je například oční skvrna u larev motolic [6].

Úniková adaptace neboli také anti-imunitní je velmi důležitým typem adaptace. Ochraňuje parazita před vlivem obranných látek hostitele, tlumí zánětlivé procesy a moduluje imunitní reakce. Mnoho z nich je schopno tlumit imunitní systém hostitele a tím si vytvořit vhodné podmínky pro své přežití [6].

Vztah mezi parazitem a hostitelem se vyvíjel celou řadu staletí a jde tedy o složitý a komplexní biologický jev. Ovšem je ale důležité, aby hostitel byl přirozeně, a i druhově odolný. To samozřejmě může ovlivnit hygienická a výživová situace. Může k tomu přispět i podnebí, které vede k rozvoji a přenosu parazitárních nemocí. Jsou to zejména rozvojové země, které se nachází ve vlhkém a teplém pásmu [6].

2.1.1 Nematoda

Nematoda neboli hlístice se řadí mezi helminty podkmen *Nemathelminthes* neboli oblé hlísty z angličtiny roundworms. Jde o nejpočetnější, nejrozšířenější a nejrozmanitější skupinu živočichů, která cizopasí jak na obratlovcích, tak na rostlinách a bezobratlých. Většina druhů se zdržuje volně v půdě a ve vodě. Nejhojnější skupinou jsou parazitické hlístice. Do nich se řadí velké množství lidských cizopasníků např. filárie. U hospodářských zvířat takovéto druhy způsobují těžká onemocnění. Do nich se řadí např. plicnivky [7, 8, 9].

Tělo hlístic bývá protáhlé, vřetenovité, nit'ovité, válcovité, vzácně i jiného tvaru. Je nesegmentované a pokryté odolnou mnohvrstevnou kutikulou s povrchovými kutikulárními útvary, což mohou být hluboké zářezy připomínající článkování. Jedinci dorůstají do velikosti 0,3 mm až 8,5 m. Pro zajímavost je dosud největším druhem tkáňová hlístice *Placentonema gigantissima*, která cizopasí v placentách vorvaňů. Vrstvy kutikuly jsou vylučovány z hypodermis. Kutikula má vedle ochranné funkce také funkci vnějšího skeletu. Působí proti tlaku tělních tekutin a je pružná a pevná, tím udržuje tvar celého těla. Mimo jiné obsahuje řadu důležitých látek, tj. keratin, kolagen, glykoproteiny atd. Barva těla bývá bělavá, nažloutlá, až červená, neboť se některé druhy živí krví svých konečných hostitelů. Pod kutikulou a hypodermis se nachází podélná svalovina. Tělní

dutinu vyplňuje schizocel, kterým se udržuje osmotický tlak, a utváří se tak podmínky pro látkovou výměnu [7, 8, 9, 10].

Tělo hlístic je tvořeno ze tří částí. Přední část neboli hlavová se skládá z úst, pysků a jícnu a také receptorů, které pomáhají s orientací v prostředí. Ve střední části se nachází orgány trávicí soustavy a pohlavní orgány. V zadní části pak vyúsťuje střevo a pohlavní orgán. Všechny soustavy jsou velmi dobře vyvinuty [7, 8].

Nejvýznamnějším článkem nervové soustavy je nervový prstenec. Ten se nachází v přední části těla, obepíná jícn a spojuje nervová ganglia. V hlavové části a na kutikule se nachází žlázy a to: amfidy, deiridy a fazmidy. Amfidy jsou na ústních papilách a slouží také k hmatu. Deiridy jsou šíjové papily situované pod hlavovým koncem, někdy na úrovni nervového prstence. Fazmidy jsou kožní žlázy, které na povrch vyúsťují póry. Jejich přítomnost následně rozděluje hlístice na ty, co je mají *Phasmida* a ty, co je nemají *Aphasmida* [7, 8].

Trávicí soustavu tvoří různě modifikovaný ústní jícn a u některých druhů střevo vyúsťující análním otvorem. Ústa se skládají z ústní kapsuly, papil, kde jsou často zuby nebo různé výrůstky. Jícn bývá svalnatý. Základem vylučovací soustavy jsou exkreční žlázy neboli renety [8].

Hlístice jsou odděleného pohlaví – gonochoristé. Samčí pohlavní soustava má jedno nepárové varle. Samičí soustava se skládá ze 2 vaječníků. Většina hlístic je vejcoživorodá tzn. že se již v děloze z vajíček líhne larva prvního stádia. Odolnost larev je dána dle fáze cyklu [7, 8, 9, 10].

Vývoj hlístic je velmi různorodý. Některé se vyvíjejí jednoduchými cykly, jiné zase složitými vývoji. Dále se můžeme setkávat i s alternativními vývoji, včetně střídání sexuální generace s generací partenogenetických samic. Dle jejich životních cyklů je dělíme na geohelminy a biohelminy [8].

Geohelmini jsou hlístice s přímým vývojem. Takováto hlístice nepotřebuje k dokončení svého vývoje mezihostitele. Z vajíčka se zaprvé buď vylíhne larva, která prodělá dvě svlékání a následně dosáhne larvy třetího stádia tedy larvy invazivní, nebo zadruhé se larva svléká přímo ve vajíčku. Koncový hostitel je nakažen perorálně nebo perkutánně. Při perorální nákaze hostitel pozře larvu v již kontaminované potravě,

u perkutánní nákazy se invazivní larvy dostávají do těla kůži a následně do krevního oběhu, kterým jsou zaneseny do místa lokalizace. U geohelmintů jsou důležití také parateničtí hostitelé. Ty jsou zdrojem nákazy koncového hostitele. Rychlost vývoje hlístic je dána fyzikálními faktory tedy teplotou nebo vlhkostí půdy [7, 8].

Na druhou stranu **biohelminti** vyžadují pro svůj vývoj alespoň jednoho mezihostitele. Jde tedy o vývoj nepřímý. Právě v mezihostitelích dochází k vývoji invazivní larvy, která následně nakazí definitivního hostitele. Ten se nakazí požitím již nakaženého mezihostitele. Výběr mezihostitelů je velmi pestrý. Jsou to různé druhy červů, bezobratlých (kroužkovci), ale např. škrkavky se mohou vyvíjet přes obratlovce [7, 8].

2.2 *Haemonchus spp.*

Rod *Haemonchus spp.* byl poprvé popsán německým zoologem Karlem Asmundem Rudolphim v roce 1803 [11]. S rodem *Teladorsagia spp.* patří mezi nejvíce patogenní hlísty, kteří cizopasí převážně na malých přežvýkavcích. Rod zahrnuje nejméně 12 druhů hlístů. Nejrozšířenějšími druhy jsou *Haemonchus contortus* (popsán níže) a *H. placei*. Rozdílem je, že první hlístice infikuje malé přežvýkavce, na rozdíl od toho druhá infikuje velké přežvýkavce. Mezi méně časté druhy se řadí *H. similis* nebo *H. longistipes*, která byla objevena v tělech velbloudů [11].

2.2.1 Vlasovka slezová

Vlasovka slezová, v některé literatuře nazývána i jako slezovka zhoubná, latinským názvem *Haemonchus contortus*, v práci dále uváděna jako *H. contortus*, je jedním z nejvýznamnějších a velmi nebezpečných parazitů, který infikuje malá hospodářská zvířata na celém světě. Jedná se o hlístici, která působí infekci ve zvířecím hostiteli a tím dochází až k miliardovým ekonomickým ztrátám pro chovatelský průmysl ve světě. *H. contortus* řadíme do kmene *Nematoda*, třídy *Secernentea*, řádu *Strongylia*, čeledi *Trichostrongylidae*, rodu *Haemonchus spp.* [7, 12, 13].

Jde o krev sajícího cca 16–29 mm dlouhého červa narůžovělé barvy, který se živí krví z kapilár. Parazituje hlavně na mladých hospodářských zvířatech, zejména skotu, ovcích a kozách. Žije ve slezu a nejčastěji ji najdeme přisátou na žaludeční sliznici. Na jeden kus dobytka jich vyjde několik tisíc a slez jimi bývá vyplněn celý [12, 13].

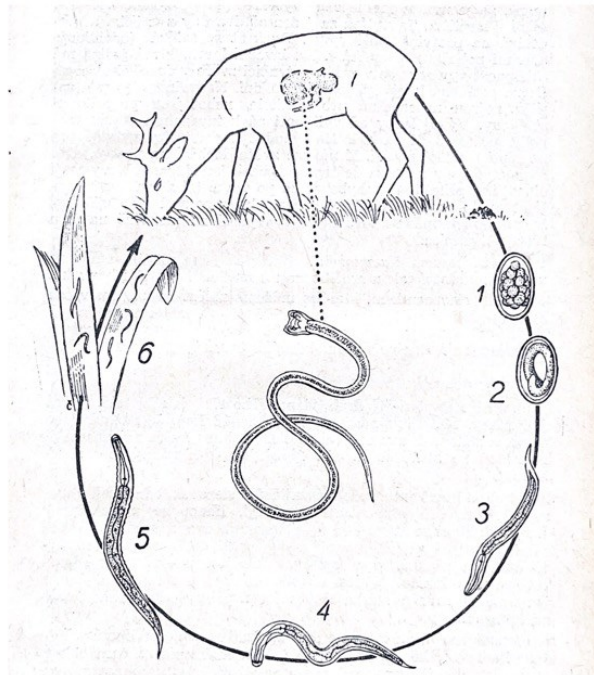
Tento druh hlístice se vyvinul v subsaharské Africe u volně žijících kopytníků. Poté byl díky migraci dobytka rozšířen na všechny kontinenty. Během let se adaptoval na širokou škálu klimatu a různých druhů hostitelských zvířat. Globální oteplování způsobilo jeho šíření do mírných oblastí např. do severní Evropy. Teplota, srážky a vlhkost jsou faktory, které ovlivňují jeho parazitární vývoj. Pro vývoj larev jsou příznivé teploty tropického a subtropického pásu s relativní 100 % vlhkostí. Období dešťů podporuje růst vegetace, což vede nejen ke kontaminaci pastvin larvami, ale také příležitost pro setkání se se svým hostitelem. Sucho z nedostatku srážek je naopak pro larvy a vajíčka až smrtelné. *H. contortus* má jedinečnou vlastnost. Při nepříznivých teplotách vstupuje parazit do tzv. fáze zastaveného vývoje neboli hypobiózy, která nastává při nástupu chladných zimních nebo naopak za velmi suchých podmínek [14, 15, 16].

H. contortus je velmi plodný parazit s různými strategiemi, jak uniknout nepříznivým klimatickým podmínkám a imunitním reakcím hostitele. Největší příčinou jeho patogenity je produkce vajíček a sání krve. Samička *H. contortus* denně vyprodukuje 5 000 – 15 000 vajíček. To umožňuje rychlejší kontaminaci pastvin a daleko lepší přežívání v hostitelích za pomoci častých opakovaných zamoření. Literatura uvádí, že dospělci sající krev mohou odstranit až 3 litry krve denně, což u hostitele rychle způsobuje anémii, pohublost, průjem až smrt. Právě anémie je způsobena nejen kvůli tomu, že parazit spotřebovává krev hostitele, ale také krvácením poté, co se parazit oddělí od místa, kde byl přisát a způsobí tzv. hemoragickou lézi. Žaludeční sliznice je tedy neustále drážděna a poraňována. Dále mohou zvířata vykazovat eosinofilii a hypoproteinemii, což má za následek bledost sliznic a submandibulární edém tzv. čelist z láhve. *H. contortus* je schopna produkovat hemolytický faktor, který způsobuje výrazné morfologické změny na povrchu erytrocytů [11, 13, 15, 16, 17].

2.2.1.1 Životní cyklus

Co se týče životního cyklu vlasovky slezové její vývoj je přímý dvoufázový. To znamená, že larvy nepotřebují mezihostitele. Jedná se o geohelmintha. Samičky nakladou do střev a žaludku vajíčka, která vyjdou ven společně s trusem. Vajíčka poté zrají na vzduchu. Uvnitř obalu se začne tvořit zárodek, který se následně změní v larvu. Ta vyleze z vajíčka a svůj další vývoj prodělává na pastvinách. Larva se dvakrát svléká a poté se z ní stává invazivní larva, která je jako jediná schopná se změnit v dospělého v trávicím

traktu hostitele. To celé trvá 3 až 11 dní. Nevyvinuté larvy a vajíčka nejsou pro hostitele nijak nebezpečné a jsou stráveny a vyloučeny z těla ven. K nákaze dochází hlavně, pokud je venku rosa, vlhko nebo déšť, protože invazivní larvy mají možnost pohybovat se vzhůru po trávě a do okolí trusu. Bylo zjištěno, že v létě takováto invazivní larva vydrží na pastvě až 3 měsíce [8, 11, 12].



Obrázek 2 - Vývojový cyklus vlasovky slezové: 1 vajíčko; 2 vajíčko s larvou; 3 larva prvního stádia; 4 larva druhého stádia; 5 larva třetího stádia; 6 invazivní larva na trávě [12]

2.3 Helmintické infekce

Parazitické infekce se šíří a sužují lidstvo již po staletí. Mezi nejběžnější patří helmintické infekce tedy infekce způsobené červy, které nejčastěji probíhají v gastrointestinálním traktu, ale mohou se rozšířit i do tkání a orgánů. Po malárii se řadí mezi jedny z nejnebezpečnějších onemocnění světa. Pomocí migrace lidí jsou do různých částí světa zavlečeny i odolnější druhy helmintů [6, 18, 19].

Helmintické infekce patří mezi nejrozšířenější infekční agens. Dnes postihují především země s nízkými příjmy a omezenými zdroji. Řeč je tu zejména o zemích tropického a subtropického pásu Afriky a Ameriky. Nemocnost lidí v těchto zemích souvisí s chudobou, a to přispívá ke snížení zemědělské a ekonomické činnosti. Má to tedy vliv na kognitivní a socioekonomický rozvoj daného státu. Helmintické infekce se dělí na geopolitní rozšířené ve všech pásmech jako je roup dětský, a dále na tropické mající teplejší a vlhčí klima vhodné pro mezihostitele. Aby došlo k odstranění helmintických infekcí muselo dojít ke zlepšení podmínek prostředí, zvýšené hygieně, přístupu k čisté a pitné vodě, lepšímu bydlení a udržitelnému socioekonomickému rozvoji. Bohužel v zemích třetího světa takové podmínky není možné zcela zavést a udržet. V současnosti panuje mezi vědci shoda, že se helmintické infekce geograficky rozšiřují i do chladnějších klimatických podmínek severní polokoule. Riziko infekce zde bylo obvykle nízké ovšem to se změnilo kvůli vzestupu globální teploty [6, 11, 19, 20].

Odhaduje se, že více než 1 miliarda lidí v rozvojových oblastech subsaharské Afriky, Asie a Ameriky je infikována jedním nebo více druhy helmintů. Jde o tzv. polyparazitismus, který je zde normou a infekce bývají trvalé. Je to výsledek společných rysů ekologických a environmentálních požadavků, cestováním, expozicí a citlivostí hostitele. Polyparazitismus má větší dopad na morbiditu než nakažení jedním druhem parazita. Také může zvýšit náchylnost k dalším infekcím jako je malárie. Helmintické infekce mají silné imunomodulační účinky na hostitelské buňky. Mohou vyvolat závažnou hypersenzitivní reakci, která vede k chronickým alergickým reakcím [19, 20].

2.3.1 Přenos

Helminti napadají člověka a zvířata zejména orálně-alimentární cestou tedy pozřením vajíček ústy. Další možností přenosu je přímý kontakt nebo kontaminovaná potrava a voda – pozřením nečisté pitné vody nebo nedostatečně tepelně upraveného masa z infikovaných zvířat. Dále mohou larvy prostupovat perkutánní cestou, kdy se dostávají do těla kůží přes ranky. Jako poslední je přenos hematofágním hmyzem pomocí bodnutí. Zvláštní formou přenosu je tzv. geofagie, což znamená konzumace zeminy. Tento jev je zejména u dětí [6, 19].

2.3.2 Klinické příznaky

Klinické příznaky infekcí způsobených helminty jsou závislé na jejich druhu, intenzitě dané infekce a samotném věku hostitele. U lidí a zvířat způsobují helmintické infekce především anémii, eosinofilii, pneumonii a prevalenci podvýživy. Pokud se podíváme na nejzávažnější příznaky podle druhů helmintů např. tasemnice mohou způsobovat neurocysticercózu, která vede k tvorbě hromadných lézí na mozku. Některé druhy krevniček tvoří v těle hostitele granulomy, záněty sleziny a jater. Určité druhy helmintů jsou schopné způsobit život ohrožující anafylaxi v případě, že se z cyst uvolní antigen. U dětí nalézáme především infekce střevními červy. Ty mohou v nejzávažnějších případech způsobit retardaci růstu, sníženou fyzickou zdatnost nebo poruchu paměti [19].

2.3.3 Patogeneze

Helminti způsobují dvojí poškození – přímé a nepřímé. U přímého poškození dochází k blokádam vnitřních orgánů nebo účinkům tlaku vyvíjeného rostoucími parazity. Například u tasemnic se střevo fyzicky zablokuje jejich velkým množstvím, tím dojde k tvorbě granulomů a následně k zablokování průtoku krve játry z důvodu tvorby cyst. To způsobí v těle patologické změny. Cysty mohou vznikat v plicích, mozku a jiných částech těla, dochází k orgánovým metastázím a nekróze. Nepřímé poškození je způsobeno reakcemi hostitele. Jako příklad lze uvést infekci u *Schistosomi mansoni*. Vlivem krevničky střevní na lidský organismus dojde ke vzniku granulomu na základě přecitlivělosti, to způsobuje blokádu jaterních sinusoid a k zabránění průtoku krve. Dochází také k zánětlivým změnám na základě hypersenzitivity [19].

2.3.4 Diagnostika

U obyvatel našeho státu je velmi oblíbené cestovat za teplem do zemí tropického a subtropického pásma, proto je důležitou součástí každého klinického vyšetření zjistit cestovní anamnézu. Jde zejména o to, že někteří parazité mají dlouhou dobu života a jejich účinky se projevují až po měsících i rocích. Někteří helminti mají prepatentní periodu. To je doba, která uplyne od vstupu infekčního organismu do hostitele do prvních příznaků infekce, proto nemůžeme u infekcí rozvíjejících se delší dobu očekávat, že se projeví pár dní po infikování organismu. Proto by se měla stolice odebírat postupně v určitých časových intervalech, aby se parazit mohl identifikovat [6, 19].

Dále se využívají sérologické testy, kdy se využívají parazit-specifické protilátky ve vzorcích patientského séra. Antigenní testy pomáhají detekovat biomarker parazita. Hojně se využívá i molekulární diagnostika, kde se detekuje nukleová kyselina (NK) helminta a je schopna ho detekovat na úrovni jeho druhu a rodu. Nejčastěji se používala metoda Southern blotting a repetitivní DNA hybridizační sondy v kombinaci se Southern bloty. Měly ale nízkou senzitivitu a specifitu, což vedlo k jejich nahrazení technikami polymerasové řetězové reakce (PCR). Nejprve se využívala konvenční PCR, kdy k identifikaci *H. contortus* sloužilo několik genů např. interní transkribované spacery (ITS). Tu nakonec nahradila Real-time PCR, která má za cíl kvantifikovat transkripci cílového genu a proměřit parazitární zátěž. Nově byla vyvinuta také kapková digitální PCR (ddPCR), která překonala všechna omezení u konvenční PCR. Je vhodnou volbou pro detekci a absolutní kvantifikaci hlavních rodů helmintů. Může být jako doplňková metoda ke konvenční metodě počítání vajíček [6, 11, 19, 21].

2.3.5 Léčba

K léčbě helmintických infekcí se využívají léky zvané anthelmintika. Působí jak na ploché (motolice, tasemnice) tak na kulaté červy (háďátka). Jejich význam je obrovský pro humánní tropickou medicínu, i pro veterinární medicínu. Anthelmintika působí buď lokálně nebo systémově. Lokální způsobují vypuzení červa z gastrointestinálního traktu. Systémové se snaží usmrtit dospělce i jeho další vývojové formy z tkání a orgánů. Anthelmintika pracují na principu paralýzy samotného červa nebo poškozují jeho kutikulu. Některé léky jsou schopné zasahovat i do jeho metabolismu. Protože se metabolické požadavky u jednotlivých druhů liší, dá se říct, že to jsou vysoce účinné léky, které působí pouze na jeden konkrétní druh helminta. Při výběru vhodného léku je důležité udržovat rovnováhu mezi nutností léčby a prevencí. Existuje velká řada anthelmintických léků, které jsou dostupné pro parazity živící se krví. Při onemocnění se může podávat i jejich kombinace. Mezi nejpoužívanější léky se používají např. benzimidazoly, což jsou první širokospektrální anthelmintika, která jsou vysoce účinná proti širokému spektru parazitů přežvýkavců a jejich parazitických stádiích. V posledních letech ale účinnost anthelmintik výrazně klesá a kontrola infekcí je ohrožena lékovou rezistencí. Aby se oddálilo selhání léčby je v dnešní době kladen důraz spíše na kontrolu anthelmintických rezistencí. Dostupnost nové anthelmintické terapie bude zásadní. Proto se již teď zavádí různé přístupy např. syntéza nových chemických entit, kde se hledají léky s novým mechanismem účinku [19, 20, 21, 22, 23].

Dnešní doba se přiklání k užívání zejména rostlinných léků. Většina syntetických anthelmintických léků má mnoho vedlejších účinků jako jsou bolesti břicha, ztráta chuti k jídlu, nevolnost, zvracení atd. Z těchto léků je nejlépe tolerovaný lék mebendazol. I zde se ale může při dlouhodobém užívání objevit bolest hlavy, horečka nebo neutropénie. Protože v dnešní době chceme eliminovat co nejvíce škodlivých účinků, přikláníme se k tvorbě anthelmintických léků z rostlin, které vedou k menším vedlejším účinkům. Mezi fyto-složky, které vykazují anthelmintické účinky, patří saponiny, alkaloidy, polyfenoly, třísloviny aj.. Alkaloidy jsou schopné potlačit přenos sacharosy ze žaludku do tenkého střeva, snižují podporu tvorby glukosy, působí na centrální nervovou soustavu a způsobují paralýzu helminta. V rozvojových zemích se léčba anthelmintiky stala převládajícím nástrojem pro kontrolu helmintických infekcí, buď jako cílená léčba nebo léčba mezi celými komunitami. Cílená se zaměřuje na konkrétní profesní nebo věkové skupiny [19, 20].

2.3.6 Rezistence na anthelmintika

Rezistence je schopnost organismu přežít dávku léku, která by normálně zabila organismy stejného druhu a stádia. *H. contortus* je nejvíce studovanou hlísticí s ohledem na odolnost vůči anthelmintikům. Prokázala totiž schopnost si vyvinout rezistenci vůči hlavním skupinám léků. Na počátku 21. století byly objeveny i populace, které vykazovaly multirezistenci, tedy rezistenci vůči třem nebo více skupinám anthelmintických léků. *H. contortus* si vytvořila rezistenci i k nově zavedené skupině léků aminoacetonitrilovým derivátům konkrétně monepantelu [24].

2.3.6.1 Odolnost vůči benzimidazolům

Benzimidazoly byly jako první podrobeny studování mechanismu rezistence u *H. contortus*. První přímá souvislost mezi interakcí b-tubulinu, cílového místa pro benzimidazolové léky a vývojem lékové rezistence u *H. contortus* byla popsána roku 1986 Laceyem a Prichardem [25]. Mutace, které byly spojeny s rezistencí na benzimidazoly byly nalezeny právě v b-tubulinu, konkrétně polymorfismus v kodonu 167 genu kódujícího izotyp 1 b-tubulinu. Další mutace vedoucí k rezistenci mohou být na kodonu 200 vedoucí k substituci fenylalaninu za tyrosin nebo na kodonu 198 vedoucí k substituci alaninu na kyselinu glutamovou [11, 24, 25].

2.3.6.2 Rezistence na imidazothiazoly

Levamisol se váže na nikotinové acetylcholinové receptory *H. contortus*. Vývoj rezistence je výsledkem mutací v genech kódujících právě tyto receptory. Proto jsou u rezistentních *H. contortus* tyto mutované geny detekovány [11, 24].

2.3.6.3 Odolnost vůči Closantelu

Closantel patří do skupiny účinných léků proti parazitům, kteří se živí pouze krví. Tím, že jde o úzké spektrum anthelmintik nebyl dosud až tak prozkoumán jako jiné skupiny. V několika zemích se objevila u zvířat rezistence vůči tomuto léku, proto začali vědci okrajově studovat jejich metabolismus. Zjistili, že se lék kumuloval v organismu rezistentních *H. contortus* méně než u citlivých kmenů [11, 24].

2.3.6.4 Odolnost vůči derivátům aminoacetonitrilu

Již před uvedením prvního léku monepantelu na trh byly provedeny studie možných mechanismů rezistence. Rezistentní linie vykazovaly mutace v genu Hco-mptl-1. Byly zde identifikovány mutace se ztrátou funkce jako je delece, která vede k chybnému střihu, dále inserce a bodové mutace, které vedou k předčasnému ukončení translace proteinu [11, 24].

2.3.6.5 Mnohočetná léková rezistence

Postupem času si helminti vyvinuli rezistenci k různým druhům anthelmintik. Tato skutečnost představuje velkou výzvu pro kontrolu helmintických infekcí. Mnohočetná léková rezistence je definována jako rezistence na tři a více tříd anthelmintik. Multirezistence *H. contortus* byly zaznamenány v mnoha zemích, Africe, Asii, nebo Americe. Kvůli multirezistencím by se měly plánovat a řídit antiparazitické kontrolní strategie [11].

2.3.7 Farmaceutická kontrola

Kvůli rozsáhlému rozvoji anthelmintické rezistence u *H. contortus* se klade zvláštní důraz na kontrolu a prevenci pomocí cílené léčby. Jde o přístup, který se snaží udržet kolonie *Haemonchus* v refugiích, aby zůstala zachována jejich citlivost na léky. Refugia je část parazitické populace, která není vystavena anthelmintickým lékům. To znamená, že jedinci žijí buď volně na pastvinách nebo v hostiteli, který ale zatím nebyl vystaven anthelmintické léčbě. Cílená anthelmintická léčba je ovcím nebo kozám podávána ve

specifických časových intervalech, aby se co nejvíce parazitické populace udržela právě ve zmíněných refugiích [11, 21].

2.3.8 Nechemická kontrola

Jako nechemická kontrola se využívá management pastvy, úprava stravy zvířat (nutriční management), která ovlivňuje imunitní systém zvířat, dále výběr zvířat geneticky odolných proti *H. contortus* a podávání různých podpůrných produktů. Řízení pastvy minimalizuje příjem infekčních larev vnímavými ovcemi a omezuje nadměrnou kontaminaci pastvin nakaženými vajíčky. Bylo zjištěno, že zvířata v dobrém nutričním stavu lépe odolávají parazitickým infekcím. Pomocí mnoha rostlin, která obsahují bioaktivní sloučeniny, jsou zvířata schopná také bojovat proti parazitickým infekcím. Patří tam např. taniny, které se vyznačují antiparazitickými vlastnostmi. Ty mohou zlepšovat imunitní systém zvířat nebo přímo působit na daného parazita v různých stádiích [11, 21].

2.3.9 Hemonchóza

Jedná se o parazitární onemocnění způsobené primárně druhem hlístice *H. contortus*. Účinná prevence je nezbytná pro jejich udržitelný chov v endemických oblastech, kde se parazit nachází. Výskyt epidemiologie hemonchózy je sezónní. Vysoký biotický potenciál *H. contortus* vede k rychlému nárůstu parazitické populace a propuknutí infekce takřka bez varování. I přes potenciálně závažnost onemocnění lze naneštěstí pomocí laboratorních postupů snadno hemonchózu diagnostikovat [21].

Nejcharakterističtější příznaky pro hemonchózu se týkají výhradně krvesavé činnosti larválních stádií nebo dospělců. Jak již bylo zmíněno ty zahrnují úmrtí, anémii, sníženou toleranci zátěže ale také subkutánní otok. Dle stupně infekce a imunitní odpovědi je možné hemonchózu rozdělit na tři skupiny: hyperakutní, akutní a dlouhodobou [11, 21].

Hyperakutní forma je nejzávažnější ze všech tří skupin. Dochází při ní k velmi vysoké infekční zátěži, která čítá cca 30 000 dospělých parazitů v těle hostitele. Zvířata bývají nejčastěji nalezena mrtvá, u přeživších jsou známky těžké anémie [11, 21].

Akutní forma je nejčastější formou hemonchózy, s různou rychlostí nástupu a úmrtnosti. Anémie se zde projevuje bledostí sliznic, nejčastěji je patrná na spojivkách, které se mění od normální červenorůžové až po extrémně bílou. V důsledku ztráty krve

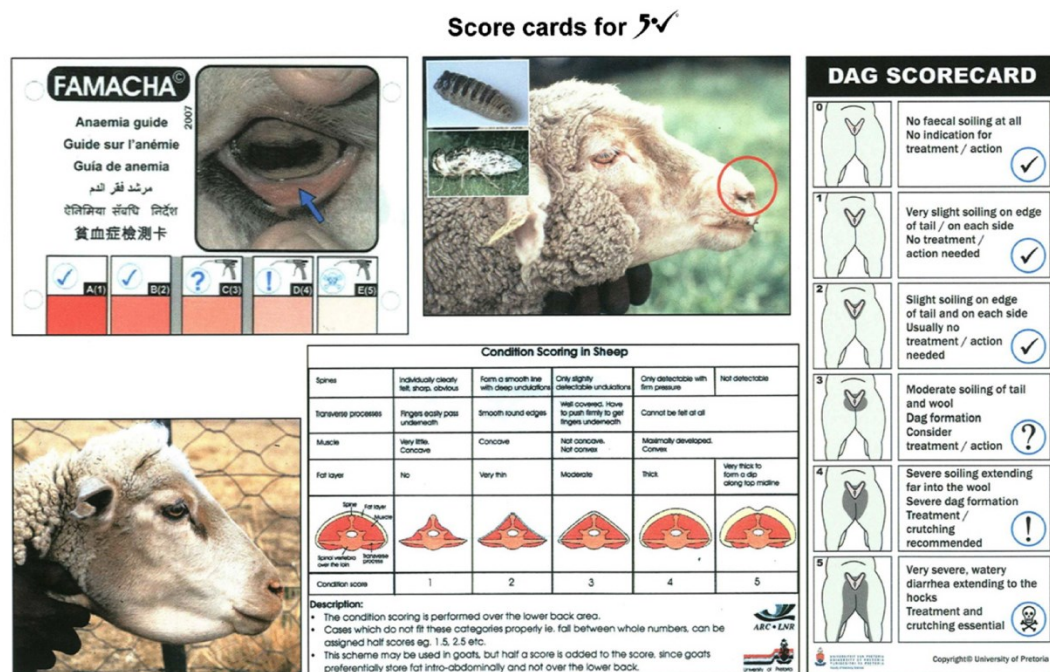
zvířata postupně slábnou a jsou méně pohyblivá. Dochází ke snížení produkce mléka, vlny, průměrného denního přírůstku zvířat. Pokud nedojde k aplikaci anthelmintik dochází k hypoproteinémii a objevuje se podkožní edém [11, 21].

Dlouhodobá forma je také nazývána jako chronická forma hemonchózy. Hostitel je napaden menším množstvím parazitů a může být často nerozpoznán. Jde o výsledek neúspěšné anthelmintické léčby. Příznaky jsou podobné jako u syndromu podvýživy tedy snížení produkce masa anebo mléka [11, 21].

Diagnózu hemonchózy lze určit pomocí parazitologických laboratorních testů. Testy lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. U kvantitativních testů se detekují a počítají parazitická vajíčka ve stolici. Počet vajíček je spojen s parazitickou zátěží v hostiteli. Rozměry vajíček u *H. contortus* jsou 70 až 85 μm . Jejich morfologické znaky nejsou ale rodově specifické, proto je jejich identifikace velmi obtížná. Lze je ale rozlišit např. pomocí filaroidního jícnu, délky ocasu nebo přítomnosti 16 střevních buněk. Navzdory obtížnosti identifikace vajíček lze velmi dobře identifikovat larvy L_3 v tzv. kopro kulturách. Jako doplňkové vyšetření se využívá hematologické vyšetření anémie. Ta ukazuje na infekci. Akutní hemonchóza je nejčastěji spojena se snížením hematokritu nebo snížením koncentrace hemoglobinu [11, 21].

2.3.10 Systém FAMACHA

Systém **FAMACHA** neboli **F**affa **M**alan **C**hart byl vyvinut v Jižní Africe a jde o odlišný přístup v diagnostice hemonchózy. Jde o jednoduchý a rychlý diagnostický indikátor anémie. Principem je zhodnocení barvy spojivkových membrán. Zvířata se znehybní a jejich oči jsou vyšetřovány a hodnoceny pomocí standardizovaného souboru pěti barev v rozsahu od červenorůžové (normální) po bílou (terminální stádium anémie). Systém je přesný v oblastech s tropickými nebo subtropickými klimatickými podmínkami [11, 21, 26].



Obrázek 3 - karty sloužící ke kontrole pěti částí těla ovce tzv. Five Point Check [26]

2.4 Metabolismus xenobiotik

Pod pojmem metabolismus si představíme obecně všechny chemické reakce v buňce. Některé reakce se vyskytují spontánně, ale většina z nich vyžaduje zapojení příslušných enzymů. Reakce se dělí na katabolické a anabolické. Při katabolismu se molekuly rozkládají, při anabolismu se naopak syntetizují [27].

Do organismu neustále vstupují různé látky z okolí. Pokud jde o látky s fyziologickým významem, které jsou velkým zdrojem energie, jako jsou živiny, voda, minerály, jsou nazývány eobiotika. Opakem těchto látek jsou xenobiotika. Tady jde o látky, které se v těle přirozeně nevyskytují nebo se vyskytují ve výrazně nízké koncentraci. Látky nemají pro tělo žádný fyziologický význam, tedy neslouží jako zdroj energie nebo jako stavební kameny pro endogenní látky aj. Xenobiotika jsou jak přírodního, tak syntetického původu. Přírodní cizorodé látky se vyskytují v potravě jako rostlinná barviva nebo aromatické látky. Látky syntetického původu zahrnují léčiva nebo kosmetické přípravky. Řadíme sem také jedy a průmyslové chemikálie. Jde o hydrofilní, lipofilní a ionizovatelné látky. Do těla se xenobiotika dostávají přes gastrointestinální trakt, dýchací systém nebo kůži. Cizorodé látky se následně dostávají do krevního oběhu a na

základě jejich fyzikálně-chemických vlastností se distribuují dále v organismu. Pomocí biotransformačních enzymů se z xenobiotik stávají sloučeniny s jinými chemickými strukturami tzv. metabolity. Vylučují se z těla ven nejčastěji močí nebo stolicí ale také mateřským mlékem, potem nebo dechem [27, 28].

Mezi xenobiotiky existuje malá, ale významná podskupina látek, které jsou pro tělo vlastní. Například histamin ve včelím bodnutí je stejný jako histamin, který produkuje tělo po tom, co člověka bodne včela. Nebo předávkování železem je jako častý jev otravy, ale pokud je železo přijímáno jako základní živina není bráno jako xenobiotikum [27].

Xenobiotika jsou v těle metabolizována 4 různými způsoby [27]:

1. vyřazením beze změny
2. nezměněnou retencí
3. spontánní chemickou přeměnou
4. enzymatickým metabolismem.

Hydrofilní a lipofilní sloučeniny jsou eliminovány v nezměněném stavu močí a stolicí. Anorganická xenobiotika mohou být ukládána do kostí (olovo, kadmium), některá organická xenobiotika se ukládají také v tuku. Spontánní chemická přeměna je u většiny xenobiotik relativně malá. U velkého množství xenobiotik převládá enzymatický metabolismus [27].

2.4.1 Fáze metabolismu xenobiotik

Xenobiotika jsou z těla eliminovány pomocí dvou někdy i tří fází. První fáze je konverze, při které dochází k reakcím oxidačním, redukčním a hydrolytickým. Enzym vnese nebo odkryje funkční skupinu ve struktuře. Pomocí této fáze vzniká z cizorodé látky metabolit. Při druhé fázi dochází k reakci endogenní sloučeniny s daným metabolitem. Při této fázi dochází k tzv. konjugaci. Další fází je transport xenobiotika a jeho metabolitů z těla ven [28].

Tabulka 1 - Reakce patřící do 1 a 2 fáze biotransformace [28]

1. FÁZE BIOTRANSFORMACE	2. FÁZE BIOTRANSFORMACE
oxidace	glukuronidace
redukce	sulfonace
hydrolyza	methylace
hydratace	acetylace
izomerace	konjugace s glutathionem
	konjugace s aminokyselinami

Typickými zástupci enzymů I. fáze jsou cytochromy P450. Cytochromy P450, zkráceně CYPs, jsou součástí nejdůležitější enzymové super rodiny, která je zodpovědná za metabolismus xenobiotik. Podílejí se na řadě metabolických a biosyntetických procesů. Tyto enzymy jsou lokalizovány zejména v membránách endoplazmatického retikula. Jejich hlavní úlohou je oxidativní metabolismus strukturně různorodých endogenních (steroidů, žlučových kyselin, mastných kyselin, eikosanoidů a vitamínů) a exogenních látek (léčiv a chemikálií). Známý počet CYPs enzymů přesahuje 1 000 [29, 30].

Na II. fázi biotransformace se podílejí zejména glutathion-S-transferasa a P-glykoprotein. Glutathion-S-transferázy (GST) patří do hojné rodiny dimerních proteinů, které jsou schopné konjugovat glutathion (GSH) s řadou sloučenin obsahující elektrofilní centra. GST jsou schopné v těle konjugovat širokou škálu látek od exogenních po endogenní. Mezi exogenní substráty pro konjugaci s GSH patří např. vedlejší produkty aktivity reaktivních forem kyslíku, mezi endogenní patří celá řada pesticidů, organofosfátových insekticidů, uhlovodíkových insekticidů nebo polycyklických aromatických uhlovodíků. Konjugace hraje také významnou roli při detoxikaci reaktivních metabolitů nebo při vývoji rezistence na chemoterapeutika. Konjugované produkty jsou následně metabolizovány na merkapturové kyseliny [27, 31].

P-glykoprotein (P-gp) je nejrozsáhleji studovaný transportér adenosintrifosfátu (ATP). Funguje jako buněčná bariéra na principu vytlačování daného léčiva nebo xenobiotika z buňky. Největší roli hraje při absorpci a likvidaci nepřírodní látky v těle. Protože je schopen vázat a přenášet širokou škálu strukturně nepříbuzných látek, z nich většina je hydrofobní, v některých studiích je nazýván jako „hydrofobní vysavač“ [32, 33].

2.4.2 Aldo-ketoreduktasy

Aldo-ketoreduktasy (AKR) patří do super rodiny alkohol dehydrogenas s dlouhým řetězcem. AKR jsou cytosolické, rozpustné proteiny vyznačující se trojrozměrnou strukturou o velikosti 34-37 kDa. Podílejí se na I. fázi biotransformace cizorodých látek. Jako kofaktor využívají nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH). Nacházejí se ve všech kmenech, a to u savců, obojživelníků, prvoků, rostlin nebo bakterií. Většina AKR jsou aktivní jako monomery, až na AKR2, AKR6 a AKR7, které se v organismech vyjadřují jako funkční multimery. Tyto enzymy mají širokou substrátovou specifitu. Jsou schopné přeměňovat aldehydy, ketony, monosacharidy, ketosteroidy, ketoprostaglandiny, prekurzory žlučových kyselin, chemické karcinogeny a jejich metabolity. Jejich hlavním úkolem je redukce aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Ač se AKR podílejí spíše na redukčních reakcích, jsou schopné katalyzovat i reakce oxidační [34, 35, 36].

Nomenklatura pro AKR byla zavedena a přijata roku 1997 organizací Hugo Genome Nomenclature Committee (HGNC). Doposud bylo identifikováno 15 rodin AKR o více než 150 proteinech, které jsou v dnešní době aktualizovány na webových stránkách <http://www.med.upenn.edu/akr/>. Samotná nomenklatura AKR je odvozena od nadrodiny CYPs. Enzymy patřící do nadrodiny jsou označeni příponou AKR značící „aldo-ketoreduktasu“. Arabská číslice představuje rodinu, do které daná AKR patří (shoda v méně než 40 % aminokyselinové identitě). Latinské písmeno prezentuje podrodinu, kde AKR sdílí až 60 % sekvenční identity. Jednotlivé enzymy dané podrodiny jsou číslovány dle chronologie, např. AKR1A1 patří do nadrodiny AKR, rodiny 1, podrodiny A a je prvním unikátním proteinem v dané podrodině. Nomenklatura má tu výhodu, že každému jednotlivému AKR přiřazuje jedinečný název tím, že stanoví podobnost jeho aminokyselinové sekvence s jinými rodinami a podrodinami [28, 35].

Systematický název	Triviální název/často používaný zkratky
AKR1A1	aldehyd reduktázy; ALR; ALDR1
AKR1B1	aldóza reduktáza; AR, ALR2
AKR1B10	aldóza reduktáza podobná tenkému střevu; ARL-1
AKR1C1	dihydrodioldehydrogenáza 1; 20a,(3a)-Hydroxysteroid dehydrogenáza
AKR1C2	dihydrodioldehydrogenáza 2; 3a-hydroxysteroid dehydrogenáza, typ III
AKR1C3	3a-Hydroxysteroid dehydrogenáza, typ II
AKR1C4	dihydrodioldehydrogenáza 4; chlordekonreduktáza; 3a-hydroxysteroid dehydrogenáza, typ I
AKR1D1	D4-3 -ketosteroid-5b-reduktáza
AKR1E2	Aldo-ketoreduktázová rodina 1, člen C-jako 2; AKR1CL2
AKR6A3	KCNAB 1; hKvbeta3; draslík napětově hradlovaný kanál, související s třepačkou podrodina, b-člen 1
AKR6A5	KCNAB 2; hKvbeta2; draslík napětově hradlovaný kanál, související s třepačkou podrodina, b-člen 2
AKR6A9	KCNAB 3; draslíková napětově řízená kanál, podrodina související se shakerem, b- člen 3
AKR7A2	aflatoxin aldehyd reduktáza; AFAR1
AKR7A3	aflatoxin aldehyd reduktáza; AFAR2

Obrázek 4 - Systematické a triviální názvy lidských AKR [35]

AKR katalyzují oxidačně-redukční reakce na řadě substrátů pomocí kofaktoru NADPH pomocí tzv. bi-bi kinetického mechanismu, ve kterém se kofaktor váže jako první, ale odchází jako poslední. Funguje zde jednoduchá acidobazická katalýza. Jako první se v celém mechanismu naváže kofaktor, ke kterému se přidá substrát. Ve směru redukce se z kofaktoru přenesou 4-pro-R hydrid na karbonylovou skupinu substrátu, následuje protonace karbonylového kyslíku tyrosinem, který zde funguje jako kyselina. Proces oxidace probíhá v obráceném směru, kdy zde tyrosin funguje jako zásada. U AKR se na katalýze podílí také konzervovaná katalytická tetráda již zmíněný Tyr-48, His-110, Lys-77 a Asp-43 [34, 35].

Každý enzym AKR je charakterizován stejným strukturním proteinovým záhybem, a to nejčastěji $(\beta/\alpha)_8$ barelem s inzercí několika helixů. Dále se na zadní straně AKR nachází tři velké smyčky, které definují specifičnost substrátu. AKR sdílejí také vysoce konzervované vazebné místo pro kofaktor. Struktura $(\beta/\alpha)_8$ barel proteinů poskytuje nadrodině AKR jedinečnou identitu. Charakteristickým rysem této struktury je přítomnost aktivního místa na C-konci, který udává již zmíněnou širší substrátovou specifitu. Ve struktuře $(\beta/\alpha)_8$ je centrální vnitřní prstenec paralelních β řetězců v hyperboloidním tvaru obalený vnějším obalem z α helixů. To vytváří vysoce symetrické uspořádání samotného AKR. Dalším motivem je triosa-fosfát isomerasový (TIM) barel, který se skládá z vlásenky dvou β řetězců, které tvoří dno struktury. Horní část struktury je přerušena řadou vnějších smyček a spirál, které se u každého AKR mění. Různé motivy, smyčky a extra helixy dodávají jednotlivým AKR rozmanitost [34, 36, 37].



Obrázek 5 - Krystalová struktura aldosareduktasy. Struktura byla stažena z Protein Data Bank.

Mnoho savčích AKR jsou v dnešní době potencionálními terapeutickými cíli a tvorba léčiv založených na jejich specifické struktuře vedou k přípravě sloučenin s požadovanou specifitou a účinností. Např. pomocí aldosareduktasy (ADR) dochází v těle k přeměně glukosy na sorbitol a hyperosmotický cukr. Tento fakt může hrát roli při diabetické retinopatii, neuropatii a nefropatii. Její inhibitory by se mohly jevit jako užitečné při léčbě komplikací u diabetes mellitus [34].

Vědci zatím identifikovali 15 AKR u člověka. Jsou to AKR1A1 (aldehydoreduktasa), AKR1B1, 1B10 a 1B15 (aldosareduktasy), AKR1C1, 1C2, 1C3 a 1C4 (hydroxysteroidhydrogenasy), AKR1D1 (Δ^4 -3-ketosteroid-5- β -reduktasa), AKR1E2 (testis-specifický protein), AKR6A3, 6A5 a 6A9 (Kv β proteiny), AKR7A2 a 7A3 (aflatoxinreduktasy) [28, 35].

2.4.2.1 AKR1A1 = aldehydoreduktasa

Důležitý enzym zapojující se do chemické přeměny kyseliny askorbové. Jedná se o enzym nalezený jako první. AKR1A1 je cytosolická, NADPH-dependentní, monomerní oxidoreduktasa. Tento enzym je nejvíce exprimován ve většině tkání, především v proximálních tubulech ledvin. AKR1A1 vykazuje širokou substrátovou aktivitu. V ledvinách se spojuje s myoinositolovou oxygenasou. Ta přeměňuje myoinositol na D-glukuronát. Tato přeměna poukazuje na úlohu AKR1A1 v dráze katabolismu myoinositolu [28, 37].

2.4.2.2 AKR1B1 (ADR) = aldoreduktasa

Jeden z nejvíce studovaných enzymů v souvislosti s jeho potenciální rolí při zprostředkování hyperglykemického poškození a při rozvoji sekundárních diabetických komplikací. Jedná se o širokospecifický katalyzátor. V porovnání s AKR1A1 má vyšší katalytickou účinnost. Redukuje mnoho fyziologických substrátů, jako jsou prekurzory konečného produktu glykosylace (AGE), isokortikosteroidy nebo oxidované fosfolipidy, ale i různé polutanty z životního prostředí. Zásadní roli hraje především v proliferaci buněk hladkého svalstva cév během aterosklerózy [37].

2.4.2.3 AKR1B10 = aldoreduktasa z tenkého střeva

AKR1B10 je nově objeveným enzymem. Nachází se především v tenkém střevě, dále i v tlustém střevě, játrech, brzlíku a nadledvinkách. Je specifický pro různé substráty a je citlivý k inhibitorům podobným aldoreduktase. AKR1B10 má až 100x vyšší katalytickou aktivitu, kterou vykazuje k některým druhům ketonů a léků jako jsou daunorubicin nebo dolasetron. Je dokázána jeho silná exprese u karcinomů plic a jater, kolorektálního a děložního karcinomu. Pomocí siRNA jde AKR utlumit a tím dochází k inhibici růstu a snížení rychlosti tvorby ložisek karcinogenních buněk. AKR1B10 hraje kritickou roli v jejich proliferaci [37].

2.4.2.4 AKR1C1-C4 = hydroxysteroiddehydrogenasy

Tato podrodina čtyř genů sdílí mezi sebou více než 86 % podobnost, ale jejich odlišnosti jsou v biochemických vlastnostech. Všechny čtyři enzymy se nacházejí v játrech, ale jejich extrahepatální distribuce je zcela jiná. AKR1C1 se nachází hlavně v játrech, AKR1C2 a 1C3 jsou s velkou dominancí exprimovány i v prostatě a v mléčných žlázách. Enzymy spolupracují s aldehydy a ketony a jejich přirozenými substráty jsou steroidy a prostaglandiny [28, 37].

2.4.2.5 AKR1D1 = Δ^4 -3-ketosteroid-5- β -reduktasa

Enzym purifikovaný z tkáně jater jako jediný katalyzuje 5 β -stereospecifickou redukcí při syntéze žlučových kyselin. Vykazuje enzymatickou aktivitu pro steroidní hormony, včetně testosteronu, progesteronu, kortizolu anebo kortizonu. Je přítomen i v mozkové tkáni a genitourinárním traktu. Jeho důležitá role je v degradaci pohlavních hormonů. Mutace v genu má za následek neonatální cholestázu, hepatitidu až selhání jater [28, 37].

2.4.2.6 AKR7A2-A3 = aflatoxinové reduktasy

Jde o skupinu cytosolických proteinů, která byla poprvé objevena v organismu krysy pro svou schopnost metabolizovat dialdehydaflatoxin B1 na netoxický alkohol. Jde o jeden ze dvou skupin AKR, které se řadí mezi funkční dimery. AKR7A3 má tkáňovou distribuci omezenou na žaludek, slinivku, ledviny a játra, AKR7A2 je hojně exprimován v extrahepatálních tkáních [37].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit konstitutivní expresi vybraných AKR u *H. contortus*, porovnat získané hodnoty v rámci životního cyklu a mezi dvěma kmeny s různou citlivostí vůči anthelmintikům. Pro získání výsledků bylo nutné provést následující postupy:

- převést RNA z biologických vzorků do podoby cDNA pomocí reverzní transkripce
- kvantitativní stanovení vybraných AKR pomocí qPCR
- vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této kapitole bude popsán použitý materiál, přístroje, reagentie, pomůcky, technické vybavení a technické postupy potřebné pro dosažení vytyčených cílů experimentální části diplomové práce. Všechny postupy byly převzaty z protokolů.

4.1 Biologický materiál

V této diplomové práci byla použita vajíčka, larvy, samčí a samičí dospělci *H. contortus*.

Zdravá jehňata ve věku 2-3 měsíců byla infikována L₃ larvami. Každému z nich bylo perorálně podáno kolem 6 000 infekčních larev. Pro práci byly použity dva kmeny – citlivý ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) a rezistentní kmen IRE vyvinutý z ISE selekčním tlakem thiabendazolu [38]. Aby nebyla ostatní zvířata nakažena, byla jehňata chována izolovaně od okolního prostředí. Po šesti týdnech byla usmrcena, převezena do laboratoře a dospělci byli vyjmuti ze slezu. Následně se ručně rozdělili dle morfologických znaků na samce a samice pod mikroskopem. Byli připraveni pro okamžitou izolaci RNA nebo přeneseni do TRI činidla a zmrazení na -80 °C [39].

Při chovu bylo se zvířaty zacházeno dle platných zákonů – Zákon České národní rady č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a zásadami pro zacházení a práci s laboratorními zvířaty dle Vyhlášky č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat [39, 40].

4.2 Chemikálie, technické vybavení a pomůcky

4.2.1 Chemikálie

DTT (dithiotreitol) – Sigma-Aldrich

Inhibitor RNase – RNAsin- Thermo Fisher Scientific

Náhodné hexamery – Generi Biotech

Primery – Generi Biotech

qPCR kit: xCEED qPCR SG Mix - Biotech

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

Směs dNTPs - Eurogentec

voda redestilovaná (H₂O)

4.2.2 Technické vybavení

Automatické pipety

Pipety se používají k odměření přesně stanoveného objemu vzorku do zkumavky. Byly použity: Research a Xplorer od firmy Eppendorf.

Vortex

Tento laboratorní přístroj slouží k pečlivému a rychlému promíchání vzorku ve zkumavce. Byl použit: PV 1 od firmy Grant-Bio.

Centrifuga

V tomto přístroji byly stáčeny PCR stripky před samotnou reakcí z důvodu odstředění všech částí roztoku. Byl použit: Biofuge stratus Heraeus od firmy Thermo scientific.

Přístroj pro Real-Time PCR

Během real-time PCR dochází k tvorbě fluorescenčního záření. To je dáno především chemickými vlastnostmi látky, která se do reakce přidává, a to fluoroforu [41].

Hlavní znak, který odlišuje real-time PCR od klasické PCR je, že prvně zmiňovaný využívá místo termocykleru kombinovaný termocykler s fluorimetrem. Ten slouží k měření změny intenzity fluorescenčního záření [41].

Fluorimetr se skládá ze zdroje excitačního záření, filtrů nebo monochromátoru a detektoru záření. Ve zdroji vzniká záření, které prochází filtry nebo monochromátorem, kde změní svou vlnovou délku. Následně vstupuje do vzorku, kde dojde k jeho interakci, vzniku fluorescenčního záření, které nakonec dopadá otvorem přes filtr na detektor záření [41].

Jako zdroje záření se používají halogenové žárovky, LED diody nebo lasery. K vybrání světla o určité vlnové délce se využívají filtry nejčastěji optické, anebo

monochromátory (hranol nebo difrakční mřížka). Jako detektory záření, které mění energii určité vlnové délky na elektrický signál, se využívají fotonásobiče nebo CCD (zařízení s vázanými náboji) [41]. Byl použit: Quant Studio 6 od firmy AppliedBiosystems.

PCR termocykler

PCR termocykler je přístroj používaný k namnožení NK. Teplota se v něm mění automaticky v časových intervalech. Opakováním se logaritmicky tvoří až miliarda kopií požadovaného úseku [42]. Byl použit: MJ mini od firmy Bio-Rad.

Hlubokomrazící box

Tento přístroj se používá pro hluboké zmrazení vzorků, které si chceme v laboratoři uchovat pro další zpracování. Uvnitř boxu se teplota pohybuje okolo -85 °C. Byl použit: Vxe Series Jouan od firmy Thermo Scientific.

Laminární box

Jde o laboratorní zařízení sloužící k udržení sterilního prostředí pro práci. Tento přístroj může obsahovat speciální filtry, nebo také germicidní UV lampu. Filtry slouží k zabránění kontaminace analyzovaného vzorku zároveň chrání nás např. před kontaminací chemickými látkami. Byl použit: UVC/T-AR od firmy BioSan.

Minicentrifuga

Tento přístroj se používá k rychlému stočení Eppendorf zkumavek a mikrozkušavek přímo během práce. Dochází k oddělení látek ve zkumavkách pomocí odstředivé síly. Byl použit: Sprout od firmy Heathrow Scientific.

4.2.3 Pomůcky

Plastové zkumavky, mikrozkušavky Eppendorf, stojany na zkumavky a mikrozkušavky, sterilní pipetovací špičky, 96 jamková PCR destička, 384 jamková PCR destička, filmy na uzavírání, rukavice

4.3 Metodika

4.3.1 Reverzní transkripce

Principem metody je převedení ribonukleové kyseliny (RNA) na komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy (RT). Následně je cDNA použita při qPCR pro stanovení míry exprese testovaných genů. RNA byla izolována Mgr. Štěrbovou ze všech vývojových stádií *H. contortus*, ze dvou kmenů. Následně byla tato RNA ošetřena DNasou a naředěna na finální koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ používanou jako vstupní materiál pro reverzní transkripci.

Postup:

- 1) Byla připravena směs 5 μl ředěné RNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 1 μl hexamerů (10 nM).
- 2) Následně byla směs vložena do PCR termocykléru, kde se po dobu 5 minut zahřívala na 65 °C. Zkumavka byla dána na led a mírně stočena.
- 3) Do směsi bylo přidáno 14 μl mastermixu, který obsahoval:

Tabulka 2 - ukázka množství látek, ze kterých byl připraven mastermix

LÁTKA	MNOŽSTVÍ [μl]
reakční pufr	4
DTT (10x)	2
dNTPs (5 mM)	2
RT	0,5
H ₂ O	5,5

- 4) Tato směs byla zahřívána v PCR termocykléru po dobu 50 minut na teplotu 42 °C, kde se syntetizovala cDNA a následně 5 minut na teplotu 80 °C, kde došlo k denaturaci RT.
- 5) Po proběhlé reakci bylo přidáno 180 µl redestilované H₂O, čímž se připravená cDNA naředila 10x. 5 µl směsi odpovídalo 2,5 ng původní RNA.
- 6) Takto připravená cDNA se zmrazila a uchovávala při -20 °C.

4.3.2 Kvantitativní PCR v reálném čase

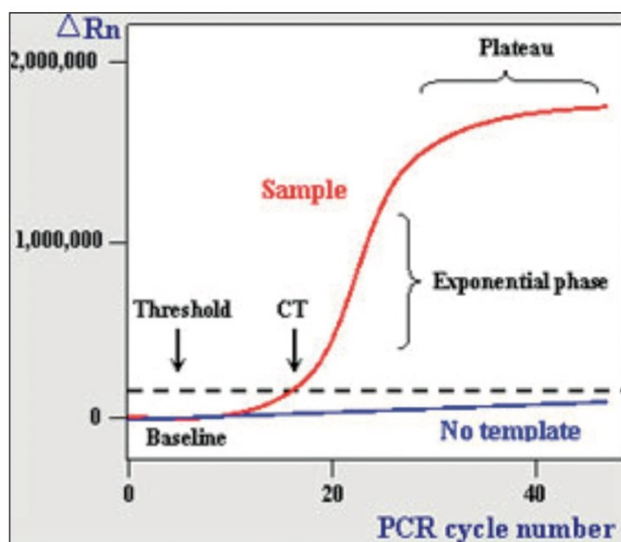
Real-time PCR neboli qPCR je metoda založena na klasické PCR, ale umožňuje nám měřit zmnožený produkt v průběhu reakce tzv. v reálném čase. Produkty lze detekovat pomocí fluorescenčních molekul, které odpovídají množství amplifikované NK v každém cyklu [43].

Zvláštní důraz je kladen především na kinetiku reakce. Základem reakce je cyklicky se opakující denaturace, hybridizace a syntéza nových řetězců. Kromě komponent používaných v klasické PCR je nutné přidat ještě fluorescenční molekuly, aby bylo možné sledovat množství produktu. V každém cyklu je měřena fluorescence, přičemž intenzita záření je přímo úměrná koncentraci přítomného produktu [44].

Samotná reakce probíhá v cykleru. Ten umožňuje jak teplotní cyklování, tak vyhodnocení fluorescence v každém cyklu. Některé cyklery jsou schopné také analyzovat křivku tání [44].

Na konci celého měření je vytvořena amplifikační křivka, kde je naměřená fluorescence vynesena proti příslušnému cyklu. Amplifikační křivka se dá rozdělit na 3 části [44]:

1. Fáze pozadí neboli baseline – koncentrace amplikonů je nízká a nelze ji ještě měřit
2. Exponenciální fáze – exponenciální nárůst množství amplikonů i fluorescence
3. Fáze „plató“ – systém je nasycen a množství amplikonů se nijak nemění



Obrázek 6 – ukázka amplifikační křivky [43]

Nejdůležitějším bodem celé amplifikační křivky je C_t tedy *threshold cycle*. Jde o cyklus, kde intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce. Čím vyšší je koncentrace templátu ve směsi, tím nižší je hodnota C_t , protože se detekuje zvyšující se fluorescence produktu. Analýza křivky tání umožňuje rozlišit specifické produkty od těch nespecifických [44].

Postup pro měření v 96 jamkové destičce:

1) Nejprve byla připravena směs pro qPCR.

Tabulka 3 – ukázka množství látek, které byly použity na přípravu mastermixu do 96 jamkové destičky

LÁTKA	MNOŽSTVÍ [μ l]
H ₂ O	4,2
2x koncentrovaný SyberGreen	10
F primer (5 μ l)	0,4
R primer (5 μ l)	0,4

- 2) Do 96 jamkové destičky bylo napipetováno 15 μ l mastermixu a poté bylo přidáno 5 μ l cDNA.
- 3) Destičky byly zalepeny, zvortexovány a zcentrifugovány.
- 4) Následně byly dány do qPCR cykléru.
- 5) Byl spuštěn program QuantaStudio 6 flex software a došlo k měření stanovených parametrů.

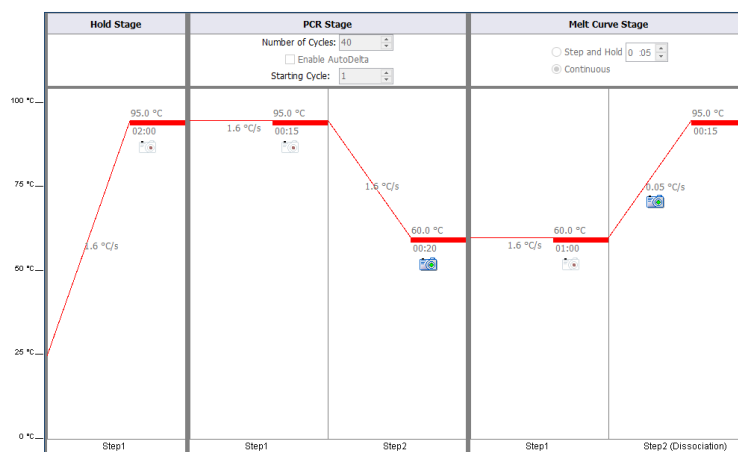
Postup pro měření v 384 jamkové destičce:

1) Nejprve byla připravena směs pro qPCR.

Tabulka 4 – ukázka množství látek, které byly použity na přípravu mastermixu do 384 jamkové destičky

LÁTKA	MNOŽSTVÍ [μ l]
H ₂ O	1,22
2x koncentrovaný SyberGreen	3,5
F primer (5 μ l)	0,14
R primer (5 μ l)	0,14

- 2) Do 384 jamkové destičky bylo napipetováno 5 μ l mastermixu a poté byly přidány 2 μ l cDNA.
- 3) Destičky byly zalepeny, zvortexovány a zcentrifugovány.
- 4) Následně byly dány do qPCR cykléru.
- 5) Byl spuštěn program QuantaStudio 6 flex software a došlo k měření stanovených parametrů.



Obrázek 7 - ukázka jednotlivých cyklů PCR

Vzhledem k úpravě DNA polymerasy použité v Xceed kitu (Sybr Green I), je možné a doporučené výrobcem používat pouze dvoustupňové PCR, kdy v jednom teplotním kroku nasedají primery a ihned probíhá syntéza, což výrazně celý průběh urychlí. Na konci tohoto kroku v každém cyklu je zaznamenána fluorescence. Po proběhnutí vlastní qPCR následuje měření křivky tání (Melt Curve Stage), kdy je postupně zvyšována teplota a měřena fluorescence, která umožní ověřit specifitu reakce.

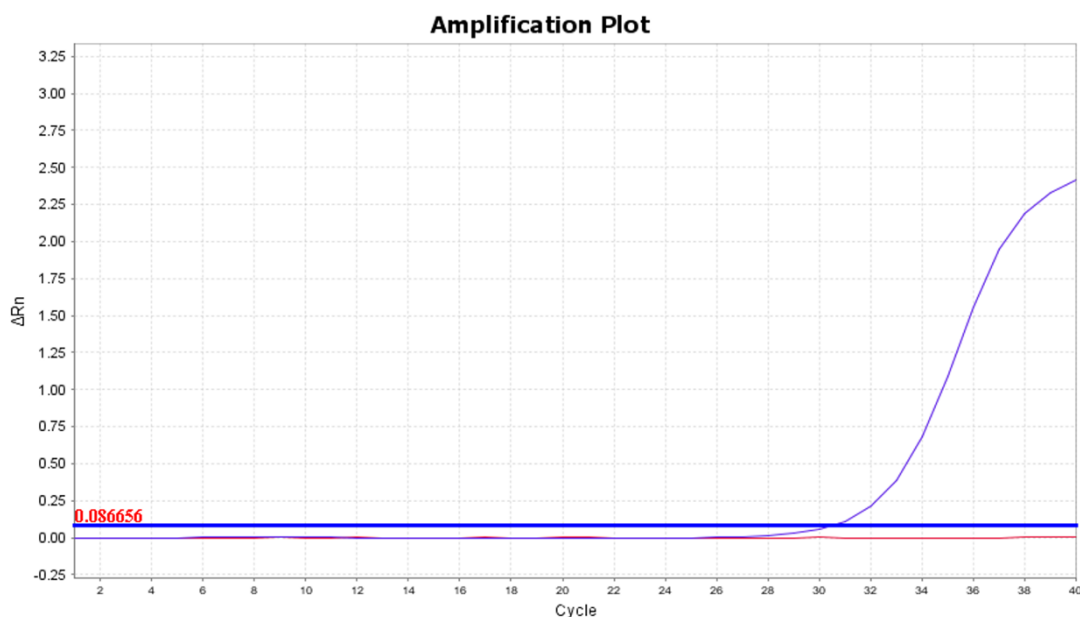
4.3.3 Statistické zpracování dat

Uvedené výsledky jsou vyjádřeny pomocí průměru \pm směrodatná odchylka (SD), která byla vypočítána ze 4 biologických replikátů ke každému vývojovému stádiu. Hodnoty byly vztaženy ke dvěma referenčním genům velké podjednotce RNA polymerasy II (AMA) a glyceraldehyd-3P-dehydrogenase (GAPDH). Rozdíly mezi kmeny ISE a IRE byly vypočteny pomocí metody Δ Ct, kde data rezistentního kmene IRE byla vztažena relativně k datům citlivého ISE kmene. Statistické významnosti rozdílu v genové expresi kmenů IRE a ISE byly vyhodnoceny pomocí testu Multiple t-test. Veškeré výsledky byly zpracovávány v programu GraphPad Prism 10.0.2.

5 VÝSLEDKY

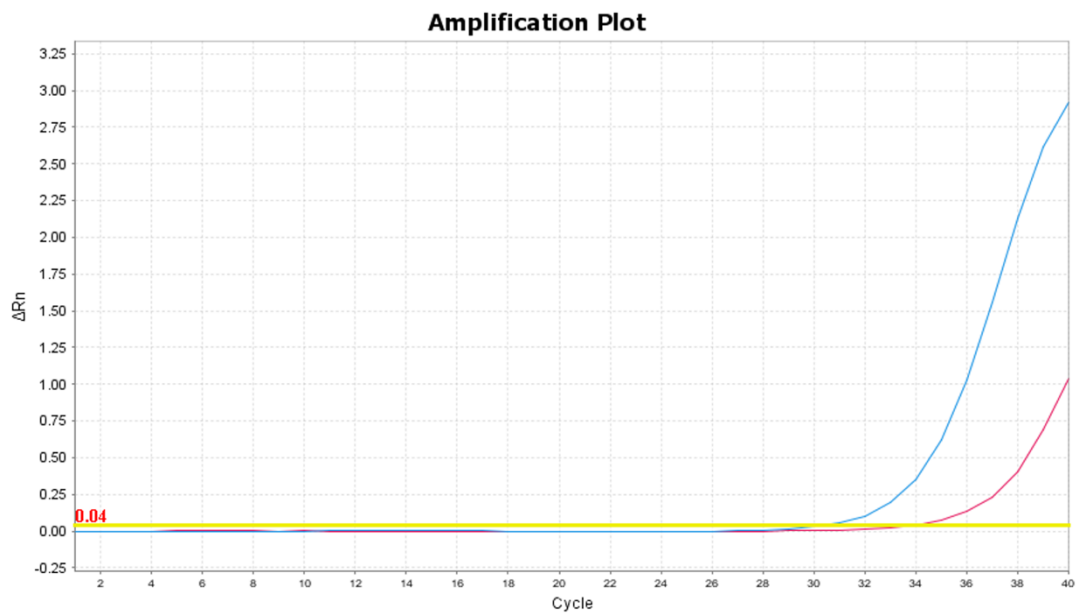
5.1 Způsob vyhodnocení naměřených dat

U každého vzorku se provedlo měření pomocí metody qPCR. Po jeho provedení byla u každé sady primerů provedena kontrola křivky tání a amplifikační křivky, která znázorňuje průběh reakce. Kritériem pro validitu dat byla nepřítomnost produktu v negativní (NTC) kontrole, která znamená nepřítomnost kontaminace. Za akceptovatelnou byla považována C_t hodnota NTC kontroly lišící se nejméně o 5 cyklů od hodnot naměřených vzorků. Dále byla kontrolována křivka tání, zda vykazuje pouze jeden pík. Takto byly prověřeny všechny vzorky a sady primerů. V případě, že některé kritérium nebylo splněno celý proces bylo nutné opakovat a provést nové měření. Měření bylo prováděno pro AKR1N, AKR2, AKR3, AKR4, AKR5, AKR6, AKR7, AKR8, AKR9, AKR10, AKR11, AKR12, AKR13, AKR14, AKR15, AKR16, AKR17, AKR18, AKR19, AKR20, AKR21 a AKR22.



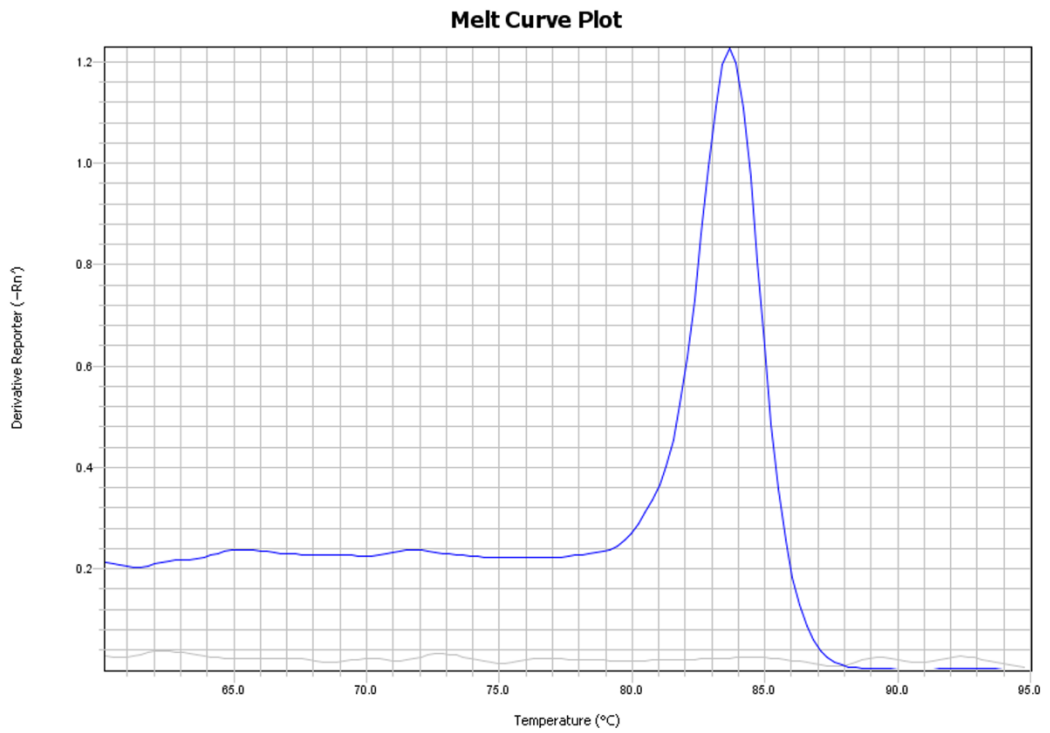
Obrázek 8 - vyhovující amplifikační křivka vzorku a NTC kontroly

Na obrázku č. 9 znázorňuje červená rovná linie NTC kontrolu, která nevykazuje vznik žádného produktu a exponenciální křivka fialové barvy znázorňuje vzorek. Modrá linie označuje tzv. „threshold“ linii pro odečet C_t hodnoty.



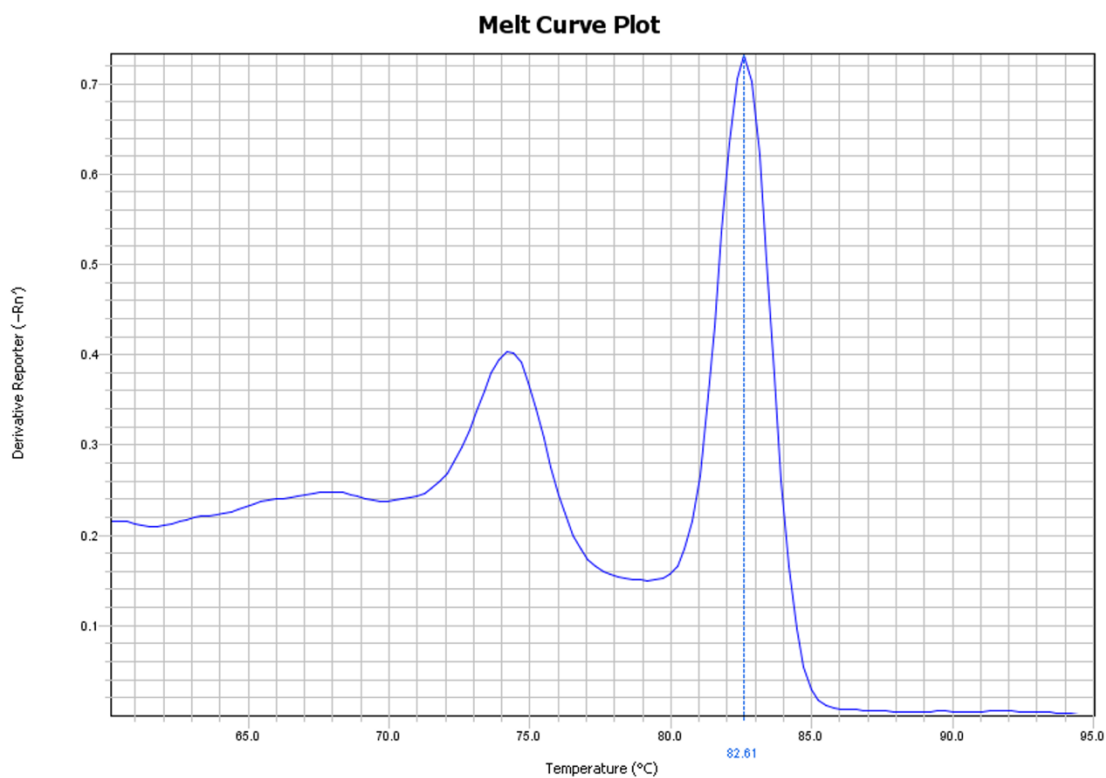
Obrázek 9 - nevyhovující amplifikační křivka

Na obrázku č. 10 je znázorněno červenou křivkou NTC kontrola a modrou křivkou vzorek. Od sebe se liší méně než o 5 cyklů, což je nežádoucí.



Obrázek 10 - vyhovující křivka tání

Na obrázku č. 11 je znázorněna spodní šedá křivka jako NTC kontrola, která nevykazuje žádný pík. Modrá křivka s píkem znázorňuje vyhovující vzorek, který obsahuje pouze jeden produkt.



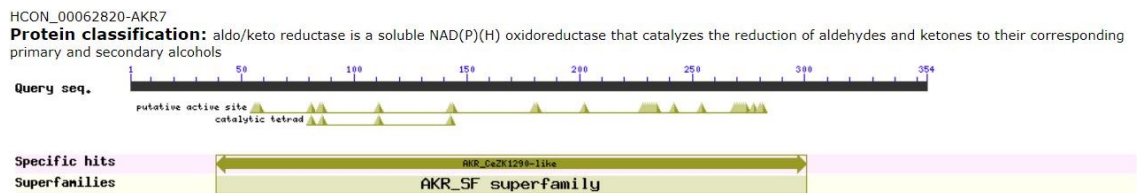
Obrázek 11 - nevyhovující křivka tání

Na obrázku č. 12 je modrou křivkou znázorněna tvorba dvou píků u vzorku, kde evidentně vznikl další nežádoucí produkt.

Pokud vzorky splňovaly výše uvedená kritéria, mohlo se přejít k vyhodnocování exprese genů. Data byla po odečtení v programu QuantoStudio 6 Flex Software vyhodnocena pomocí počítačového programu Microsoft Excel.

5.2 Sekvenční analýza a lokalizace genomu

Pomocí databáze WormBase bylo nalezeno celkem 22 genů AKR. Naše výsledky jsme porovnali s výsledky diferenciálního sekvenování na základě TPM z transkriptomů v projektu PRJEB560. Všechny přeložené sekvence AKR byly porovnány a byly hledány společné katalytické aminokyseliny (AMK) definující AKR pomocí vyhledávání v databázi konzervovaných domén (Conserved Domain Database CDD (nih.gov)).

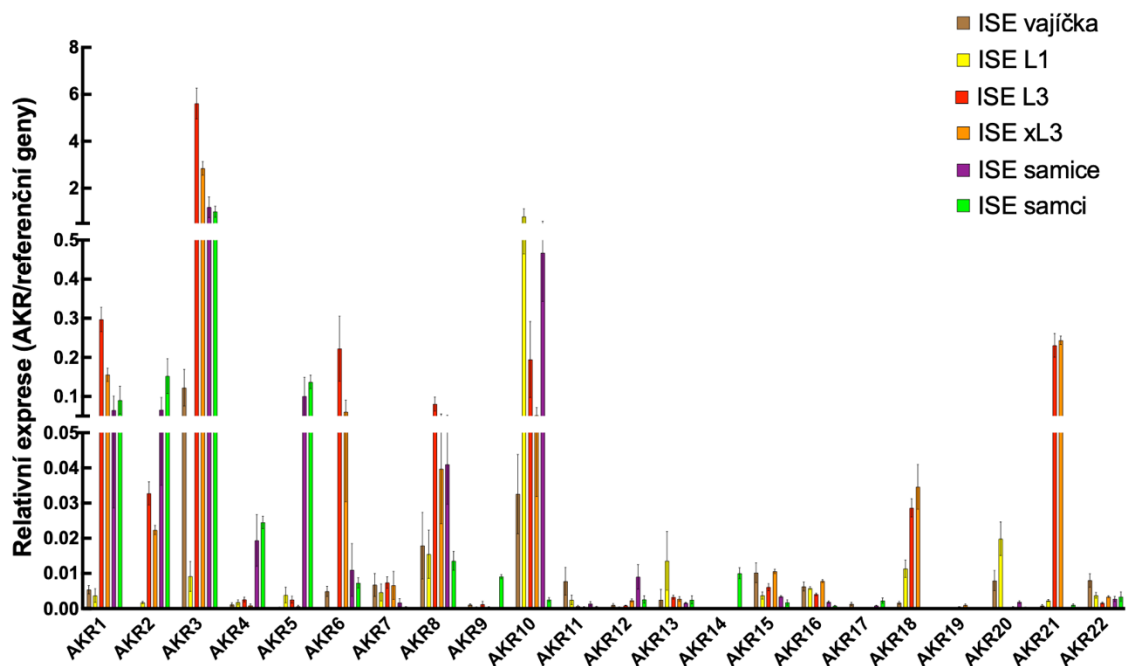


Obrázek 12 – Ukázka sekvenční analýzy konzervované domény u AKR7 pomocí nástroje CD Search Tool. Trojúhelníky ukazují polohu AMK zapojených do předpokládaného aktivního místa a katalytické tetrády. Pozice domény odpovídající super rodině AKR jsou zobrazeny pod sekvencí.

5.3 Porovnání exprese AKR v různých životních cyklech ISE kmene

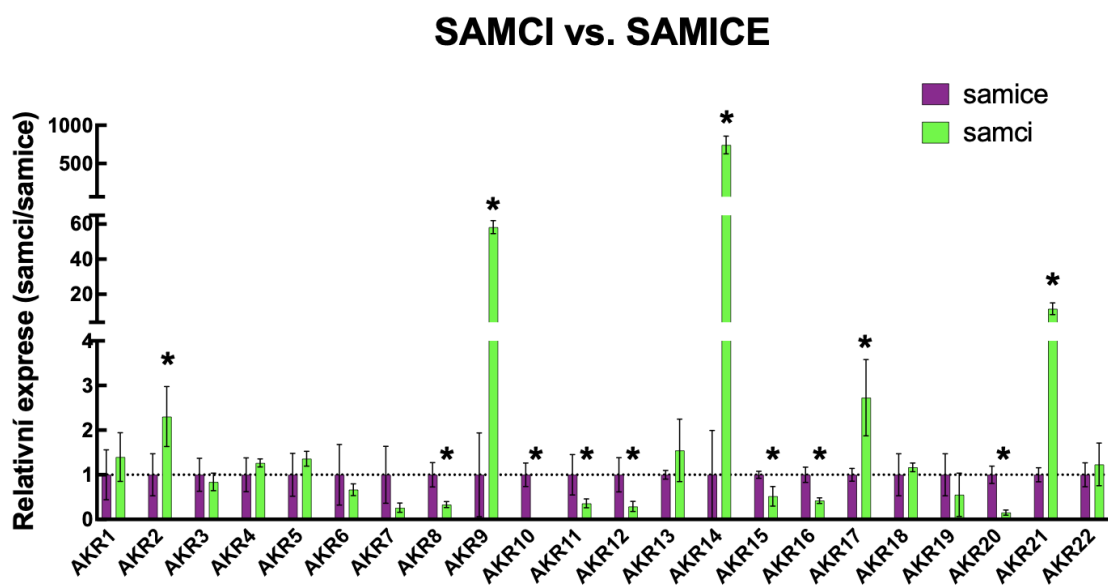
V této kapitole jsou uvedeny výsledky naměřené u citlivého ISE kmene. Byla porovnána různá životní stádia od vajíček po dospělé. Veškerá data byla vztažena ke dvěma referenčním genům AMA a GAPDH. Při porovnání dospělců samic a samců byly výsledky vztaženy k expresi u samic, která byla rovna 1.

Na obrázku č. 14 je znázorněna relativní exprese genů AKR v různých životních cyklech u citlivého ISE kmene. Je vidět, že většina AKR byla exprimována jen okrajově. AKR1, AKR3 a AKR10 jsou exprimovány ze všech genů nejvíce. Ve vajíčkách byla nejvíce exprimována AKR3, AKR8 a AKR10. V L₁ stádiu došlo k největší expresi u AKR10, AKR20 a AKR13. U L₃ stádia byla nejvíce exprimována AKR1, AKR3, AKR6, AKR8, AKR10, AKR18 a AKR20, u svlečených L₃ stádií došlo k expresi u AKR1, AKR3, AKR21, AKR6 a AKR10. U samců a samic došlo k největší expresi u AKR1, AKR2, AKR3, AKR4, AKR5, pouze u samic byla exprese viditelná i u AKR 10.



Obrázek 13 - Porovnání relativní exprese pro všechny geny AKR u ISE kmene pro všechny životní cykly *H. contortus*.

Na obrázku č. 15 je znázorněno relativní porovnání exprese genů AKR u samců a samic. Jsou zde vidět konkrétní statistické rozdíly mezi pohlavími. Sedm genů AKR je výrazně více exprimováno u samic než u samců. Jde o AKR8, AKR10, AKR11, AKR12, AKR15, AKR16 a AKR20. U AKR10 je dokonce výrazně převládající rozdíl. U samců je 5 genů exprimováno ve viditelně vyšším množství. Jde o AKR2, AKR9, AKR14, AKR17 a AKR21. Největší patrný rozdíl mezi samci a samicemi je znatelný u AKR14 a AKR10 s opačnými tendencemi exprese. Značné rozdíly v expresi mezi jednotlivými pohlavími může znamenat odlišné účely u jednotlivých AKR.

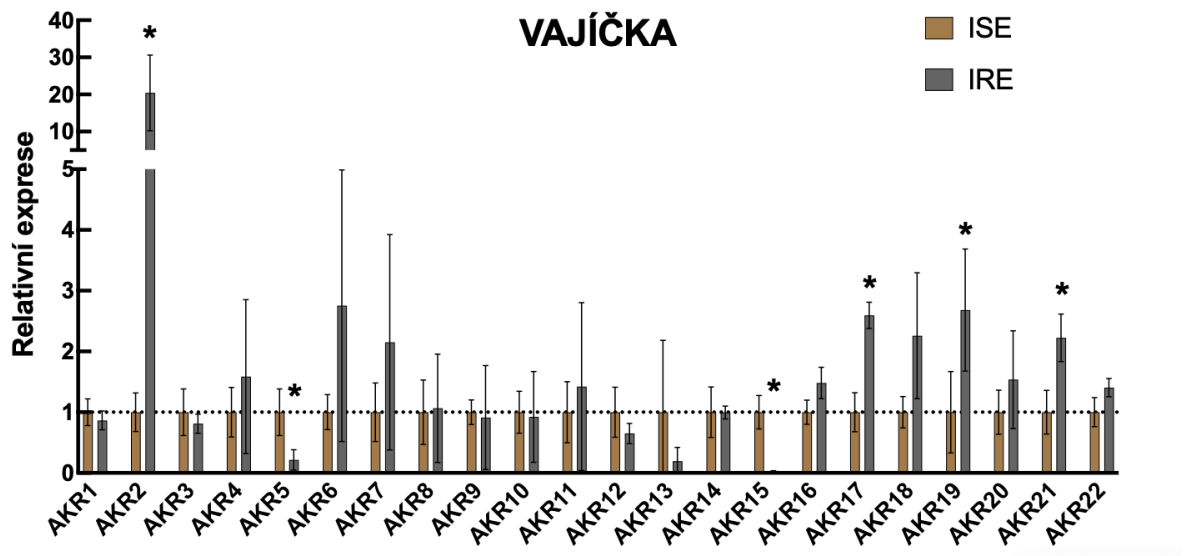


Obrázek 14 - Porovnání relativní genové exprese AKR mezi samci a samicemi. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).

5.4 Porovnání exprese mezi kmeny IRE a ISE

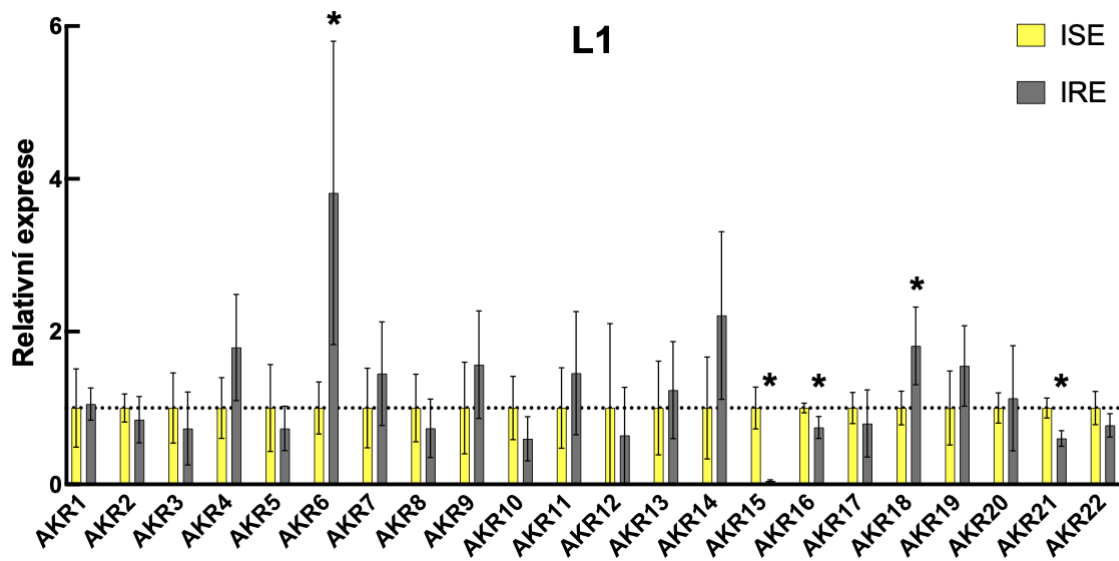
V důsledku zjištění vztahu mezi AKR a lékovou rezistencí jsou v této kapitole uvedena jednotlivá stádia životního cyklu *H. contortus* u ISE kmene citlivého na léčivo a rezistentního IRE kmene odolného vůči léčivům. Veškeré výsledky byly vztaženy k ISE kmeni. Pro lepší přehlednost získaných dat byla hodnota u všech AKR ISE kmene normalizována na hodnotu 1 a výsledky u IRE kmene jsou k této hodnotě vztaženy.

Na obrázku č. 16 je porovnání exprese u vajíček kmene ISE a IRE. U vajíček byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v šesti případech u IRE kmene. Viditelně nejvyšší exprese oproti ostatním AKR byla zaznamenána u genu AKR2. Další vyšší exprese byly detekovány u AKR17, AKR19 a AKR21. Žádná nebo velmi nízká exprese u IRE kmene je viditelná u genů AKR5 a AKR15 oproti ISE kmeni.



Obrázek 15 - Porovnání relativní exprese ve vajíčkách u kmene ISE a IRE. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).

Na obrázku č. 17 je znázorněno porovnání relativní exprese u larev L₁ ISE a IRE kmene. Statistické významnosti jsou patrné v pěti případech u IRE kmene. Nejvyšší exprese je v genu AKR6, nejnižší naopak v genu AKR15. V porovnání s obrázkem 16 je relativní exprese u L₁ nižší než u vajíček. Tento fakt je i patrný z osy relativní exprese, která je na obrázku 16 až v řádech desítek, ale na obrázku 17 je v řádech jednotek. Na obrázku 17 došlo u AKR18 a AKR14 ke zvýšené expresi, naopak u AKR16 nebo AKR21 došlo ke snížení.



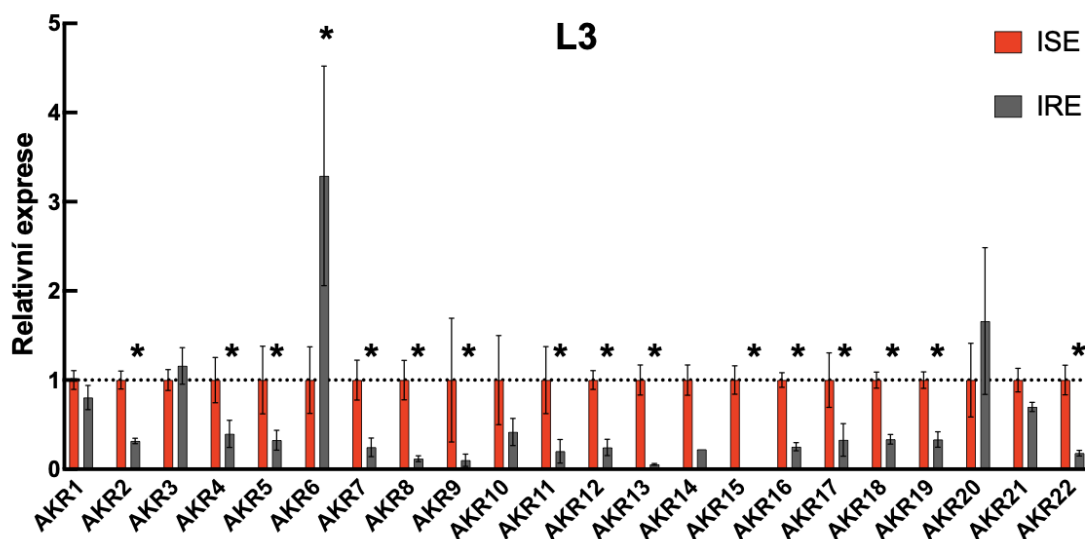
Obrázek 16 - Porovnání relativní exprese v larvách L₁ u kmenů IRE a ISE. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).

Obrázky č. 18 a č. 19 ukazují larvy stádia L₃ a xL₃ (larvy svlečené) IRE a ISE kmene. Jsou viditelné statisticky významné rozdíly u obou stádií, na obrázku 18 v šestnácti případech a na obrázku 19 v patnácti případech IRE kmene.

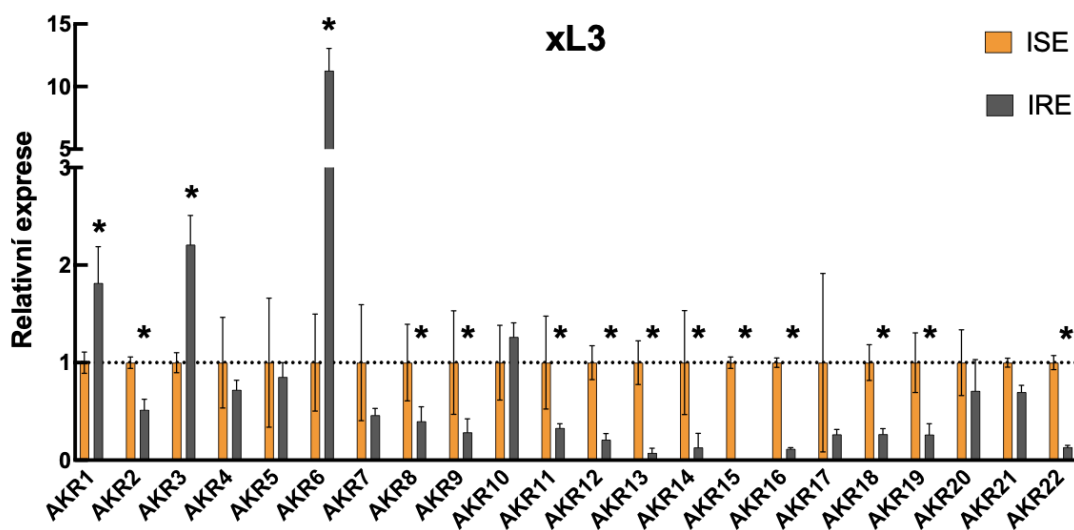
U 15 AKR genů stádia L₃: AKR2, AKR4, AKR5, AKR7, AKR8, AKR9, AKR11, AKR12, AKR13, AKR15, AKR16, AKR17, AKR18, AKR19 a AKR22 bylo zaznamenáno snížení exprese u IRE kmene oproti ISE. Pouze u AKR6 došlo k výrazně zvýšené expresi stejně jako u stádia xL₃ nebo L₁. Vše je vidět na obrázku č. 18.

U stádia svlečených larev xL₃ na obrázku č. 19 byl statistický rozdíl exprese v méně případech než u L₃. U 12 genů AKR2, AKR8, AKR9, AKR11, AKR12, AKR13, AKR14, AKR15, AKR16, AKR18, AKR19 a AKR22 došlo ke snížení exprese u IRE kmene. Ve třech případech bylo zaznamenáno zvýšení exprese u IRE kmene v genu AKR1, AKR3 a AKR6 v porovnání s ISE kmenem.

U obou těchto stádií jsou výsledky vcelku podobné. U L₃ i xL₃ došlo ke zvýšení exprese AKR6. Výrazné rozdíly jsou vidět pouze v genech AKR1 a AKR3, kde jsou u stádia xL₃ IRE kmene výrazně zvýšené.



Obrázek 17 - Porovnání relativní exprese u kmene IRE a ISE v larvách stádia L₃. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).

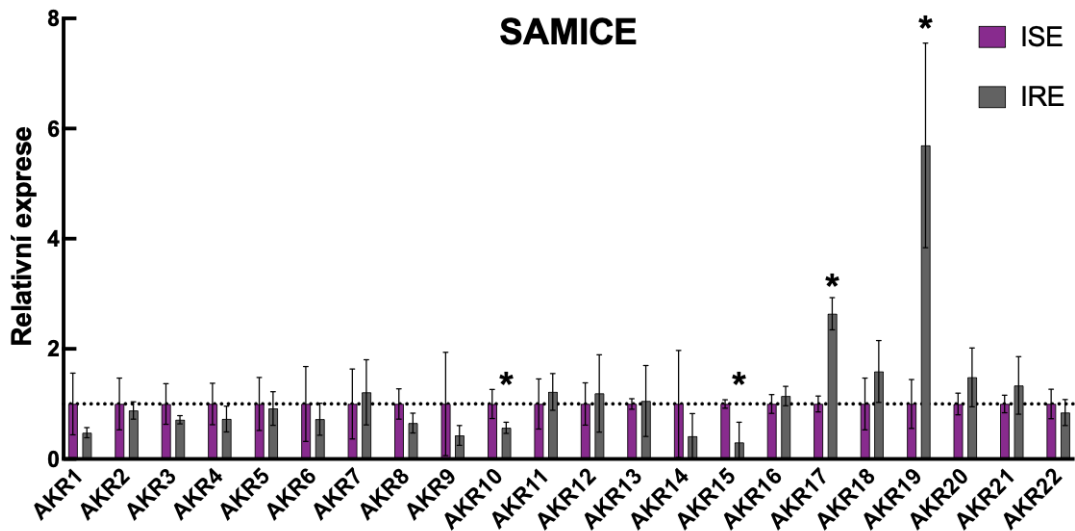


Obrázek 18 – Porovnání relativní exprese u kmene IRE a ISE ve svlečených larvách stádia xL₃. * jsou značeny statisticky významné výsledky (P > 0,5).

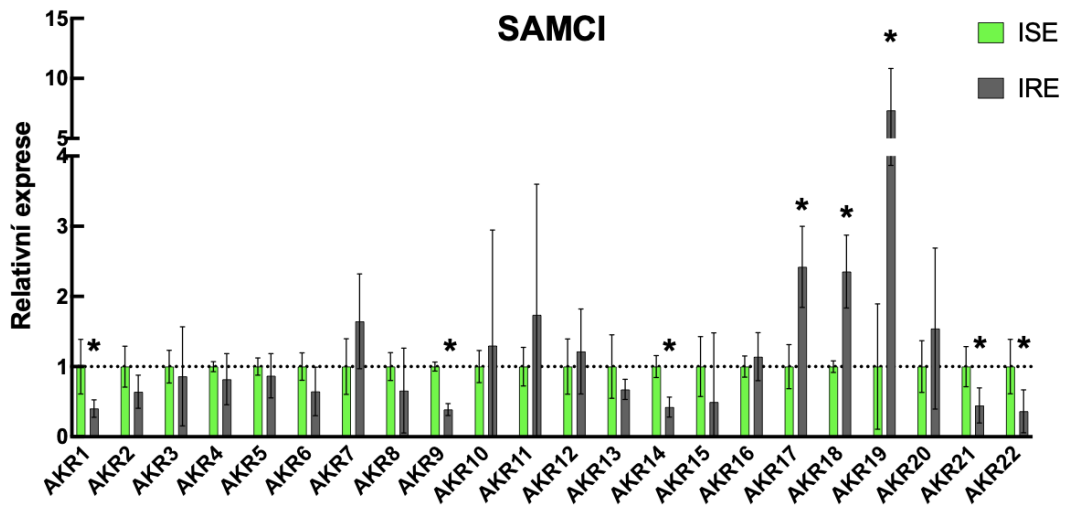
Na obrázku č. 20 jsou znázorněné statisticky významné rozdíly u IRE a ISE kmene u samic ve čtyřech případech. Ve dvou případech u AKR10 a AKR15 došlo ke snížení exprese u IRE kmene a u AKR17 a AKR19 došlo naopak ke zvýšení exprese oproti ISE kmeni.

Na rozdíl u samců, obrázek č. 21, došlo ke statisticky významným rozdílům hned u osmi případů. V pěti případech došlo k překvapivému snížení exprese u AKR1, AKR9, AKR14, AKR21 a AKR22. U AKR17, AKR18 a AKR19 došlo ke zvýšení exprese v porovnání s ISE kmenem.

U obou pohlaví došlo ke zvýšené expresi ve dvou případech v AKR17 a AKR19. Ke snížení exprese došlo ale u každého pohlaví v jiných AKR. Např. u AKR10 došlo u samců ke zvýšení exprese, ale u samic ke snížení exprese. Na základě výsledků IRE kmene dospělců u genů AKR17 a AKR19 je možné, že se tyto geny potenciálně mohou účastnit lékové rezistence u *H. contortus*.



Obrázek 19 – Porovnání relativní exprese u kmene IRE a ISE u samic. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).



Obrázek 20 – Porovnání relativní exprese u IRE a ISE kmenu u samců. * jsou značeny statisticky významné výsledky ($P > 0,5$).

6 DISKUZE

AKR se podílejí v lidském organismu na různých mechanismech jako jsou malignity, přeměna léků, metabolismy hormonů. Je tedy jasné, že i v dalších organismech jako jsou např. helminti hrají důležitou roli. Bohužel jsou o nich známy jen omezené informace.

Autor Yamamoto a kol. ve svých různých studiích během let 2013 až 2023 studoval aktivitu rekombinantních AKR u bource morušového latinským názvem *Bombyx mori*. Konkrétně zkoumali AKR2E4, AKR2E9, AKR1B a AKR2E5. Během výzkumu byly AKR purifikovány a zjišťovala se jejich aktivita a struktura. Vzhledem k substrátové specifitě jednotlivých AKR se mohou podílet např. na metabolismu glukosy, detoxikaci toxických aldehydů nebo se podílí na antioxidačních reakcích [45, 46, 47, 48].

V další studii autora Gua a kol. (2014) identifikovali u můry *Helicoverpa armigera* aktivitu dvou AKR překvapivě v tykadlech dospělců. AKR vykazovaly jak NADH, tak NADPH-dependentní aktivitu. V jiné studii autora Li a kol. (2019) našli u invazivního škůdce *Corythucha ciliata* tři nové geny AKR podílející se na řízení biosyntézy glycerolu. Autoři tyto geny charakterizovali a zjišťovali míru jejich exprese [49, 50].

Ve studii druhé skupiny reduktas/dehydrogenas s krátkým řetězcem (SDR) u ostnoploutvé ryby mořana zlatého *Sparus aurata*, kterou vypracovali Rosa a kol. (2018), identifikovali SDR pomocí qPCR. Zvýšená exprese SDR u tohoto organismu hraje roli v kostním metabolismu nebo mineralizaci tkání [51].

V článku autora Huanga a kol. (2017) byla popsána studie AKR u krví přenášené piroplazmy *Babesia microti* původce babeziózy, kde zjišťovali hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty měřili pomocí průtokové cytometrie. ROS vedly ke zvýšené regulaci některých AKR. To znamená, že se AKR mohou podílet na obraně organismu proti oxidativnímu stresu [52].

Kvůli zlepšení Chagasovy choroby a pochopení lékových rezistencí byly ve studii autorky Laury González a kol. (2017) analyzovány AKR a alkoholdehydrogenasa v populaci prvoka *Trypanosoma cruzi* rezistentní k benznidazolu, která má klony s různou citlivostí k tomuto léčivu. Rezistence byla studována u všech stádií. Využívali 2D-gelovou elektroforézu. Zjistili, že nadměrná exprese těchto proteinů vede ke zvýšení odolnosti vůči léčivu [53].

Stejnou problematikou, jako v této diplomové práci, se ve své studii u hlístice *H. contortus* zabývala i Štěrbová a kol. (2023). Jediné, čím se studie lišila, bylo použití druhé skupiny oxidoreduktas a to SDR. Při svém výzkumu měli stejný postup. V genomu identifikovali 46 domnělých genů SDR z nichž expresi 23 genů stanovili kvantitativní metodu qPCR. Při porovnávání exprese genů SDR v různých životních fázích *H. contortus*, zjistili, že stejně jako u AKR se exprese v jednotlivých stádiích liší. U SDR došlo k nejvyšší expresi u SDR3, SDR5 a SDR18. Většina SDR byla nejvíce exprimována ve volně žijících larvách. SDR5 se exprimovala nejvíce u dospělých samců v porovnání s juvenilními stádii. V porovnání s výsledky výše má tedy každé stádium u *H. contortus* jinou expresi AKR i SDR. Tím, že jde o enzymy s podobnou katalytickou aktivitou se dá říct, že různé vývojové změny v expresi jak u SDR, tak u AKR musí ukazovat na přizpůsobení se odlišným podmínkám životního cyklu. Vývojová stádia jako vajíčka nebo larvy musejí být schopny poprat se více s vnějšími podmínkami jako je např. působení různých xenobiotik na rozdíl od dospělých jedinců. Podobně jako v této práci, porovnávali expresi SDR u dvou kmenů s různou citlivostí na benzimidazoly u vývojových stádií. U vajíček, larev a dospělých kmene IRE došlo ke zvýšení exprese u SDR1, SDR12, SDR13 a SDR16. Protože se zatím nikdo nevěnoval ani SDR ani AKR v kmeni *H. contortus* nelze výsledky porovnat s jinými studii a domnělé geny zapojené do lékové rezistence by se musely potvrdit funkční analýzou [54].

Podobnou problematikou se zabývala také Matoušková a kol. (2018). U *H. contortus* identifikovali 32 genů UDP-glykosyltransferasy (UGT) a pomocí konstitutivní exprese identifikovali statisticky významné rozdíly mezi samci a samicemi dospělců. Dále porovnávali expresi mezi ISE citlivým kmenem a dvěma kmeny rezistentními k benzimidazolu. Zjistili, že konstitutivní exprese UGT368B2 byla vyšší u obou IRE kmenů oproti ISE. To znamená, že tento enzym je pomocí glykosylace schopen podílet se na lékové rezistenci z důvodu deaktivace anthelmintika [55].

Vzhledem k tomu, že se AKR našla i u jiných druhů organismů s výraznou aktivitou nebo lékovou rezistencí bylo by dobré tuto problematiku více prostudovat.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla zkoumána relativní exprese jednotlivých AKR ve vajíčkách, larvách a dospělých *H. contortus* pomocí metody qPCR. Bylo sledováno celkem 22 genů AKR, jejichž exprese se výrazně liší ve všech vývojových stádiích, přičemž AKR1, AKR3 a AKR10 mají výraznější expresi ve většině stádií oproti ostatním genům. Dále byla porovnána exprese AKR ve všech vývojových stádiích u kmene citlivého na léky a kmene rezistentního na benzimidazoly. U všech tří larválních stádií byla prokázána vyšší exprese genu AKR6 u rezistentního kmene. U vajíček byla u tohoto kmene více exprimována AKR2. U dospělců IRE kmene byla vyšší exprese AKR17 a AKR19, což může mít spojitost s potenciální lékovou rezistencí u *H. contortus*. Na základě mých výsledků by bylo možné vybrat AKR, kterou by bylo vhodné se dále zabývat, například pro stanovení její katalytické aktivity a zhodnocení její potenciální funkce v rezistenci.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADR	aldosareduktasa
AGE	Konečný produkt pokročilé glykace z angl. Advanced glycation end products
AKR	aldo-ketoreduktasy
AMA	velká podjednotka RNA polymerasy II
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
bp	pár bází
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
C _t hodnota	z angl. Cycle of treshold
CYPs	cytochrom P450
ddPCR	kapková digitální PCR
dNTPs	z angl. deoxyribonucleoside triphosphates
DTT	dithiotreitol
GAPDH	glyceraldehyd-3P-dehydrogenasa
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasa
HGNC	Hugo Genome Nomenclature Committee
IRE	rezistentní kmen
ISE	citlivý kmen
ITS	interní transkribované spacery

L ₁	larva prvního stádia
L ₃	larva třetího stádia
mRNA	jednovláknová nukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	nukleová kyselina
NTC	negativní kontrola
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
P-gp	P-glykoprotein
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
SD	směrodatná odchylka
SDR	dehydrogenasa s krátkým řetězcem
SiRNA	z angl. Small Interfering RNA
TIM barel	thioiso-fosfát isomerasový barel
UGT	UDP-glykosyltransferasa
UV	ultrafialové záření
WHO	z angl. World Health Organization
xL ₃	svlečená larva třetího stádia

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MACDONALD, A. S.; ARAUJO, M. I.; PEARCE, E. J. Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infection and Immunity*. 2002, 70 (2): 427-433.
2. MCSORLEY, H. J.; MAIZELS, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012, 25 (4): 585-608.
3. JIMENEZ-CISNEROS, B. E.; MAYA-RENDON, C. Helminths and sanitation. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 2007, 1: 60-71.
4. PŘÍHODOVÁ, V. *Výsledky parazitologické kontroly jehňat v grantovém experimentu II*. Diplomová práce, vedoucí Lamka, Jiří. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie, 2008.
5. WIEDEMANN, M.; VOEHRINGER, D. Immunomodulation and Immune Escape Strategies of Gastrointestinal Helminths and Schistosomes. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11.
6. ČERMÁKOVÁ, Z.; VALENTA, Z.; BUCHTA, V. Parazitíční helminti člověka. *Folia Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7.1.
7. RYŠAVÝ, B. *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. ISBN 80-04-20864-9.
8. HORÁK, P.; SCHOLZ, T. *Biologie helmintů*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-782-8.
9. VOLF, P.; HORÁK, P. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.

10. KOŘÍNKOVÁ, K. *Obecná parazitologie: význam a biologie parazitů*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, 2006. ISBN 80-7044-798-2.
11. ARSENOPOULOS, K. V.; FTHENAKIS, G. C.; KATSAROU, E. I.; PAPADOPOULOS, E. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*. 2021, 11 (2).
12. KOTRLÁ, B. *Choroby lovné zvěře*. Lesnická knihovna (Státní zemědělské nakladatelství). Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1953.
13. WANG, C.; LI, F.; ZHANG, Z.; YANG, X.; AHMAD, A. A. et al. Recent Research Progress in China on *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8.
14. GILLEARD, J.S.; REDMAN, E. Genetic Diversity and Population Structure of *Haemonchus contortus*. In: *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. Elsevier, 2016, 31-68. ISBN 9780128103951.
15. GETACHEW, T.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite*. 2007, 14 (1): 3-14.
16. ADDUCI, I.; SAJOVITZ, F.; HINNEY, B.; LICHTMANNSPERGER, K.; JOACHIM, A. et al. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals*. 2022, 12 (18).
17. EMERY, D. L.; HUNT, P. W.; LE JAMBRE, L. F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*. 2016, 46 (12): 755-769.
18. LOUGHLIN, E. H. DIAGNOSIS OF HELMINTHIASIS. *Journal of the American Medical Association*. 1949, 139 (15).

19. MANKE, M. B.; DHAWALE, S. C.; JAMKHANDE, P. G. Helminthiasis and medicinal plants: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015, 5 (3): 175-180.
20. LUSTIGMAN, S.; PRICHARD, R. K.; GAZZINELLI, A.; GRANT, W. N.; BOATIN, B. A. et al. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012, 6 (4).
21. BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. Online. In: *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. Elsevier, 2016, s. 181-238. ISBN 9780128103951.
22. ZAJÍČKOVÁ, M.; NGUYEN, L. T.; SKÁLOVÁ, L.; RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L.; MATOUŠKOVÁ, P. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discovery Today*. 2020, 25 (2): 430-437.
23. HOLDEN-DYE, L. Anthelmintic drugs. Online. *WormBook*. 2007, s. 1-13. ISSN 1551-8507.
24. KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. In: *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. Elsevier, 2016, 397-428.
25. LACEY, E.; PRICHARD, R. K. Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986, 19 (2): 171-181.
26. BATH, G.F.; VAN WYK, J.A. The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 2009, 86 (1-3): 6-13.

27. CROOM, E. Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In: *Toxicology and Human Environments*. Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier, 2012, 31-88.
28. SKÁLOVÁ, L., a kol. 2017. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3733-4.
29. ANZENBACHER, P.; ANZENBACHER, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001, 58 (5): 737-747.
30. GHANAYEM, B.; HOFFLER, U. Investigation of Xenobiotics Metabolism, Genotoxicity, and Carcinogenicity Using Cyp2e1^{-/-} Mice. *Current Drug Metabolism*. 2007, 8 (7): 728-749.
31. STRANGE, R. C.; SPITERI, M. A.; RAMACHANDRAN, S.; FRYER, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001, 482 (1-2): 21-26.
32. SILVA, V.; GIL-MARTINS, E.; SILVA, B.; ROCHA-PEREIRA, C.; SOUSA, M. E. et al. Xanthones as P-glycoprotein modulators and their impact on drug bioavailability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2021, 17 (4): 441-482.
33. LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003, 42 (1): 59-98.
34. JEZ, J. M.; BENNETT, M. J.; SCHLEGEL, B. P.; LEWIS, M.; PENNING, T. M. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Journal*. 1997, 326 (3): 625-636.
35. MINDNICH, R. D.; PENNING, T. M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: Genomics and annotation. *Human Genomics*. 2009, 3 (4).
36. PENNING, T. M. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-Biological Interactions*. 2015, 234: 236-246.

37. BARSKI, O. A.; TIPPARAJU, S. M.; BHATNAGAR, A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metabolism Reviews*. 2008, 40 (4): 553-624.
38. ROOS, M. H.; OTSEN, M.; HOEKSTRA, R.; VEENSTRA, J.G.; LENSTRA, J.A. 2004. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 34: 109-115.
39. JELENKOVÁ, K. *Vliv monepantelu na expresi vybraných enzymů u vlasovky slezové*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta.
40. NEKOVOVÁ, L. *Konstitutivní exprese UDP-glukosyltransferas vlasovky slezové*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta.
41. DVOŘÁKOVÁ, M. *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*. Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Přírodovědecká fakulta.
42. LYSKOVÁ, L. *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Lékařská fakulta.
43. DUDOVÁ, S. et al. *Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu*. *Klinická onkologie*, 2008, 21.1: 220-222.
44. TOMANOVÁ, B. *PCR v reálném čase a její využití v potravinářství*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická.
45. YAMAMOTO, K.; ENDO, S. Novel aldo-keto reductase AKR2E9 regulates aldehyde content in the midgut and antennae of the silkworm (*Bombyx mori*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2023, 112 (1).
46. YAMAMOTO, K.; YAMAGUCHI, M. a ENDO, S. Functional characterization of an aldose reductase (bmALD1) obtained from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*. 2020, 29 (5): 490-497.

47. YAMAMOTO, K.; HIGASHIURA, A.; SUZUKI, M.; SHIOTSUKI, T.; SUGAHARA, R. et al. Structural characterization of an aldo-keto reductase (AKR2E5) from the silkworm *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016, 474 (1): 104-110.
48. YAMAMOTO, K.; WILSON, D. K. Identification, characterization, and crystal structure of an aldo-keto reductase (AKR2E4) from the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013, 538 (2): 156-163.
49. GUO, H.; DEL CORSO, A.; HUANG, L-Q.; MURA, U.; PELOSI, P. et al. Aldehyde reductase activity in the antennae of *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*. 2014, 23 (3): 330-340.
50. LI, D.; DEWER, Y.; QU, C.; LI, F.; LUO, C. et al. Metabolomics Profiling and AKR Characterization During Paurometabolous Development of *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). *Journal of Insect Science*. 2019, 19 (6).
51. ROSA, J.; COX, C. J.; CANCELA, M. L. a LAIZÉ, V. Identification of a fish short-chain dehydrogenase/reductase associated with bone metabolism. *Gene*. 2018, 645: 137-145.
52. HUANG, Q.; CAO, J.; ZHOU, Y.; HUANG, J.; GONG, H. et al. Babesia microti Aldo-keto Reductase-Like Protein Involved in Antioxidant and Anti-parasite Response. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8.
53. GONZÁLEZ, L.; GARCÍA-HUERTAS, P.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; GARCÍA, G. A.; MURTA, S. M. F. et al. Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Microbiology*. 2017, 106 (5): 704-718.
54. ŠTĚRBOVÁ, K.; RYCHLÁ, N.; MATOUŠKOVÁ, P.; SKÁLOVÁ, L. a RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L. Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Veterinary Research*. 2023, 54 (1).

55. MATOUŠKOVÁ, P.; LECOVÁ, L.; LAING, R.; DIMUNOVÁ, D.; VOGEL, H. et al. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, 8 (3): 420-429.