

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd



**VYUŽITÍ TRANSKRIPTOMICKÉ ANALÝZY PRO  
STUDIUM LÉKOVÉ REZISTENCE HLÍSTIC**

Disertační práce

Mgr. Karolína Štěřbová

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

Konzultant disertační práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením své školitelky prof. RNDr. Lenky Skálové, Ph.D. a konzultantky doc. Ing. Petry Matouškové, Ph.D. 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

Mgr. Karolína Štěrbová

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za příležitost být již šest let součástí úžasné výzkumné skupiny. Děkuji za trpělivé a svědomité vedení, nadšení a přátelský přístup.

Děkuji doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za pomoc při osvojování metodiky, nespočet konzultací a podporu na vědeckých konferencích.

Mé poděkování patří také všem bývalým i současným členům Výzkumné skupiny pro studium mechanismů xenobiotické rezistence za odborné i přátelské rady, ochotu kdykoliv pomoci a vzájemnou podporu během studia.

Děkuji i celému kolektivu Katedry biochemických věd, především paní Aleně Pakostové za její starostlivost a příjemnou společnost u kávy a paní Bc. Blance Hynkové za pomoc s vyřizováním veškeré administrativy během studia.

Děkuji Dr. Anně Lespine za vřelé přijetí a odborné vedení po celou dobu stáže ve Francii.

Děkuji své rodině a partnerovi za jejich velkou podporu a trpělivost během mého studia.

Za finanční podporu děkuji Univerzitě Karlově (SVV 260 550 a SVV 260 664), Grantové agentuře Univerzity Karlovy (GAUK 194421, GAUK 156819), Grantové agentuře České republiky (GAČR 20-14581Y), Programu START (START/SCI/052) a Erasmu+.

# Abstrakt

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biochemických věd**

**Kandidát:** Mgr. Karolína Štěrbová

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

**Konzultant:** doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

**Název disertační práce: Využití transkriptomické analýzy pro studium lékové rezistence hlístic**

Haemonchóza, infekce přežvýkavců způsobená hlísticí *Haemonchus contortus*, negativně ovlivňuje zdravotní stav zvířat a živočišnou výrobu. Přestože jsou anthelmintika základním nástrojem k léčbě haemonchózy, jejich účinnost rapidně klesá v důsledku rozvoje lékové rezistence. Rychlejší inaktivace a eliminace léčiva podmíněné vyšší transkripcí enzymů metabolizujících xenobiotika (XME) patří k významným mechanismům rezistence. Informace o XME u *H. contortus* jsou však dosud omezené. Hlavním cílem této práce bylo rozšířit poznatky o mechanismu lékové rezistence u parazitické hlístice *H. contortus* se zaměřením na analýzu konstitutivní exprese vybraných XME během životního cyklu a porovnání změn v expresi mezi kmeny s odlišnou úrovní rezistence a po kontaktu s vybranými anthelmintiky. V genomu *H. contortus* bylo identifikováno 46 členů nadrodiny reduktáz/dehydrogenáz s krátkým řetězcem (SDR) a 22 členů aldo/ketoreduktáz (AKR), jejichž konstitutivní exprese byla analyzována ve vajíčkách, larvách i dospělých a porovnávána v kmeni citlivém a rezistentním na anthelmintika. Zvýšená exprese *akr19* v rezistentním kmeni a po kontaktu se subletálními dávkami flubendazolu (FLU) naznačuje možnou účast tohoto enzymu na lékové rezistenci. Bylo prokázáno, že i volně žijící stádia jsou schopna deaktivovat FLU a účinnější redukce byla pozorována u larev a samic rezistentního kmene. Sledování změn v expresi UDP-glykosyltransferáz (UGT) během životního cyklu ukázalo vyšší expresi většiny UGT v juvenilních stádiích oproti dospělým, přičemž *ugt368b2* se jeví jako vhodný kandidát pro další studie. Kontakt dospělců s albendazolem (ABZ) vedl k výrazné indukci několika XME, které mohou přispívat k účinnějšímu metabolismu anthelmintik. Vystavení volně žijících stádií subletálními dávkám ABZ během vývoje vyvolává změny v expresi genů UGT a Pgp, přičemž některé z těchto změn jsou stabilní během životního cyklu hlístic a přenášejí se do další generace.

# Abstract

**Charles University**  
**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**  
**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Mgr. Karolína Štěrbová

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

**Consultant:** doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

**Title of Dissertation Thesis: The use of transcriptomic analysis in study of drug-resistance in nematodes**

Haemonchosis, an infection of ruminants caused by the nematode *Haemonchus contortus*, negatively affects animal health and the economics of livestock production. Although anthelmintics are a basic tool in the treatment of haemonchosis, their efficacy is rapidly decreasing due to drug resistance development. Increased inactivation and efflux of anthelmintics associated with higher transcription of xenobiotic metabolizing enzymes (XME) belong to a significant drug-resistance mechanism. However, information about XME in *H. contortus* is still limited. The aim of this study was to increase knowledge about the mechanism of drug resistance in the parasitic nematode *H. contortus*, focusing on the analysis of constitutive expression of selected XME throughout the life cycle and comparing changes in expression between strains with different levels of resistance and after exposure to selected anthelmintics. In the genome of *H. contortus*, 46 members of short-chain reductases/dehydrogenases (SDR) and 22 members of aldo-keto reductases (AKR) were identified, whose constitutive expression was analyzed in eggs, larvae, and adults and compared in an anthelmintic-sensitive and resistant strain. Increased expression of *akr19* in the resistant strain and after contact with sublethal doses of flubendazole (FLU) suggests its potential involvement in drug resistance. Deactivation of FLU by free-living stages was demonstrated and more effective reduction was observed in larvae and females of the resistant strain. Analysis of changes in the expression of UDP-glycosyltransferases (UGT) throughout the life cycle showed a higher expression of most UGT in juvenile stages compared to adults, with *ugt368b2* as a suitable candidate for further investigation. Exposure of adults to albendazole (ABZ) led to a significant induction of several XME, which may contribute to more efficient anthelmintic metabolism. Exposure of free-living stages to sublethal doses of ABZ during development induces changes in UGT and Pgp gene expression, some of which are stable throughout the nematode life cycle and are transmitted to the next generation.

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Haemonchus contortus .....	9
2.1.1	Morfologie.....	10
2.1.2	Životní cyklus.....	10
2.1.3	Vývojová stádia.....	12
2.1.4	<i>H. contortus</i> jako modelový organismus .....	13
2.2	Anthelmintika.....	14
2.2.1	Mechanismus účinku.....	14
2.3	Biotransformace xenobiotik .....	16
2.3.1	Cytochromy P450.....	17
2.3.2	Reduktázy/dehydrogenázy .....	18
2.3.3	UDP-glykosyltransferázy .....	18
2.3.4	P-glykoproteiny .....	20
2.4	Biotransformace anthelmintik u hlístic.....	21
2.5	Anthelmintická rezistence .....	23
2.5.1	Mechanismus.....	24
2.5.2	Prevence .....	25
3	Cíle práce .....	27
4	Výsledky a diskuze .....	28
4.1	Změny v expresi vybraných biotransformačních enzymů <i>H. contortus</i> po kontaktu s anthelmintikem .....	28
4.2	Konstitutivní exprese UDP-glykosyltransferáz u volně žijících stádií <i>H. contortus</i> .....	30
4.3	Identifikace a charakterizace dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) v genomu <i>H. contortus</i> .....	32
4.4	Změny v redukci flubendazolu během životního cyklu <i>H. contortus</i> .....	34
4.5	Identifikace a charakterizace aldo-ketoreduktáz (AKR) v genomu <i>H. contortus</i> .....	36
4.6	Intragerační a intergerační stabilita změn v expresi vybraných enzymů..	38
5	Závěr .....	40
6	Seznam publikací vztahujících se k tématu práce a podíl autorky .....	42

7	Ostatní výstupy .....	45
7.1	Účast na vědeckých konferencích .....	45
7.2	Absolvované kurzy a zahraniční stáže .....	46
7.3	Řešené granty .....	47
8	Seznam zkratek .....	48
9	Použitá literatura .....	49

# 1 ÚVOD

*Haemonchus contortus* je jedním z nejrozšířenějších a nejproblematictějších gastrointestinálních parazitů hospodářských zvířat. Z původního osídlení Subsaharské Afriky se rozšířil téměř do celého světa a ročně infikuje stovky milionů přežvýkavců, což vede ke špatnému zdravotnímu stavu až úhynu zvířat a významným ekonomickým ztrátám jejich chovatelů (Emery et al., 2016).

Anthelmintika jsou celosvětově používaná léčiva a často jediná možnost v boji proti parazitickým červům. Dlouhodobé, nadměrné a nesprávné používání těchto léčiv však vede ke stále většímu počtu rezistentních jedinců i kmenů helmintů. Léková rezistence helmintů významně omezuje účinnost anthelmintické léčby. Nejzávažnější situace je zejména na jižní polokouli, na některých jihoafrických a australských farmách již není chov ovcí možný (Sutherland and Scott, 2010; Van Wyk et al., 1989). Rezistence některých helmintů na všechny skupiny anthelmintik však byla zaznamenána i v Evropě (Rose et al., 2015).

Výskyt rezistence u přežvýkavců byl jasným katalyzátorem mnoha výzkumů a *H. contortus* spolu s volně žijící *Caenorhabditis elegans* jsou nejrozsáhleji studované hlístice z pohledu mechanismu lékové rezistence. *H. contortus* prokázal vysokou schopnost vyvinout rezistenci vůči všem skupinám anthelmintik a v mnoha případech za méně než 10 let od jejich zavedení na trh (Lyndal-Murphy et al., 2014).

Dosud objevené mechanismy rezistence, ať už specifické či nespecifické, zahrnují modifikaci cílového místa léčiva, snížení počtu cílových míst a zvýšený metabolismus či eflux léčiva podmíněný vyšší expresí enzymů metabolizujících xenobiotika (XME) (James et al., 2009). Zvýšená aktivita XME vede k omezenému vstřebávání, rychlejší deaktivaci a usnadněné eliminaci anthelmintik, což se může projevit zvýšenou tolerancí na léčivo (Bartikova et al., 2015). Hlístice disponují relativně velkým množstvím genů XME a tudíž jsou schopny tvořit vyšší počet metabolitů léčiv a rychleji deaktivovat léčivo v porovnání s ostatními třídami helmintů (Matouskova et al., 2016).

Tato disertační práce rozšiřuje poznatky o mechanismu rezistence u parazitické hlístice *H. contortus* se zaměřením na změny v expresi vybraných XME během životního cyklu a po kontaktu s vybranými anthelmintiky.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Haemonchus contortus*

*H. contortus*, česky vlasovka slezová, je endogenní parazit řadící se do kmene *Nematoda* (hlístice) a čeledi *Trichostrongylidae*. Z původního osídlení Subsaharské Afriky se rozšířil téměř do celého světa, čemuž v minulosti napomohl obchod se zvířaty a klimatické změny. Kombinace genetické přizpůsobivosti, vysoké patogenity, krátkého generačního intervalu a plodnosti zajistila úspěšnou adaptaci na nejrůznější podmínky prostředí, hostitele i kontakt s léčivou (Ballweber, 2001; Emery et al., 2016).

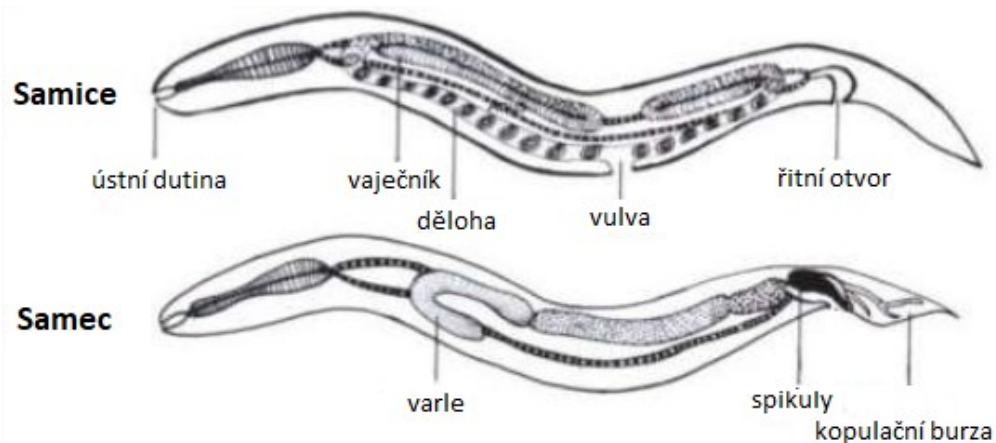
*H. contortus* infikuje ročně stovky milionů přežvýkavců, především ovce, kozy a v menší míře i divokou zvěř, což vede k významným ekonomickým ztrátám (Naeem et al., 2020). Dospělá stádia parazitují ve slezu přežvýkavců a živí se krví z kapilár žaludeční stěny, což způsobuje akutní i chronické onemocnění zvané haemonchóza. Závažnost onemocnění závisí na počtu pozřených larev, stáří hostitele, úrovni imunity a nutričním stavu. Nejvíce ohrožena jsou mláďata a zvířata s nedostatečnou výživou (Saccareau et al., 2017). Klinické znaky infekce zahrnují letargii, slabost, zvýšenou srdeční a dechovou frekvenci, ztrátu vlny či srsti, anemii a bledé sliznice. Rozsáhlé poškození sliznice vyvolává změny v žaludeční sekreci a hladině gastrointestinálních hormonů v plazmě, což má za následek ztrátu chuti k jídlu. Nedostatek albuminu související se ztrátou krve (10 000 červů vysaje až 500 ml krve denně) vede k akumulaci tekutiny ve stěně slezu a otoku končetin, manifestující v submandibulární otok. V nejtěžších případech může dojít k úmrtí zvířete z důvodu nedostatku plazmatických bílkovin a železa (Besier et al., 2016; Carson et al., 2023; Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016). Nejběžněji však dochází k úmrtí zvířat se smíšenou infekcí více druhů gastrointestinálních hlístic, přestože osídlení slezu jinými parazity výrazně potlačuje populaci *H. contortus* (Emery et al., 2016).

*H. contortus* byl v průběhu let schopen vyvinout odolnost vůči všem dostupným anthelmintikům, což z něj činí dobrý modelový organismus pro studium mechanismu lékové rezistence (Gilleard, 2013). Pro studium rozdílných genetických a fenotypových variant tohoto parazita byly cíleně vyšlechtěny laboratorní kmeny, které se dále udržují skrze pravidelnou umělou infekci hostitele a sběru larválních stádií (Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016). Mezi často používaný se řadí citlivý kmen SE (Susceptible Edinburgh), který byl izolován před léčbou anthelmintiky. Postupným

křížením a selekčním tlakem benzimidazolovými anthelmintiky byl selektován citlivý kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) a kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika IRE (Inbred Resistant Edinburgh) (Roos et al., 2004).

### 2.1.1 Morfologie

Dospělí jedinci *H. contortus* mají zužující se válcovité tělo o velikosti 10–30 mm. Povrch těla je kryt kutikulou, která zajišťuje ochrannou funkci. Trávicí soustava je úplná, tvořená ústní dutinou, jícnem, střevem a análním otvorem. K narušení žaludeční sliznice používají ústní kapslu obsahující kyjovitý zub. Typický vlnivý pohyb je umožněn vrstvou podélných svalových vláken uložených pod kutikulou. Samice jsou větší a nápadně pruhované, jelikož se jejich reprodukční systém obtáčí okolo střeva s krví. Poznávacím znakem samců je menší velikost a kopulační burza na konci těla (Horák and Scholz, 1998; Kuchai et al., 2012; Naeem et al., 2020; Widiarso et al., 2018).



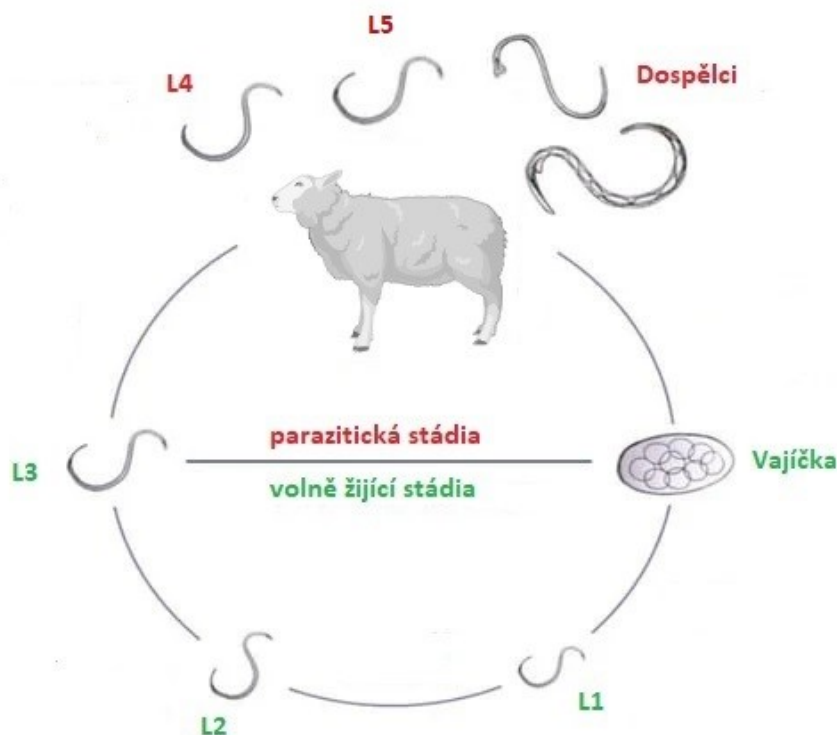
**Obrázek 1 - Morfologie samice a samce *H. contortus* (Urguhart et al., 1996)**

### 2.1.2 Životní cyklus

*H. contortus* projde celým životním cyklem za cca 20 dní, má tedy nejkratší životní cyklus ze všech gastrointestinálních hlístic (Emery et al., 2016). Samice je schopna vyprodukovat 5000 až 15000 vajíček denně, která jsou vylučována spolu s trusem hostitele (Carson et al., 2023). V ideálních podmínkách se z vajíčka vyvíjí 1. a 2. larvální stádium (L1 a L2) až do infekčního 3. larválního stádia (L3), což trvá přibližně 1-2 týdny. Životnost volně žijících stádií závisí především na klimatických podmínkách, vlhkosti a slunečním záření (Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016). Následně je infekční

larva pozřena spolu s pastvou přežvýkavcem. V bacheru přežvýkavce se vlivem změny okolních podmínek larva L3 svléká (xL3) a postupuje dále do slezu, kde se vyvíjí ve 4. larvální stádium (L4). Další svlékání L4 ve slezu je některými zdroji označováno jako 5. larvální stadium (L5) (Flay et al., 2022). Během této doby dochází k tvorbě tzv. kyjovitého zubu s jehož pomocí dojde k narušení žaludeční sliznice a vyvolání krvácení. L5 se pohlavně diferencují v dospělé, kteří se dále živí krví hostitele (O'Connor et al., 2006; Schwarz et al., 2013).

Jako ochrana před aktivovanou imunitou hostitele z důvodu silné nákazy může L4 potlačit další vývoj a přežít v tzv. hypobioze volně přichycena ke sliznici slezu. Pravděpodobně vymíráním dospělců během zimy a následnému snížení imunitní odpovědi podpořené stresem z porodu dojde během jara k obnovení vývoje *H. contortus* v hostiteli a další vlně haemonchózy. Existují i případy tzv. zimní haemonchózy, kdy k obnovení vývinu hypobiotických larev došlo předčasně (Carvalho et al., 2023; Gatongi et al., 1998; Gibbs, 1964).



**Obrázek 2 - Vývojový cyklus *H. contortus***

### 2.1.3 Vývojová stádia

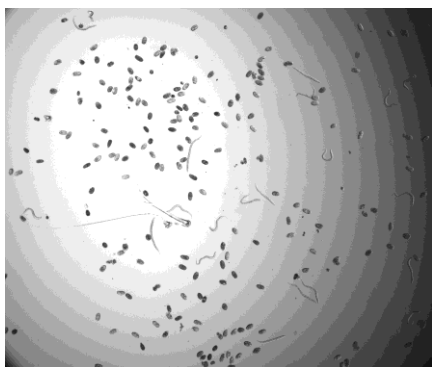
Jelikož se *H. contortus* během svého života setká s aerobním i anaerobním prostředím, musí se jednotlivá vývojová stádia přizpůsobovat okolním podmínkám. Tato adaptace vyžaduje změny v genové transkripci, které mají významný vliv na metabolismus.

Vajíčka jsou z hostitele vylučována spolu s trusem. Ke správnému vývinu vyžadují teplotu 10–40°C, při teplotách pod bod mrazu přežijí pouze 24 hodin (O'Connor et al., 2006). Jelikož nepřijímají žádnou vnější potravu, čerpají energii pouze z vlastních zásob živin získaných od dospělých jedinců. Ve vajíčkách je zvýšená transkripce genů ovlivňujících apoptózu, vývoj, replikaci DNA a stavbu chromozomů (Laing et al., 2016). Vývin L1 – L2 probíhá stále v trusu hostitele, ze kterého požírají organický materiál a bakterie. Během vývinu dochází ke zvýšení exprese genů spojených s vývojem svalů a motorickou aktivitou.

Infekční L3 jsou nejodolnějším volně žijícím stádiem schopným přežít delší časové období. V ideálních podmínkách migrují z trusu do půdy. Jsou schopny laterálního i vertikálního pohybu po jednotlivých stéblech pastvy a zvyšují tak šance na pozření hostitelem. Míra vlhkosti určuje do značné míry rychlost a vzdálenost migrace, proto dochází k hromadnému uvolňování larev během dešťů z vysušeného trusu, který slouží jako rezervoár (van Dijk and Morgan, 2011). Infekční larvální stádia již nepřijímají potravu a využívají pouze své zásoby živin. Při nepříznivých podmínkách pozastavují aktivitu a dochází k poklesu transkripce genů pro metabolické dráhy sacharidů, lipidů a tvorby energie (Barger, 1999; Laing et al., 2016).

Při přechodu ze stádia L3 do L4 jsou larvy ovlivněny především rapidní změnou podmínek. Vlivem teplotního šoku a zvýšeného obsahu oxidu uhličitého svlékají kutikulu. Při přechodu přes bachor jsou vystaveny relativně vysokému pH, naopak pH slezu je podstatně nižší (Ash, 1959). L5 je první stádium živící se krví hostitele. Zvyšuje se transkripce genů spojených s metabolismem lipidů, sacharidů a bílkovin.

Dospělý jedinci mají obvykle bohatý zdroj potravy v hostiteli. Metabolismus je výrazně ovlivněn vysokou koncentrací oxidu uhličitého ve slezu. Anaerobní degradace sacharidů zajišťuje dostatek energie pro produkci vajíček a komplexní regulaci nervosvalového systému. Ke zvýšení exprese dochází u genů potřebných k embryogenezi a tvorbě spermií (Laing et al., 2016).



**Obrázek 3 - Vajíčka a L1 *H. contortus***  
(zdroj: foto Thuy Linh Zima)



**Obrázek 4 - Dospělci *H. contortus***  
(zdroj: foto Ivan Vokřál)

#### 2.1.4 *H. contortus* jako modelový organismus

Existuje celá řada důvodů, proč je *H. contortus* vhodným modelovým organismem pro výzkum lékové rezistence helmintů. Jelikož se jedná o parazita převážně ovcí a koz, je možné k experimentální práci využít přirozeného hostitele. Výhodou je životní cyklus bez mezihostitelů, velikost dospělců a vysoká plodnost parazita, což zajišťuje dostatečné množství materiálu (Coyne and Smith, 1992). Relativně jednoduché metody izolace a kultivace L3 i dospělců, možnost skladování L3 po delší dobu a udržování linie opětovným nakažováním hostitele jsou výhodami práce s *H. contortus* jako vhodným modelovým organismem (Gill and Redwin, 1995).

Další klíčovou předností *H. contortus* je jeho relativně úzká fylogenetická příbuznost s volně žijící hlísticí *C. elegans* (Blaxter et al., 1998). Díky tomu lze *C. elegans* využít jako heterologní systém pro funkční expresi genů *H. contortus* (Gilleard, 2004). Ve srovnání s *C. elegans* je však práce s *H. contortus* podstatně složitější i finančně nákladnější, avšak je třeba mít na zřeteli, že *H. contortus* je parazitickou hlísticí ve srovnání s volně žijící *C. elegans*. Řada fyziologických pochodů i námi studované mechanismy lékové rezistence se u parazitických a volně žijících hlístic mohou zásadně lišit.

## 2.2 Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva působící proti parazitickým červům. Rozdělují se do několika skupin dle jejich struktury a mechanismu účinku, obecně se však jedná o přípravky s vermucidním či vermifugním účinkem. Vermucidní anthelmintika parazita přímo zabíjí, naopak vermifugní je pouze paralyzují a zjednodušují tak jejich vylučování z těla hostitele (Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016).

K dispozici je řada anthelmintik, ovšem stále rostoucí počet rezistentních jedinců významně omezuje jejich účinnost. Proto se stále častěji přistupuje k používání kombinace léčiv, což zajišťuje vyšší účinnost i vůči rezistentním kmenům a zároveň snižuje míru selekce (Playford et al., 2014).

Existují různé strategie pro léčbu helmintózy. Nejběžnější je pravidelná anthelmintická terapie celého stáda. Tento postup však omezuje rozvoj imunity u hostitelů a zároveň podněcuje rozvoj rezistence u parazitů. Alternativním přístupem je cílená selektivní léčba pouze nakažených zvířat. Tato metoda je šetrnější, avšak složitě proveditelná z hlediska testování a léčení každého zvířete individuálně (Calvete et al., 2020; Kenyon and Jackson, 2012).

Ideální anthelmintikum je selektivně toxické pouze pro parazita, nikoliv hostitele, neindukuje rezistenci, je levné, efektivní, jednoduše použitelné a bezpečné pro životní prostředí.

### 2.2.1 Mechanismus účinku

Benzimidazoly (albendazol, flubendazol, mebendazol, fenbendazol atd.), imidazothiazoly (levamisol), makrocyclické laktony (ivermektin, doramektin, moxidektin), salicylanilidy (klosantel), tetrahydropyrimidiny (pyrantel, morantel) a deriváty aminoacetonitrilu (monepantel) jsou hlavní skupiny léčiv používané k léčbě helmintóz přežvýkavců, včetně haemonchózy. Účinnost většiny anthelmintik závisí na jejich afinitě k cílovým receptorům, ale také na farmakokinetických vlastnostech, které usnadňují dosažení účinných koncentrací léčiva v místě účinku (Thompson et al., 1993). Benzimidazoly vstoupily na trh od 60. let minulého století. Tato skupina léčiv zahrnuje většinu nejčastěji používaných anthelmintik k léčbě helmintóz u koní, přežvýkavců, ale i psů a koček (Bill, 1995). Jejich mechanismus účinku spočívá v navázání na strukturální protein  $\beta$ -tubulin a jeho následné rozvinutí. Tato abnormální struktura smyčky zabraňuje dalšímu přidávání  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek tubulinu a následné polymeraci mikrotubulů. Tím

dochází k narušení funkce na buněčné úrovni, což má za následek poruchu dělení buněk, motility, buněčné sekrece, absorpce živin a intracelulární transport (McKellar and Jackson, 2004). Díky výrazné strukturální odlišnosti  $\beta$ -tubulinu hlístic oproti jiným organismům jsou léčiva ze skupiny benzimidazolů pro hostitelská zvířata bezpečná. Do těla parazitů se dostávají přes trávicí trakt, jelikož nemohou být absorbovány skrze kutikulu (Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016). U přežvýkavců působí bachor jako rezervoár léčiv, která se rozpouští především ve slezu následkem nízkého pH (Lanusse and Prichard, 1993). Vzhledem k jejich dlouhodobému a častému používání je rezistence vůči benzimidazolům celosvětově rozšířena již řadu let (McKellar and Jackson, 2004).

Makrocyclické laktony jsou vysoce účinná anthelmintika proti dospělým i larválním stádiím většiny gastrointestinálních a plicních hlístic. Prodloužená doba účinku je dána jejich lipofilní strukturou a setrváváním ve slizničních tkáních trávicího traktu (Martin, 1997). Do těla parazita se vstřebávají skrze kutikulu a váží se na chloridové kanály. To způsobí ireverzibilní otevření těchto kanálů, depolarizaci buňky a paralýzu hltanu, tělní stěny a děložních svalů (Bill, 1995; Lubega and Prichard, 1991). Nervová soustava savců je před toxickými účinky makrocyclických laktonů částečně chráněna absencí specifických glutamát-chloridových kanálů a hematoencefalickou bariérou (Svobodová and Svoboda, 1995).

Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny sdílí stejný mechanismus účinku spočívající v aktivaci nikotin-acetylcholinových receptorů ve svalové stěně hlístic, což má za následek spastickou paralýzu a snadnější uvolnění dospělých parazitů z těla hostitele. Nejrozšířenější z této skupiny léčiv je levamisol, ačkoliv se v některých zemích spíše používá k odčervení ovcí morantel (Nielsen and Rasmussen, 1983).

Jediným zástupcem skupiny amino-acetonitrilových derivátů je monepantel, který se na trh dostal v roce 2000. Jeho mechanismus účinku je zcela odlišný od ostatních anthelmintik a spočívá ve vazbě na nikotin-acetylcholinový receptor *mptl-1*, který je přítomen pouze u hlístic (Kaminsky et al., 2008).

## 2.3 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé sloučeniny, které nemohou sloužit jako zdroj energie ani jako prekurzory pro další biomolekuly. Může se jednat o léčiva, toxiny, potravinářské přídatné látky, kontaminanty životního prostředí aj. Ve všech organismech se vyvinuly sofistikované detoxifikační systémy, zajišťující metabolismus potenciálně toxických xenobiotik (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2008).

Metabolismus xenobiotik zahrnuje jejich biotransformaci a transport. Obecně platí, že biotransformace probíhá ve dvou fázích. Reakce I. fáze (oxidace, redukce či hydrolyza) vedou většinou k připojení nebo odkrytí hydrofilní skupiny. Ve II. fázi podléhá původní parentní látka či její metabolity konjugačním reakcím s endogenními sloučeninami. Aktivní transport substrátů, metabolitů a konjugátů přes membrány, zajišťovaný proteinovými transportéry, je považován za III. fázi metabolismu xenobiotik. Metabolismus xenobiotik je katalyzován enzymy metabolizujícími xenobiotika (XME), jejichž výskyt a aktivita zásadně ovlivňují biologický účinek (žádoucí i nežádoucí) cizorodé látky (Bartikova et al., 2015).

Hlístice disponují relativně velkým množstvím genů XME a tudíž jsou schopny tvořit vyšší počet metabolitů a rychleji metabolizovat xenobiotikum v porovnání s ostatními třídami helmintů (Matouskova et al., 2016).

Mezi nejdůležitější enzymy zapojené do reakcí I. fáze patří cytochromy P450 (CYP). Jedná se o širokou nadrodinu hemoproteinů, které běžně katalyzují monooxygenaci, ale jsou také schopny působit jako peroxidázy či reduktázy. Flavinové monooxygenázy jsou podstatně méně zastoupenou skupinou XME preferující substráty obsahující atomy dusíku, síry a fosforu (Skalova et al., 2011). Alkoholy, aldehydy a ketony jsou často metabolizovány reduktázami/dehydrogenázami. Redukce je méně častá reakce než oxidace, ovšem pro některá xenobiotika může představovat hlavní metabolickou dráhu (Jez and Penning, 2001). UDP-glykosyltransferázy (UGT) a glutathion-S-transferázy (GST) představují hlavní konjugační enzymy II. fáze biotransformace. ABC transportéry zprostředkovávají přenos xenobiotik skrze lipidovou dvojvrstvu ven z buňky. Transportní proces je iniciován interakcí se substrátem, následovaný vazbou ATP, která vyvolává konformační změny vedoucí k přenosu substrátu. Nejvýznamnějším ABC transportérem z hlediska přenosu léčiv je P-glykoprotein (Linton and Higgins, 2007).

V genomu *H. contortus* bylo zatím nalezeno 42 genů CYP, 70 genů SDR, 24 genů AKR, 28 genů GST, 34 genů UGT a 46 genů ABC transportérů (Matouskova et al., 2016).



### 2.3.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou velkou nadrodinou hemoproteinů nacházející se téměř ve všech živých organismech (Nelson et al., 1993). CYP katalyzují širokou škálu reakcí zahrnujících endogenní i exogenní substráty. Podílejí se na metabolismu cholesterolu, steroidních hormonů, vitamínů, mastných kyselin, eikosanoidů a žlučových kyselin, ale hrají i klíčovou roli v biotransformaci xenobiotik, včetně léčiv (Nelson et al., 1993; Skalova et al., 2011). Od roku 1989 jsou klasifikovány na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci. Proteiny s více než 40% identických sekvencí spadají do jedné rodiny a označují se první číslicí za zkratkou. Pokud je podobnost AMK sekvencí vyšší než 55%, řadí se do jedné podrodiny označované velkým písmenem. Poslední číslo v názvu udává konkrétní izoformu proteinu (Larigot et al., 2022). CYP jsou tvořeny apoproteinem a protoporfyrinem IX obsahujícím železo. Jejich monooxygenázová aktivita zajišťuje štěpení molekuly kyslíku a následnou vazbu jednoho atomu kyslíku na substrát a druhého do molekuly vody. Nezbytným účastníkem této reakce je NADPH-CYP-reduktáza, v případě helmintů je kódována genem *emb-8* (Hartman et al., 2021; McDonnell and Dang, 2013). Enzymy CYP napomáhají přeměně substrátu na více hydrofilní metabolit, ovšem v některých případech může dojít k tvorbě toxického, více reaktivního metabolitu (Guengerich, 2006).

Genom *C. elegans* obsahuje geny pro nejméně 86 CYP, včetně čtyř rodin, které jsou indukovatelné xenobiotiky (CYP31, CYP33, CYP34, CYP35) (Laing et al., 2010; Menzel et al., 2001; Menzel et al., 2005). U *H. contortus* byly prokázány identické CYP, ovšem na rozdíl od *C. elegans* postrádá rozsáhlé duplikace těchto genů (Laing et al., 2015). Většina genů CYP je u *H. contortus* exprimována ve střevě. Vyšší aktivita těchto enzymů v larválních stádiích odráží jejich nezbytnou roli v detoxikaci exogenních látek z životního prostředí (Laing et al., 2015).

### 2.3.2 Reduktázy/dehydrogenázy

Reduktázy jsou NAD(P)H-dependentní enzymy přítomné ve všech genomech, od jednoduchých mikroorganismů až po vyšší eukaryota (Barski et al., 2008; Persson et al., 2009). Redukční biotransformace xenobiotik se obecně vyskytují méně často než oxidační, v případě ketonů, aldehydů, chinonů, nitrosloučenin, aminoroxidů a sulfoxidů však mohou představovat hlavní metabolickou dráhu. Redukční enzymy karbonylových sloučenin můžeme klasifikovat do tří tříd: dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-keto reduktázy (AKR) (Pallotto et al.; Penning, 2015). Enzymy SDR sdílejí společný sekvenční motiv definující vazebné místo kofaktoru (TGxxxGxG) a katalytickou tetradu aminokyselin (Tyr, Lys, Asn, Ser), ovšem jejich celková podobnost je pouze 15-30 % (Persson et al., 2009). Místo vazby substrátu je vysoce variabilní, což umožňuje metabolismus široké škály substrátů včetně steroidů, alkoholů a aromatických sloučenin (Jornvall et al., 1995). AKR jsou monomerní rozpustné proteiny charakteristické nízkou substrátovou selektivitou a  $(\beta/\alpha)_8$  soudkovým motivem (Barski et al., 2008). MDR je velká nadrodina enzymů, dále dělena do několika rodin. Nejvíce prozkoumána je rodina AKR, zodpovědná za detoxikaci alkoholů, aldehydů a žlučových kyselin (Jörnvall et al., 2000; Marschall et al., 2000). Další rodiny reduktáz/dehydrogenáz zahrnují například polyoldehydrogenázy, chinonoxireduktázy, mitochondriální proteiny dýchacího řetězce, acetylkoenzym A-reduktázy a leukotrien B<sub>4</sub>-dehydrogenázy (Nordling et al., 2002).

Většina redukčních enzymů je lokalizována v cytosolu, ale mohou se vyskytovat i v endoplazmatickém retikulu či membránách mitochondrií (Barski et al., 2008; Oppermann, 2007).

V případě hlístic jsou informace o redukčních enzymech velmi omezené, přestože jsou prokazatelně zapojeny do metabolismu anthelmintik (Stuchlikova et al., 2018; Vokral et al., 2012). V subcelulárních frakcích *H. contortus* byla detekována reduktázová aktivita vůči několika modelovým substrátům (D-L-glyceraldehyd, daunorubicin, acenaftenol, metyrapon, oracin) (Cvilink et al., 2008) a schopnost dospělých hlístic redukovat anthelmintikum flubendazol (Stuchlikova et al., 2018).

### 2.3.3 UDP-glykosyltransferázy

Glykosyltransferázy (GT) jsou enzymy II. fáze biotransformace, které katalyzují přenos monosacharidových jednotek z nukleotidem aktivovaného donoru na specifické

akceptorové molekuly, čímž zvyšují jejich hydrofilitu a dostupnost pro efluxní transportéry (Hashimoto et al., 2009). Přestože jsou akceptory velmi různorodé, monosacharidy jsou obvykle vázány na nukleosidmonofosfát či nukleosiddifosfát (NDP), např. uridindifosfát (UDP), guanosindifosfát a cytidinmonofosfát (Thorsoe et al., 2005). U eukaryot se ve většině glykosylačních reakcí uplatňuje jako donor pouze 10 různých NDP-cukrů (např. UDP-glukuronová kyselina, UDP-glukóza, UDP-xylóza či UDP-N-acetylglukosamin), kdežto u prokaryotických organismů jsou tyto donory mnohem rozmanitější (Thorson et al., 2001). Dosud byly GT klasifikovány do 92 rodin s více než 50 000 geny kódujícími tyto enzymy izolované z různých rostlinných, živočišných, houbových a prokaryotických organismů (Malik and Black, 2012).

UDP-glykosyltransferázy (UGT) tvoří více než 60% všech GT, které byly dosud charakterizovány (Hu and Walker, 2002). UGT obratlovců mají délku okolo 530 aminokyselin, z toho minimálně 40% je sekvenčně identických (Osmani et al., 2009). Jedná se o proteiny skládající se z N-koncové domény, transmembránové části a C-koncové domény. Dle strukturního rozdělení se UGT řadí do skupiny GT-A, kde N-doména rozpoznává donor sacharidu a C-doména obsahuje vazebné místo pro akceptor nebo GT-B, kde je tomu právě naopak (Qasba et al., 2005).

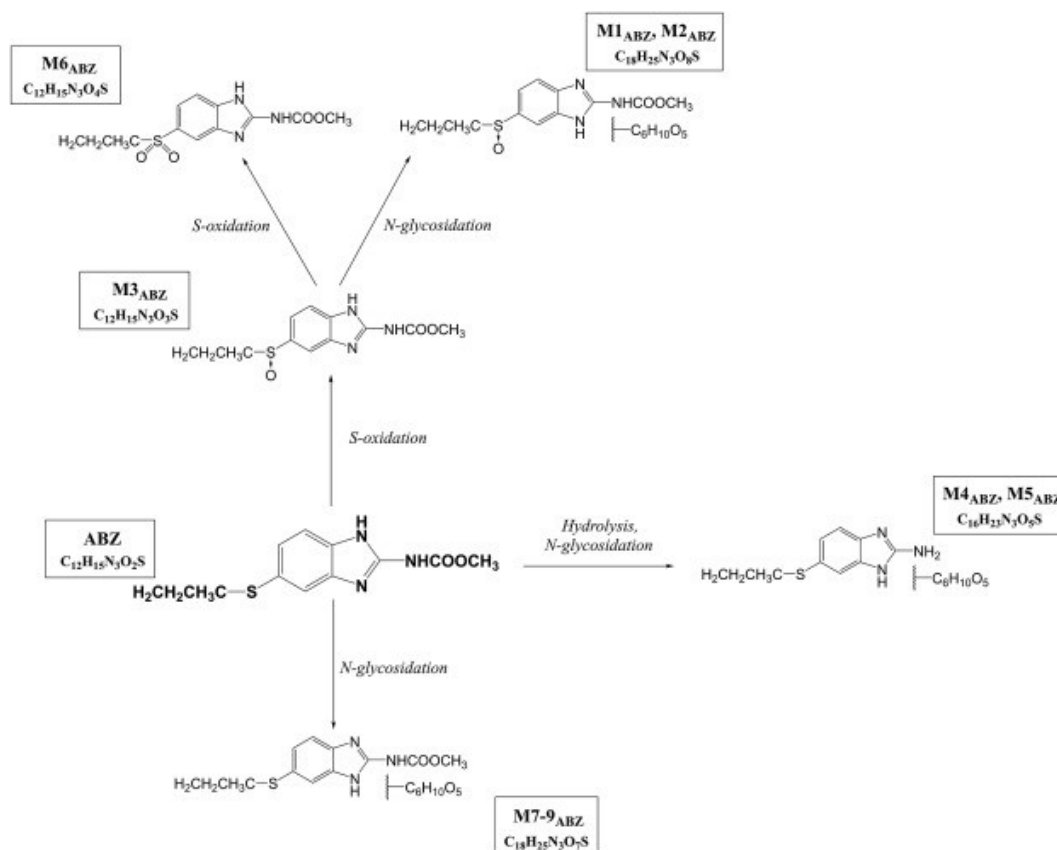
UGT jsou klíčové pro metabolismus velkého množství endogenních, ale i exogenních sloučenin, včetně toxinů a karcinogenů z životního prostředí, léčiv a složek potravy. Každý enzym UGT může konjugovat řadu různých sloučenin a zároveň mezi jednotlivými enzymy dochází ke značnému překryvu v substrátové selektivitě (Hu et al., 2019). Zatímco u savců převládají reakce s UDP-glukuronovou kyselinou (glukuronidace), rostliny, bakterie a bezobratlí živočichové využívají spíše UDP-hexózu (např. UDP-glukózu) (Bock, 2016). Glykosylace je také hlavní deaktivací cestou benzimidazolových anthelmintik u *C. elegans* a *H. contortus* (Laing et al., 2010). Kvalitativní i kvantitativní rozdíly glykosylace ABZ a FLU byly pozorovány i mezi odlišným pohlavím *H. contortus*, což dokazuje sex-diferenci v expresi UGT (Stuchlikova et al., 2018).

### 2.3.4 P-glykoproteiny

Přenašeče (transportní proteiny, transportéry) jsou membránově vázané proteiny umožňující přechod látek skrze lipidovou dvojvrstvu. Podle směru membránového transportu je můžeme dělit na přenašeče zajišťující vstup xenobiotika do buňky (např. OATP) a ty, které zajišťují aktivní eflux xenobiotika ven z buňky (ABC). ABC transportéry se nacházejí v buňkách všech organismů a z hlediska lékové rezistence jsou zkoumány nejvíce (Linton and Higgins, 2007). Výzkum transportů léčiv byl zaměřen především na P-glykoprotein (Pgp, ABCB1), nejlépe prostudovaný ABC transportér podílející se na metabolismu léčiv. První Pgp u helmintů byl identifikován v *C. elegans* (Lincke et al., 1992), poté byly geny Pgp nalezeny i u *S. mansoni*, *F. hepatica* a *H. contortus* (Kerboeuf et al., 2003). Pomocí specifických monoklonálních protilátek bylo možno lokalizovat tyto proteiny v tkáni helmintů. U *H. contortus* byl Pgp detekován převážně podél trávicího traktu, nejintenzivněji v hltanu a na začátku střeva (Smith and Prichard, 2002). Ve studii (Bartley et al., 2009) byla prokázána několikanásobně zvýšená citlivost k ivermektinu u L1 *H. contortus* pomocí inhibice Pgp. Tyto údaje mohou naznačovat ochranou funkci Pgp u vývojových stádií před expozicí xenobiotik z životního prostředí včetně anthelmintik. Řada studií poukázala na zvýšenou expresi genů Pgp i u dospělých jedinců *H. contortus*, převážně v kmeni rezistentním na ivermektin (Janssen et al., 2015; Williamson et al., 2011)

## 2.4 Biotransformace anthelmintik u hlístic

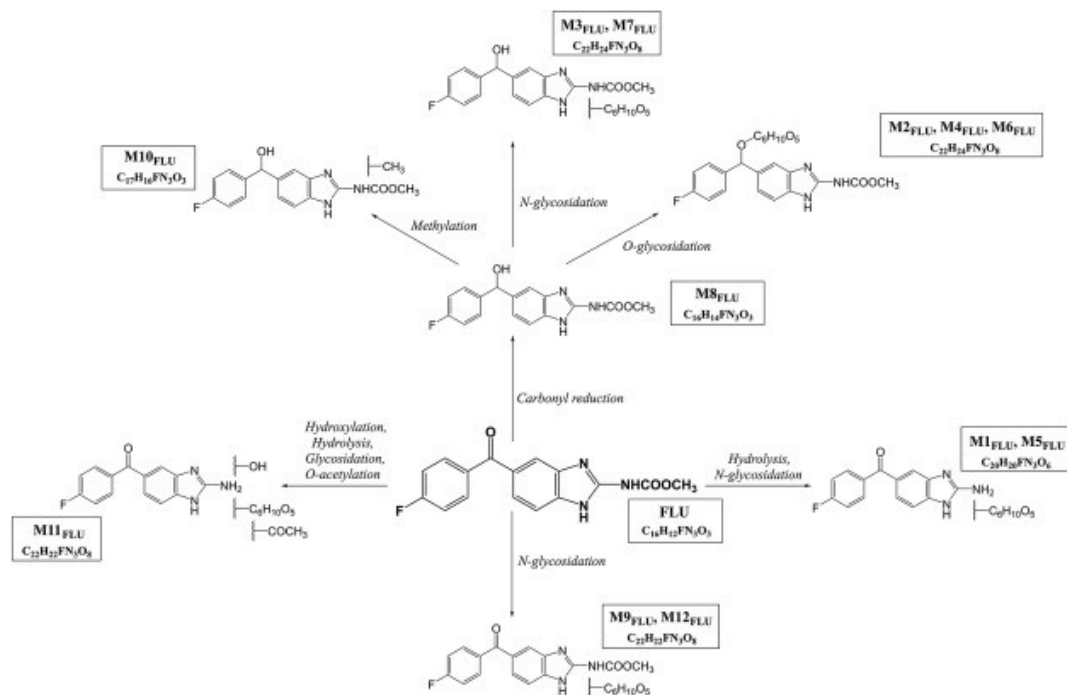
Několik studií potvrdilo, že hlístice jsou schopny metabolizovat určité exogenní sloučeniny, včetně anthelmintik. Ne všechna dostupná anthelmintika však byla z tohoto pohledu studována a rovněž znalost velké části metabolických drah zůstává neúplná. Biotransformace albendazolu (ABZ) byla studována u několika helmintů, včetně *H. contortus*. V I. fázi byl ABZ metabolizován prostřednictvím S-oxidace na aktivní metabolit ABZ-sulfoxid (ABZ-SO, ricobendazol) a poté na neaktivní ABZ-sulfon (ABZ-SO<sub>2</sub>). Ve II. fázi byla u *H. contortus* i *C. elegans* zaznamenána pouze N-glykosidace ABZ, ABZ-SO i ABZ-SO<sub>2</sub> (Laing et al., 2010; Stuchlikova et al., 2018; Vokrál et al., 2013).



Obrázek 5 - Metabolismus ABZ u *H. contortus* (Stuchlikova et al., 2018)

Přestože se flubendazol (FLU) používá pouze k léčbě helmintóz monogastričních druhů zvířat, jeho účinek byl potvrzen i na *H. contortus* (Bartikova et al., 2010). Na rozdíl od několika metabolitů tvořených v I. fázi biotransformace FLU u ovcí byl při studiu biotransformace FLU u *H. contortus* nalezen jediný produkt I. fáze, redukovaný FLU

(FLU-R). FLU i FLU-R byl dále metabolizován N-glykosidací, O-glykosidací, O-acetylací i metylací (Krizova et al., 2009; Stuchlikova et al., 2018; Vokral et al., 2012). Hydrolyzá nitrilu byla u hlístic poprvé popsána při studiu biotransformace monepantelu (MOP). Kromě hydrolytických reakcí byla u *H. contortus* potvrzena také oxidace MOP. Na rozdíl od ovcí však *H. contortus* netvořil žádné metabolity II. fáze (Stuchlikova et al., 2014).



**Obrázek 6 - Metabolismus FLU u *H. contortus* (Stuchlikova et al., 2018)**

Zatímco výše zmíněná anthelmintika byla u hlístic biotransformována na řadu metabolitů, *C. elegans* ani *H. contortus* nejsou schopni metabolizovat ivermektin a klosantel (Laing et al., 2012; Rothwell and Sangster, 1997; Vokral et al., 2013).

Biotransformace anthelmintik u helmintů je obecně těžko předvídatelná. Navíc metabolismus těchto léčiv se může výrazně lišit i mezi jednotlivými druhy. U helmintů byly rovněž popsány některé typy biotransformačních reakcí (methylace FLU, glykosidace ABZ a FLU, hydrolyzá MOP), které se nevyskytují u savčích hostitelů (Cvilink et al., 2009; Stuchlikova et al., 2014; Vokral et al., 2012; Vokral et al., 2013).

## 2.5 Anthelmintická rezistence

Anthelmintická rezistence je hlavní problém kontroly infekce parazitickými hlísticemi a významně omezuje živočišnou výrobu a zdraví zvířat v mnoha částech světa. Nejzávažnější situace je zejména na jižní polokouli, kde již není na některých jihoafrických a australských farmách chov ovcí možný (Sutherland and Scott, 2010; Van Wyk et al., 1989), ale rezistence na všechny skupiny anthelmintik byla zaznamenána v celé Evropě (Rose et al., 2015).

Obecně je léková rezistence helmintů definována jako pokles účinnosti anthelmintik v populaci parazitů, která byla původně k léčivu citlivá (Sangster and Gill, 1999). Coles a jeho spolupracovníci definovali rezistenci dle kritérií Světové asociace pro rozvoj veterinární parazitologie (WAAVP) jako procentuální snížení počtu vajíček v trusu po léčbě anthelmintiky, které je <95% (Coles et al., 1992). Jelikož se ke stanovení rezistentních jedinců začaly používat i jiné testy, byla definice rozšířena o tzv. diskriminační dávku, což je dávka léčiva, která zabrání vylíhnutí 99% vajíček z původně citlivé populace (Coles et al., 2006). Toto stanovení však lze použít pouze pro anthelmintika s ovicidním účinkem.

Dosavadní znalosti o faktorech, které mají vliv na vznik rezistence naznačují, že parazité s krátkým a přímým životním cyklem si vyvinou rezistenci na léčivo s větší pravděpodobností než parazité se složitějším životním cyklem, z důvodu environmentální selekce během jednotlivých fází (Sangster and Gill, 1999). Tato teorie platí i pro *H. contortus*, který prokázal vysokou schopnost vyvinout rezistenci vůči všem skupinám anthelmintik a v mnoha případech za méně než 10 let od jejich zavedení na trh. Byly zaznamenány i případy multirezistence na anthelmintika s různým mechanismem účinku (Lyndal-Murphy et al., 2014). Časný výskyt rezistence byl katalyzátorem mnoha výzkumů a *H. contortus* spolu se *C. elegans* se staly nejrozsáhleji studovanými hlísticemi z pohledu mechanismu rezistence (Gasser and von Samson-Himmelstjerna, 2016).

Rezistence helmintů na anthelmintika je velkým celosvětovým problémem, proto je nutné identifikovat faktory a mechanismy jejího vzniku, aby bylo možné zachovat či alespoň prodloužit anthelmintickou účinnost u nově vyvinutých léčiv.

Důvodů vzniku rezistence je několik. Mezi nejčastější patří nedodržení správné dávky léčiva a nereflektování vývojového cyklu parazita. K podání dávky nižší, než je terapeutická, dochází často v důsledku průměrování hmotnosti celého stáda, což mnohdy nereflektuje skutečnou hmotnost jednotlivců (Emery et al., 2016). Někdy se preventivně

používá dávka nižší, než je dávka doporučena k léčbě. Parazit je schopen tuto dávku přežít a začít tvořit obranné mechanismy (Svobodová and Svoboda, 1995). Také se většinou při léčbě nepočítá s rychlejším metabolismem léčiv u některých druhů zvířat, např. koz (Sangster and Gill, 1999). Nebezpečí příliš nízkých dávek léčiva také spočívá v podněcování k vyšší reprodukci parazita jakožto obranné reakce (Emery et al., 2016). Problémem stále zůstává i nadměrné vylučování léčiva a jeho metabolitů spolu s výkaly léčeného zvířete do prostředí, kde následně dochází k ovlivňování subletálními dávkami léčiva volně žijících vývojových stádií parazitů, která si postupně vyvíjí rezistenci. K tomu může přispívat i fakt, že mitochondriální DNA *H. contortus* podléhá vysoké míře mutací, které probíhají až 10x rychleji než u obratlovců (Blouin et al., 1995).

### 2.5.1 Mechanismus

Dosud objevené mechanismy rezistence, ať už specifické či nespecifické, zahrnují modifikaci cílového místa léčiva, snížení počtu cílových míst a zvýšený metabolismus či eflux léčiva podmíněný vyšší transkripcí genů biotransformačních enzymů (James et al., 2009).

Téměř všechny znalosti o možných mechanismech anthelmintické rezistence jsou založeny na studiu vybraných kandidátních genů. Většina experimentální práce je spojena s hledáním asociací fenotypu rezistentních kmenů s polymorfismy a změnou exprese těchto genů, čehož se může dosáhnout porovnáváním citlivé a rezistentní populace v terénu či umělou selekcí rezistence během experimentálních infekcí (Gilleard, 2006).

Mezi nejvýznamnější objev se řadí nalezení mutace v oblastech  $\beta$ -tubulinu jakožto hlavní faktor rezistence hlístic na benzimidazoly. Substituce fenylalaninu za tyrosin na pozici 200 (F200Y) je hlavním determinantem rezistence u *H. contortus* po celém světě. Tato změna aminokyselinové sekvence je výsledkem jednonukleotidového polymorfismu z TTC200 na TAC200, což má za následek sníženou afinitu  $\beta$ -tubulinu k benzimidazolům (Von Samson-Himmelstjerna et al., 2007). Vzácně se vyskytují mutace též na pozici 167 (F167Y) a 198 (E198A) (Kotze et al., 2012). Příčinou ztráty citlivosti *H. contortus* na levamisol je delece v genu nikotin-acetylcholinového receptoru v genomové DNA. Mutace jsou známy i v genech podjednotky glutamátém řízeného chloridového kanálu (McCavera et al., 2009) a polymorfismy v genech P-glykoproteinů (Sangster and Gill, 1999), což snižuje účinek makrocyclických laktonů.



Jiné studie potvrzují, že snížená citlivost *H. contortus* na levamisol a ivermektin je zapříčiněna sníženou transkripcí genů nikotin-acetylcholinového receptoru (Sarai et al., 2014) a genů kódujících receptory *glc-3* a *glc-5* (Williamson et al., 2011).

Biotransformační enzymy a transportéry xenobiotik do určité míry chrání parazity před toxickými účinky anthelmintik a indukce XME může představovat výhodnou obrannou strategii (Robinson et al., 2004). Obrannou reakcí zapříčiněnou opakovaným vystavováním xenobiotikům může být zvýšení exprese genů XME. Zvýšená aktivita XME vede k omezenému vstřebávání, rychlejší deaktivaci a usnadnění vylučování anthelmintik, což se může projevit zvýšenou tolerancí na léčivo (Bartikova et al., 2015). Zvýšenou expresí vybraných UGT a Pgp u rezistentního kmene *H. contortus* v porovnání s citlivým kmenem potvrdilo několik studií (Janssen et al., 2015; Matouskova et al., 2018; Xu et al., 1998). U rezistentních kmenů *H. contortus* bylo také pozorováno vyšší množství metabolitů některých anthelmintik, konkrétně albendazolu a flubendazolu (Stuchlíková et al., 2018; Vokral et al., 2012; Vokral et al., 2013). Souvislost zvýšené exprese biotransformačních enzymů s rezistencí jasně ukazuje indukce exprese genů UGT po expozici *C. elegans* albendazolu, mebendazolu, thiabendazolu a oxfendazolu, kdy nadměrná exprese *ugt22* několikanásobně zvýšila  $IC_{50}$  těchto léčiv (Fontaine and Choe, 2018).

Bohužel, objasnění mechanismů rezistence u *H. contortus* a dalších parazitů komplikují odlišnosti mezi laboratorními kmeny a terénními izoláty. Také vliv selekčního tlaku vyvíjeného na červy v různých chovech, zapříčiněný odlišnými strategiemi odčervování či podmínkami prostředí mohou způsobit, že rezistence vůči jednotlivým třídám léčiv zahrnuje různé genetické změny, které se nepromítnou do všech izolátů (Chaudhry et al., 2015).

### 2.5.2 Prevence

Pravidelné preventivní podávání anthelmintik vede ke stále většímu rozvoji rezistence na léčiva a snižování přirozené imunity hostitelských zvířat. Prevence vzniku rezistence na anthelmintika zahrnuje několik klíčových strategií, která by mohla pomoci udržet účinnost těchto léčiv a ochránit zdraví hospodářských zvířat.

Po celém světě jsou ovce chovány převážně ve venkovních výbězích, kde se pravidelně setkávají s infekčními larvami gastrointestinálních parazitů. Za účelem minimalizovat tento kontakt, byla zavedena strategie rotační pastvy. Princip spočívá ve střídání více

pastvin, kdy některé jsou intenzivně využívány zvířaty a jiné ponechány v klidu. Výsledkem je přerušení životního cyklu parazita, snížení dostupnosti hostitelských zvířat a následné snížení počtu infekčních larev na pastvě. Další výhodou je méně častý kontakt parazita s léčivem, což napomáhá snížení selekčního tlaku na vývoj rezistence. Bohužel, tato strategie není příliš úspěšná v zemích mírného pásu, jelikož klimatické podmínky umožňují dlouhodobé přežití infekčních larev (Eysker et al., 2005).

Preventivní vyšetřování trusu podporuje cílené použití anthelmintik a omezuje jejich nadměrné užívání. Také přesná diagnostika a určení druhu parazita napomáhá k cílené léčbě. Tato opatření jsou ovšem velmi nákladná a vyžadují spolupráci odborníka.

K likvidaci vývojových stádií hlístic je vhodné využít i fyzikální metody zahrnující extrémní teploty, sucho a přímé sluneční záření. Jelikož jsou vajíčka chráněna pevnou stěnou, není chemická desinfekce až tak účinná (Ballweber, 2001).

Nezbytnou součástí kontrolních strategií je poskytování vyvážené, nutričně bohaté stravy, zejména u březích samic a jehňat. Bylo prokázáno, že strava doplněná o vysoký obsah bílkovin a aminokyselin posiluje imunitní systém a snižuje osídlení parazity (Rocha et al., 2011; Sakkas et al., 2013).

Střídání různých tříd anthelmintik a aplikace plné terapeutické dávky účinně předchází adaptaci parazitů na konkrétní léčivo a snížení rizika vzniku rezistence.

Šlechtění odolných plemen ovcí je dlouhodobou strategií, která může pomoci snížit výskyt gastrointestinálních hlístic. Geneticky odolná plemena jsou méně náchylná k infekcím a nevyžadují tak časté ošetření anthelmintiky (Bishop, 2012).

Také byla provedena řada studií ohledně možnosti biologické kontroly *H. contortus*. Larvicidní účinky byly popsány u toxinů *Bacillus thuringiensis* (AP et al., 2016) a spór *Bacollis circulans* (Sinott et al., 2016). Nematocidní účinek byl prokázán u metabolitů některých hub (Liu et al., 2020). Ke snížení počtu vajíček v trusu také přispělo spásání luštěniny *Sericea lepedeza* (Dykes et al., 2019).

Kombinace výše zmíněných opatření může významně přispět k prevenci vzniku rezistence na anthelmintika a zajistit dlouhodobou efektivitu kontroly gastrointestinálních infekcí u hospodářských zvířat.

### 3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo rozšířit poznatky o mechanismu lékové rezistence u parazitické hlístice *H. contortus* se zaměřením na analýzu konstitutivní exprese vybraných enzymů metabolizujících xenobiotika během životního cyklu a porovnání změn v expresi mezi kmeny s odlišnou úrovní rezistence a po kontaktu s vybranými anthelmintiky.

Dílčí cíle práce byly:

Zhodnocení změn v expresi vybraných UGT, CYP a Pgp u dospělců a v případě UGT i volně žijících stádií po inkubaci se subletálními dávkami ABZ a ABZ-SO

Analýza konstitutivní exprese genů UDP-glykosyltransferáz (UGT) u volně žijících stádií a porovnání exprese mezi kmeny ISE a IRE

Identifikace genů dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-keto reduktáz (AKR) v genomu *H. contortus*, analýza konstitutivní exprese vybraných AKR u volně žijících i parazitických stádií a zhodnocení změn v expresi mezi kmenem citlivým (ISE) a rezistentním na anthelmintika (IRE).

Ověření schopnosti volně žijících stádií redukovat FLU a porovnání tvorby hlavního metabolitu FLU-R mezi kmenem ISE a IRE.

Zhodnocení změn v expresi AKR po kontaktu dospělců se subletálními dávkami flubendazolu (FLU)

Ověření intragenerační a intergenerační stability změn v expresi genů UGT a Pgp vyvolanými expozicemi larev ABZ během vývoje

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Změny v expresi vybraných biotransformačních enzymů *H. contortus* po kontaktu s anthelmintikem

Kellerová, P., Stuchlíková 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* 51, 94 (2020)

Biotransformační enzymy a lékové transportéry do určité míry chrání parazity před toxickými účinky anthelmintik. Zvýšení exprese a aktivit XME tak může představovat výhodnou obrannou strategii (Robinson et al., 2004). Hlístice mají mnohem vyšší počet genů XME než ostatní třídy helmintů (Stuchlikova et al., 2014). Díky tomu jsou schopny účinně metabolizovat mnoho anthelmintik (Stuchlikova et al., 2014; Vokral et al., 2013). Předchozí studie prokázaly vyšší expresi genů XME a schopnost rezistentních kmenů *H. contortus* tvořit více neaktivních metabolitů léčiva než citlivý kmen (Stuchlikova et al., 2018; Vokral et al., 2012; Vokral et al., 2013).

Předpokládali jsme, že při kontaktu dospělých *H. contortus* se subletálními dávkami léčiva (ke kterému např. dochází při nesprávné léčbě) by mohlo dojít ke změně v expresi XME. Tato studie byla navržena tak, aby ověřila účinek subletálních dávek anthelmintika albendazolu (ABZ) a jeho aktivního metabolitu ABZ-sulfoxidu (ABZ-SO) na expresi CYP, UGT a Pgp dospělých jedinců *H. contortus ex vivo*. Také byla testována hypotéza, zda zvýšená exprese vybraných XME zlepšuje schopnost deaktivace ABZ během následné expozice.

Po expozici dospělců *H. contortus* subletálními dávkami ABZ došlo k významné změně exprese u tří CYP (*cyp2*, *cyp3* a *cyp7*). Subletální dávky ABZ-SO ovlivnily expresi většího množství genů CYP, indukční účinek byl však mírný a ve většině případů pouze při vyšší koncentraci. Výsledky odpovídají studii s ivermektinem, ve které byla pozorována vyšší exprese *cyp3* a *cyp7* po expozici dospělců ivermektinem (Kellerova et al., 2019). ABZ-SO indukoval zcela jiné geny, pravděpodobně kvůli vyšší hydrofilitě. Jako nejzajímavější kandidáti z rodiny UGT se jeví *ugt367A1* samic a *ugt26A2* samečů, jelikož po kontaktu s ABZ ve všech koncentracích došlo k signifikantnímu zvýšení jejich exprese. Po inkubaci s ABZ-SO byla nejvýraznější indukce *ugt10b1*. Dále expozice ABZ

a ABZ-SO ovlivnila transkripční hladiny šesti z osmi transportních genů Pgp, ovšem změny exprese Pgp vyvolané ivermektinem jsou značně výraznější (Peachey et al., 2017; Turnbull et al., 2018). Na druhou stranu, i když ABZ není považován za substrát či inhibitor Pgp, tato studie ukazuje indukovatelnost několika členů této třídy po kontaktu s ABZ. Kromě toho byl v další části studie prokázán významný nárůst efluxu osmi metabolitů ABZ po cílené indukci genů XME. Tyto výsledky podporují hypotézu, že enzymy Pgp hrají významnou roli v rezistenci *H. contortus*, a to nejen v souvislosti s ivermektinem.

S cílem zjistit, zda předchozí indukce ovlivňuje schopnost deaktivovat ABZ během následné expozice, byl metabolismus ABZ porovnán u kontrolních vzorků a u *H. contortus* preinkubovaných se subletální dávkou ABZ. UHPLC/MS analýza odhalila dvacet metabolitů ABZ u preinkubovaných dospělců, zatímco u neovlivněných jedinců bylo detekováno pouze devět metabolitů. Předchozí kontakt se subletálními dávkami rovněž vedl ke kvantitativnímu nárůstu některých metabolitů, hlavně glykosidů. Tyto výsledky jsou v korelaci s výsledky transkripční analýzy, nicméně hodnocení rolí jednotlivých enzymů v metabolismu ABZ vyžaduje další zkoumání.

Závěrem lze konstatovat, že kontakt dospělých jedinců *H. contortus* se subletálními dávkami ABZ vedl k indukci zejména UGT a v menší míře CYP a Pgp. Tato indukce zlepšila schopnost deaktivovat ABZ v následné expozici prostřednictvím zvýšené tvorby neaktivních metabolitů a jejich exportu z těla parazita. To by mohl být způsob, jak kontakt se subletálními dávkami léčiva pomáhá parazitům přežít následnou farmakoterapii.

## 4.2 Konstitutivní exprese UDP-glykosyltransferáz u volně žijících stádií *H. contortus*

Kellerová, P., Navrátilová, M., Nguyen, T.L., Dimunová, D., Stuchlíková, L.R., Štěrbová, K., Skálová, L., Matoušková, P. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Front Physiol* 11, 594116 (2020)

Významná úloha UGT v biotransformaci ABZ u *H. contortus* byla v předešlých studiích dobře popsána u dospělých stádií (Kellerova et al., 2020b), chyběly ovšem informace o expresi UGT volně žijících stádií *H. contortus* a jejich roli v metabolismu ABZ. I volně žijící stádia *H. contortus* se dostávají do kontaktu s ABZ a jeho metabolity. Zvíře léčené ABZ vylučuje se svými exkrementy hlavně ABZ a ABZ-SO do prostředí (Prchal et al., 2016), které jsou poměrně perzistentní a zůstávají na pastvině po dlouhou dobu (Porto et al., 2021). Pokud je léčivý ošetřený zvíře ponecháno na pastvě, mohou se volně žijící stádia parazitů snadno dostat do kontaktu se subletálními dávkami léčiva a jeho metabolitů, což může přispět k postupnému navykání a rozvoji rezistence.

Tato studie se zaměřila na expresi UGT a metabolismus ABZ a ABZ-SO ve vajíčkách, L1 a L3 *H. contortus*. Také byla porovnána tvorba metabolitů ABZ a vybraných transkriptů UGT mezi citlivým a rezistentním kmenem. Na závěr byla studována indukovatelnost jednotlivých UGT expozicí juvenilních stádiích ABZ a ABZ-SO .

Byla zjištěna vysoká variabilita transkripční úrovně UGT isoform mezi jednotlivými stádii, což ukazuje, že UGT mají v každé životní fázi jinou funkci. Překvapivě bylo devět UGT nejvíce exprimováno ve vajíčkách. Vzhledem ke skutečnosti, že vajíčka nepřijímají žádné exogenní látky, se transkripční aktivita zaměřuje především na vývoj (Laing et al., 2016). Deset UGT bylo exprimováno ve stádiu L1 a konkrétně *ugt365a1* mělo několikanásobně vyšší úroveň exprese v L3 oproti jiným stádiím. Ve srovnání s dospělci, většina UGT vykazovala vyšší hladiny exprese v juvenilních stádiích oproti dospělcům (Matouskova et al., 2018).

Pro posouzení změn souvisejících s rezistencí byly porovnány hladiny vybraných UGT mezi citlivým kmenem a dvěma rezistentními kmeny *H. contortus*. U *ugt368b2*, které vykazovalo rozdíl mezi citlivým a oba rezistentními geny dospělců, byla zaznamenána vyšší exprese u obou rezistentních kmenů i v případě L1 a L3 (Matouskova et al., 2018).

Mohlo by se tak jednat o vhodného kandidáta pro další studie z hlediska rezistence na anthelmintika. Indukovatelnost UGT subletálními dávkami ABZ nebo ABZ-SO nebyla u volně žijících stádií prokázána. Biotransformační studie ABZ a ABZ-SO ukázala, že nejdominantnějším procesem v juvenilních stádiích byla S-oxidace, přičemž ABZ byl metabolizován na ABZ-SO a dále na ABZ-SO<sub>2</sub>. V případě glykosidace bylo zaznamenáno několik ABZ-glykosidů a ABZ-SO glykosidů, což prokázalo účast UGT na detoxikaci ABZ ve vajíčkách a larvách obdobně jako v dospělých (Stuchlikova et al., 2018). V porovnání počtu metabolitů mezi kmeny byly v kmeni ISE detekovány pouze tři glykosidované metabolity, zatímco v kmeni IRE jich bylo nalezeno šest. Toto zjištění koreluje se studií biotransformace ABZ v dospělých stádiích (Stuchlikova et al., 2018). UGT se ukázaly jako důležité enzymy pro detoxikaci ABZ i ve volně žijících stádií a pozorované rozdíly mezi citlivým a rezistentním kmenem podporují jejich další výzkum z hlediska možné účasti těchto enzymů na rezistenci.

### 4.3 Identifikace a charakterizace dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) v genomu *H. contortus*

Štěrbová, K., Rychlá, N., Matoušková, P., Skálová, L., Stuchlíková L.R. Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Vet Res* 54, 19 (2023)

Úspěšný boj proti gastrointestinálním parazitům a předcházení rezistence na léčiva vyžaduje hlubší znalosti jejich fyziologie a biochemických drah. Přestože enzymy SDR regulují aktivitu mnoha endogenních sloučenin a podílejí se na deaktivaci různých léčiv a dalších xenobiotik v mnoha organismech, informace o této rodině enzymů v hlísticích byly velmi omezené (Matouskova et al., 2016). Proto bylo cílem této studie charakterizovat rodinu SDR v modelové parazitické hlístici *H. contortus*.

V genomu *H. contortus* byly nalezeny předpokládané geny SDR a provedena fylogenetická analýza s porovnáním SDR u volně žijící hlístice *C. elegans* a hostitele ovce domácí. Dále byla porovnána konstitutivní exprese vybraných genů SDR *H. contortus* v průběhu životního cyklu a mezi kmenem citlivým (ISE) a rezistentním (IRE) na léčiva.

Na základě sekvence AMK bylo v genomu *H. contortus* nalezeno 46 členů rodiny SDR. Kromě sedmi se u všech Hco\_SDR vyskytoval typický motiv vazebného místa kofaktoru (TGxxxGxG). Výjimku tvořily SDR3 a HCON\_00146780, ve kterých byl první glycin nahrazen alaninem, jako je tomu v případě homologu DHS-13 *C. elegans* a DHRS4 ovčí. Tyto homology jsou pravděpodobně zapojeny do metabolismu aromatických karbonylových sloučenin (Kisiela et al., 2018). Motiv SDR7 je typický pro širší rodinu SDR epimeráz a hydráz a odpovídá homologu ovce a člověka HTATIP2. Fylogenetická analýza odhalila několik skupin zmnožených homologních genů *H. contortus*, což by mohlo poukazovat na specifické role SDR v konkrétním organismu. Většina genů SDR byla lokalizována na chromozomu 4, u kterého byla již dříve prokázána vysoká rychlost rekombinace (Doyle et al., 2018) a vyskytuje se zde i většina UDP-glykosyltransferáz (Matouskova et al., 2018). Pro podrobnější analýzu bylo vybráno 23 SDR, které byly z důvodu dosud neexistující nomenklatury pojmenovány *sdr1* – *sdr23*. Relativní exprese se jak mezi jednotlivými vývojovými stádii, tak i mezi jednotlivými SDR významně lišila.



Ve vajíčkách byla zvýšena transkripce *sdr6*, *sdr14* a *sdr18*, zatímco *sdr1*, *sdr3* a *sdr18* dominovaly v larválních stádiích. U dospělých jedinců obou pohlaví vykazovaly nejvyšší expresi *sdr3*, *sdr5* a *sdr18*, přičemž *sdr5* byl více exprimován v dospělých samcích oproti všem juvenilním stádiím. Celkově většina SDR vykazovala nejvyšší úroveň exprese ve volně žijících larvách, což naznačuje důležitou funkci těchto enzymů v obranně proti potenciálně škodlivým xenobiotikům přítomným v životním prostředí. Rozdíly v expresi byly pozorovány i mezi jednotlivými larválními stádii, proto se domníváme, že význam a funkce jednotlivým SDR se významně odlišuje i v průběhu vývoje larev. Dospělí parazitující jedinci se naopak musí vypořádat s obranným imunitním systémem hostitele a anaerobními podmínkami v bachoru. Lze předpokládat, že enzymy SDR se na těchto procesech také podílejí.

S cílem zhodnotit vztah mezi SDR a lékovou rezistencí *H. contortus* byla relativní exprese SDR porovnána i mezi kmenem ISE a IRE. Ve vajíčkách a L1 kmene rezistentního kmene byla signifikantní vyšší exprese genů *sdr1*, *sdr12*, *sdr13*, *sdr16* a *sdr21*, u samců navíc *sdr18* a *sdr23*. Překvapivě, u vývojových stádií L3 a xL3 byla většina SDR snížena ve srovnání s citlivým kmenem. Důvodem může být schopnost infekčních larválních stádií v nepříznivých podmínkách pozastavit aktivitu a snížit transkripci genů pro některé metabolické procesy (Barger, 1999; Laing et al., 2016).

Předpokládáme, že enzymy rodiny SDR jsou zapojeny do lékové rezistence, i vzhledem k dříve zjištěné schopnosti rezistentního kmene účinněji redukovat anthelmintikum flubendazol (Stuchlikova et al., 2018).

Tato studie rozšířila dosavadní informace o enzymech z rodiny SDR u *H. contortus* a poukazuje na potřebu dalšího zkoumání těchto enzymů, jelikož by mohly sloužit jako potenciální cíl nových anthelmintik a hrát roli v rezistenci na vybraná anthelmintika s karbonylovou skupinou.

#### **4.4 Změny v redukci flubendazolu během životního cyklu *H. contortus***

Rychlá, N., Navrátilová, M., Kohoutová, E., Stuchlíková, L.R., Štěrbová, K., Krátký, J., Matoušková, P., Szotáková, B., Skálová, L. Flubendazole carbonyl reduction in drug-susceptible and drug-resistant strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: changes during the life cycle and possible inhibition. *Vet Res* 15, 55 (2024)

SDR a AKR jsou enzymy katalyzující redukci sloučenin obsahující karbonylovou skupinu ve všech organismech, včetně helmintů. Předchozí studie prokázaly důležitou roli těchto enzymů při deaktivaci řady léčiv, např. flubendazolu či mebendazolu (Malatkova and Wsol, 2014; Raisova Stuchlikova et al., 2018; Stuchlikova et al., 2018; Vokral et al., 2012). Až doposud byla redukce FLU studována pouze v dospělých stádiích *H. contortus* a informace, zda jsou volně žijící stádia schopna deaktivace anthelmintik prostřednictvím karbonylové redukce nebyla známa. Přestože jsou tato léčiva zaměřena na parazitická stádia, vajíčka a larvy mohou přijít do kontaktu s FLU vyloučeným spolu s trusem léčených zvířat do prostředí a vyvinout si tak ochranné mechanismy.

Pro doplnění těchto informací byla v této studii zjišťována schopnost volně žijících stádií *H. contortus* redukovat FLU a porovnána tvorba hlavního metabolitu FLU-R u citlivého a rezistentního kmene. Jelikož inhibice enzymů zodpovědných za deaktivaci FLU by mohla zvýšit jeho anthelmintickou účinnost, byl hodnocen účinek vybraných inhibitorů na redukci FLU v subcelulárních frakcích *H. contortus in vitro* a izolovaných dospělců *ex vivo*.

Přestože získané výsledky potvrdily schopnost všech vývojových stádií *H. contortus* redukovat FLU, bylo vytvořené množství tohoto metabolitu velmi malé. Oproti vajíčkům larvy redukovaly FLU účinněji, i když nejvyšší produkce FLU-R byla naměřena u dospělců. Samice redukovaly FLU více než samci a u dospělců rezistentního kmene bylo nalezeno více FLU-R než u kmene citlivého. Nejvyšší rozdíl v redukci FLU mezi kmeny byl zaznamenán u larev, u kterých došlo k 7krát vyšší tvorbě FLU-R u rezistentního kmene oproti kmeni citlivému. Na druhou stranu, u vajíček byla pozorována vyšší produkce FLU-R u citlivého kmene, ovšem deaktivace léčiva byla tak nízká, že se nemohlo jednat o obranný mechanismus. Dále bylo testováno několik možných inhibitorů, které mohou omezit redukci FLU u dospělých jedinců *H. contortus* a zvýšit

tak jeho účinek. Výsledky *in vitro* ukázaly výrazný inhibiční účinek naringeninu a menadionu, inhibitorů lidské karbonylreduktázy 1 (Arai et al., 2015; Shi and Di, 2017). Vzhledem k tomu, že rozsah inhibice byl téměř stejný u ISE i IRE, lze předpokládat, že inhibovaný enzym je podobně exprimován v obou kmenech. Kyselina glycyrrhetinová, inhibitor hydroxysteroiddehydrogenáz (Itoda et al., 2002), a mebendazol, strukturně podobný FLU, inhibovaly redukci FLU pouze u kmene ISE, což by mohlo naznačovat schopnost kmene IRE nahradit inhibované enzymy jiným enzymem. Oproti výsledků *in vitro* inhibiční účinky naringeninu a mebendazolu nebyly pozorovány *ex vivo* u izolovaných dospělců *H. contortus*. Rozdílné výsledky mohly být způsobeny vyšší hydrofilitou inhibitorů než FLU. Jedinou testovanou sloučeninou snižující tvorbu FLU-R *ex vivo* byl menadion, který byl ale zároveň pro *H. contortus* velmi toxický. Je tedy pravděpodobné, že snížené množství FLU-R bylo způsobeno úmrtím hlístic spíše než inhibicí enzymů.

Výsledky této studie potvrdily schopnost volně žijících stádií deaktivovat FLU prostřednictvím redukce karbonylové skupiny. Larvy a dospělé samice rezistentního kmene redukují FLU účinněji v porovnání s citlivým kmenem.

## 4.5 Identifikace a charakterizace aldo-ketoreduktáz (AKR) v genomu *H. contortus*

Štěrbová, K., Stuchlíková, L.R., Rychlá, N., Kohoutová, K., Babičková, M., Skálová, L., Matoušková, P. Phylogenetic and transcriptomic study of aldo-keto reductases in *Haemonchus contortus* and their inducibility by flubendazole. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 25 (2024)

Z důvodu rozvoje rezistence na léčbu u gastrointestinálních hlístic se stále více do popředí výzkumu dostává hledání nových molekulárních cílů a studium mechanismů rezistence. Mezi dosud objevené mechanismy rezistence patří i zvýšený metabolismus či eflux léčiva podmíněný vyšší transkripcí genů biotransformačních enzymů (James et al., 2009). Předchozí studie byly zaměřeny na enzymy CYP, UGT, Pgp a SDR (Kellerova et al., 2019; Kellerova et al., 2020a; Šterbova et al., 2023). Tato studie byla zaměřena na rodinu enzymů AKR u *H. contortus*, o kterých nebyly dostupné téměř žádné informace. AKR jsou důležitými enzymy v metabolismu endogenních látek, ale přeměňují i širokou škálu xenobiotických substrátů, včetně léčiv.

V genomu *H. contortus* bylo nalezeno 22 domnělých genů AKR, které byly dále zkoumány z hlediska fylogeneze a porovnány s volně žijící hlísticí *C. elegans*, ovčímí a lidskými AKR. Byla změřena relativní konstitutivní exprese všech 22 kandidátních genů a porovnána mezi jednotlivými vývojovými stádii *H. contortus*. Také byla srovnána úroveň exprese jednotlivých AKR v citlivém kmeni a kmeni rezistentním na léčiva a ověřena indukovatelnost těchto genů expozicí dospělých stádií s FLU, jelikož se enzymy AKR mohou podílet na deaktivaci anthelmintik nesoucích karbonylové skupiny (flubendazol, mebendazol) a přispívat tak k rezistenci.

Sekvenování genomu *H. contortus* odhalilo 22 členů rodiny AKR. Specifická doména byla potvrzena ve všech sekvencích, přičemž klasická katalytická tetráda DYKH byla rozpoznána v 17 z nich. V porovnání se savci jsou Hco\_AKR fylogeneticky velmi vzdáleny, přičemž nejbliže si jsou AKR11 se savčími AKR6A a AKR7A. Distribuce genů AKR mezi chromozomy *H. contortus* je značně nerovnoměrná a nejvíce jich je umístěných na chromozomu 1. Exprese genů *akr1*, *akr3* a *akr10* byla nejvyšší, většina ostatních AKR byla exprimována pouze minimálně. Na rozdíl od SDR, které vykazovaly nejvyšší expresi ve volně žijících larvách (Šterbova et al., 2023), jsou AKR exprimovány

především v dospělých parazitických stádiích. Většina AKR v L3 a xL3 kmene IRE měla sníženou expresi ve srovnání s ISE kmenem, což je v souladu s předchozími výsledky enzymů SDR. V dospělých jedincích byly signifikantně zvýšeny *akr17* a *akr19* v obou pohlavích kmene IRE oproti kmeni ISE. Indukce genů AKR po kontaktu s FLU byla pozorována pouze u *akr9*, *akr15* a *akr19*.

Jako vhodný kandidát z rodiny AKR jakožto cílové místo léčiva či inhibitoru se zdá být AKR5, jelikož vykazuje relativně vysokou expresi v dospělých jedincích a je poměrně vzdálený od AKR ovcí. AKR10 má nejvyšší expresi po dobu celého životního cyklu *H. contortus*, je též fylogeneticky vzdálen od AKR savců a odpovídá jednomu homologu *C. elegans*. AKR19 vykazovala vyšší konstitutivní expresi v rezistentním kmeni a jeho indukovatelnost u samic citlivého kmene může naznačovat účast na metabolismu FLU. Všechny tyto charakteristiky činí AKR5, AKR10, AKR17 a AKR19 významnými pro další studie z hlediska možných cílů léčby a jejich role v rezistenci.

## 4.6 Intragenerační a intergenerační stabilita změn v expresi vybraných enzymů

Štěrbová, K., Nguyen, T.L., Žofka, M., Matoušková, P., Skálová, L.. Environment-like exposure of free-living stages of *Haemonchus contortus* to albendazole: the intra- and intergeneration stability of altered expression of UDP-glycosyl transferases and ABC-transporters. *Chemosphere* – v revizním řízení

V předchozích studiích byla prokázána cirkulace ABZ z trusu léčených ovcí do půdy (Navratilova et al., 2021). Také je známo, že kontakt parazitické hlístice *H. contortus* se subletálními koncentracemi ABZ vede ke změně exprese a aktivity několika UGT a Pgp (Kellerova et al., 2020a; Kellerova et al., 2020b). Tyto výsledky jasně ukazují, že stopové koncentrace ABZ a jeho metabolitů jsou v životním prostředí přítomny a ovlivňují expresi enzymů metabolizujících xenobiotika, včetně anthelmintik. Nicméně chybí informace, zda změny v expresi vybraných enzymů přetrvávají během životního cyklu hlístic a zda se promítnou v další generaci.

V této studii simulující environmentální expozici byla volně žijící stádia *H. contortus* vystavena subletální dávce ABZ během vývoje do L3. Tyto L3 dále sloužily k infekci jehňat a zisku dospělců. Exkrementy infikovaných jehňat byly použity pro kultivaci druhé generace L3, které byly během vývoje znovu vystaveny účinkům ABZ. Následně byla analyzována exprese vybraných UGT a Pgp v první a druhé generaci L3 a také u dospělých jedinců.

Předchozí studie potvrdily vyšší expresi genů *ugt26a2* a *ugt368b1* v rezistentním kmeni *H. contortus* a jejich indukovatelnost ABZ (Kellerova et al., 2020b; Matouskova et al., 2018). V této studii kontakt se subletálními dávkami ABZ indukoval expresi *ugt26a2*, *ugt368b1* a naopak snížil expresi *ugt365a1* v L3. Tyto změny byly zachovány i do druhé generace L3, přestože nebyly znovu vystaveny ABZ, což naznačuje mezigenerační přetrvávání některých změn v expresi genů XME. Expozice larev ABZ indukovala geny *ugt365a1* a *ugt371a1* v dospělých stádiích *H. contortus* a následný kontakt druhé generace L3 s ABZ indukovatelnost potvrdil. Exprese genů *ugt24b1*, *ugt368a1*, *pgp11* a *pgp13* byla snížena v L3, které byly během vývoje vystaveny ABZ. Tři z těchto změn (*ugt24b1*, *ugt368a1*, *pgp11*) byly zachovány do dospělosti, zatímco snížená exprese *pgp13* byla přenesena do další generace L3. Překvapivě exprese *ugt24b1* byla v tomto

případě několikanásobně zvýšena. Opakovaný kontakt druhé generace L3 s ABZ opět snížil expresi všech zmíněných genů. Vyšší exprese *ugt24b1* a *ugt368a1* v rezistentním kmeni *H. contortus* byla pozorována ve studii (Matouskova et al., 2018). Zajímavé změny byly pozorovány také v případě *ugt365b5* a *ugt368a2*. Jejich relativní exprese byla snížena u dospělých jedinců po kontaktu s ABZ během vývoje, ale naopak zvýšena v druhé generaci L3, které nebyly vystaveny léčivu. Kromě toho opakovaná expozice druhé generace L3 snížila expresi těchto genů.

Všechny uvedené výsledky prokazují, že vystavení volně žijících stádií *H. contortus* subletálním dávkám ABZ z prostředí vyvolává změny v expresi *ugt* a *pgp* genů, přičemž některé z těchto změn jsou stabilní během cyklu hlístic a přenášejí se do další generace. Tato studie zdůrazňuje význam konceptu střídání pastvin, který omezuje kontakt volně žijících stádií helmintů s anthelmintiky na pastvě (Eysker et al., 2005).

## 5 ZÁVĚR

Tato práce poskytla nové informace o vybraných enzimech metabolizujících xenobiotika a rozšířila poznatky o mechanismu lékové rezistence ve všech životních stádiích parazitické hlístice *H. contortus*.

Po expozici dospělců *H. contortus* subletálními dávkami ABZ došlo k významné změně exprese pouze u tří CYP (*cyp2*, *cyp3* a *cyp7*), *ugt367A1* a *ugt26A2*. Indukovatelnost UGT subletálními dávkami ABZ nebo ABZ-SO nebyla u volně žijících stádií prokázána, přestože byla zaznamenána tvorba ABZ-glykosidů i ABZ-SO glykosidů. Přestože ABZ není považován za substrát či inhibitor Pgp, v této studii došlo ke zvýšení exprese osmi genů Pgp po kontaktu s ABZ. Geny se zvýšenou úrovní transkripce mohou přispívat k rychlejšímu metabolismu anthelmintik.

Analýza konstitutivní exprese genů UDP-glykosyltransferáz (UGT) během životního cyklu poukázala na vyšší hladiny exprese v juvenilních stádiích oproti dospělcům. Konkrétně *ugt365a1* mělo několikanásobně vyšší úroveň exprese v L3 oproti jiným stádiím. V případě *ugt368b2*, která vykazovala zvýšenou expresi u dospělců rezistentních kmenů, byla zaznamenána také vyšší exprese u L1 a L3 rezistentních kmenů oproti citlivému kmeni. Mohlo by se tak jednat o vhodného kandidáta pro další studie z hlediska rezistence na anthelmintika.

V genomu *H. contortus* bylo identifikováno 46 členů dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) a 22 členů aldo-keto reduktáz (AKR). Většina SDR vykazovala nejvyšší úroveň exprese ve volně žijících larvách, což by mohlo naznačovat důležitou funkci těchto enzymů v obranně proti potenciálně škodlivým xenobiotikům přítomným v životním prostředí. Na rozdíl od SDR byly AKR exprimovány především v dospělých parazitických stádiích, která se musí vypořádat s obranným imunitním systémem hostitele a anaerobními podmínkami v bachoru. Porovnání relativní exprese genů SDR/AKR mezi citlivým a rezistentním kmenem *H. contortus* odhalilo několik zajímavých kandidátů pro další studie.



Výsledky studie redukce flubendazolu (FLU) během životního cyklu *H. contortus* potvrzují schopnost volně žijících stádií deaktivovat FLU prostřednictvím redukce karbonylové skupiny. Přestože jsou tato léčiva zaměřena na parazitická stadia, vajíčka a larvy mohou přijít do kontaktu s FLU vyloučeným spolu s trusem léčených zvířat do prostředí, což podporuje vytvoření ochranných mechanismů. Navíc účinnější redukce FLU u larev a dospělých samic rezistentního kmene v porovnání s citlivým kmenem poukazuje na souvislost mezi metabolismem a anthelmintickou rezistencí.

Ověření účasti AKR na metabolismu anthelmintik poukázalo na geny *akr9*, *akr15* a *akr19*, které byly indukovány po kontaktu se subletálními dávkami flubendazolu. *Akr19* byl navíc více exprimován v rezistentním kmeni *H. contortus* a mohl by tak být významným cílovým místem léčby či inhibitoru.

Výsledky studie intragenerační a intergenerační stability změn v expresi genů UGT a Pgp prokazují, že vystavení volně žijících stádií *H. contortus* během vývoje subletálními dávkám ABZ z prostředí vyvolává změny v expresi *ugt* a *pgp* genů, přičemž některé z těchto změn jsou stabilní během cyklu hlístic a přenášejí se do další generace.

## 6 SEZNAM PUBLIKACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K TÉMATU PRÁCE A PODÍL AUTORKY

Tato disertační práce je sepsána formou komentovaného souboru recenzovaných článků publikovaných v impaktovaných mezinárodních vědeckých časopisech. Taktéž jsou uvedeny informace o impakt faktoru (IF) a kvartilu (Q), ve kterém se časopis v roce vydání daného článku nacházel.

### Publikace I.

Kellerová, P., Stuchlíková 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* 51, 94 (2020), AIS: 0,896, IF: 3,699 Q1 (D1)

Podíl autorky:

- Izolace dospělých stádií *H. contortus*
- Inkubace s testovaným léčivem
- Extrakce RNA a syntéza cDNA
- Kvantitativní analýza exprese pomocí qPCR

### Publikace II.

Kellerová, P., Navrátilová, M., Nguyen, T.L., Dimunová, D., Stuchlíková, L.R., **Štěrbová, K.**, Skálová, L., Matoušková, P. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Front Physiol* 11, 594116 (2020), AIS: 1,135, IF: 4,566 Q1

Podíl autorky:

- Izolace vývojových stádií *H. contortus*
- Inkubace s testovaným léčivem
- Extrakce RNA a syntéza cDNA
- Kvantitativní analýza exprese pomocí qPCR

### **Publikace III.**

**Štěrbová, K.**, Rychlá, N., Matoušková, P., Skálová, L., Stuchlíková L.R. . Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Vet Res* 54, 19 (2023), AIS: 0,785, IF: 4,4 Q1 (D1)

Podíl autorky:

- Příprava L3 na cílené nakažení jehňat
- Izolace vývojových stádií a dospělců *H. contortus*
- Extrakce RNA a syntéza cDNA
- Kvantitativní analýza exprese pomocí qPCR
- Statistické vyhodnocení a zpracování výsledků z qPCR
- Podíl na sepsání publikace

### **Publikace IV.**

Rychlá, N., Navrátilová, M., Kohoutová, E., Stuchlíková, L.R., **Štěrbová, K.**, Krátký, J., Matoušková, P., Szotáková, B., Skálová, L. Flubendazole carbonyl reduction in drug-susceptible and drug-resistant strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: changes during the life cycle and possible inhibition. *Vet Res* 15, 55 (2024), AIS: 0,785, IF: 4,4 Q1 (D1)

Podíl autorky:

- Příprava L3 na cílené nakažení jehňat
- Izolace vývojových stádií a dospělců *H. contortus*
- Inkubace s flubendazolem

## **Publikace V.**

**Štěrbová, K.**, Stuchlíková, L.R., Rychlá, N., Kohoutová, K., Babičková, M., Skálová, L., Matoušková, P. Phylogenetic and transcriptomic study of aldo-keto reductases in *Haemonchus contortus* and their inducibility by flubendazole. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 25 (2024), AIS: 0,977, IF: 4.1 Q1

Podíl autorky:

- Příprava L3 na cílené nakažení jehňat
- Izolace vývojových stádií a dospělců *H. contortus*
- Inkubace s testovaným léčivem
- Extrakce RNA a syntéza cDNA
- Podíl na sepsání publikace

## **Publikace VI.**

**Štěrbová, K.**, Nguyen, T.L., Žofka, M., Matoušková, P., Skálová, L. Environment-like exposure of free-living stages of *Haemonchus contortus* to albendazole: the intra- and intergeneration stability of altered expression of UDP-glycosyl transferases and ABC-transporters. *Chemosphere* – v revizním řízení

Podíl autorky:

- Příprava L3 na cílené nakažení jehňat
- Ovlivnění vzorků testovaným léčivem
- Kultivace vajíček v trusu, izolace L3 a dospělců *H. contortus*
- Extrakce RNA a syntéza cDNA
- Kvantitativní analýza exprese pomocí qPCR
- Statistické vyhodnocení a zpracování výsledků z qPCR
- Podíl na sepsání publikace

## 7 OSTATNÍ VÝSTUPY

### 7.1 Účast na vědeckých konferencích

Štěrbová, K., Matoušková, P., Skálová, L., Constitutive expression of sdr genes throughout the life stages of *Haemonchus contortus*; přednáška. **26<sup>th</sup> Helminthological Days**, 20.-24.9.2021 Deštné v Orlických horách, Česká republika

Štěrbová, K., Matoušková, P., Skálová, L., Constitutive expression of sdr genes in drug-susceptible and drug-resistant strains of *Haemonchus contortus*; přednáška. **12<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference**, 1.-2.2.2022 Hradec Králové, Česká republika

Štěrbová, K., Matoušková, P., Skálová, L., Flubendazole-induced changes in the expression of sdr genes in *Haemonchus contortus*; poster. **27<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference**, 29.8.-1.9.2022 Hradec Králové, Česká republika

Štěrbová, K., Matoušková, P., Skálová, L., Expression of selected genes in *Haemonchus contortus* exposed to sub-lethal doses of fenbendazole; přednáška. **13<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference**, 1.-2.2.2023 Hradec Králové, Česká republika

Štěrbová, K., Rychlá, N., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Flubendazole-induced changes in the expression of selected sdr genes throughout the life cycle of *Haemonchus contortus*; přednáška. **27<sup>th</sup> Helminthological Days**, 8.-12.5.2023 Deštné v Orlických horách, Česká republika

Štěrbová, K., Rychlá, N., Stuchlíková, L.R., Matoušková, P., Skálová, L., Flubendazole-induced changes in the expression of selected sdr genes throughout the developmental stages of *Haemonchus contortus*; poster. **International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology**, 2.-5.7.2023 Bruggy, Belgie

Štěrbová, K., Lespine, A., Matoušková, P., Skálová, L., Anthelmintic activity of albendazole on *C. elegans* wild-type and ivermectin-resistant strains; přednáška. **14<sup>th</sup> Postgraduate and Postdoc Conference**, 30-31.1.2024 Hradec Králové, Česká republika

Štěrbová, K., Matoušková, P., Skálová, L. Differential gene expression of enzymes from SDR and AKR family in *H. contortus* in relation to anthelmintic resistance; přednáška. **Parasites in the Pacific 2024 Conference**, 26.-29.8.2024 Auckland, Nový Zéland

## 7.2 Absolvované kurzy a zahraniční stáže

16.-20.8.2021 **Letní škola statistických metod**, SC & C Partners s.r.o., Brno, Česká republika

30.11.2021 **Kurz Real-Time PCR**, SEQme s.r.o., Hradec Králové, Česká republika

28.2.-4.3.2022 **Kurz odborné přípravy k získání kvalifikace a odborné způsobilosti na úseku pokusných zvířat dle §15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb. - navrhování pokusů a projektů pokusů**, Veterinární Univerzita Brno, Česká republika

7.8.-20.8.2022 **Course Science Communication in Theory and Practice**, University of Copenhagen, Dánsko

11.-12.1.2023 **Microarray training course**, Biomedicínské centrum, Plzeň, Česká republika

11.9.-11.12.2023 **Tříměsíční zahraniční stáž**, Paul Sabatier University ve spolupráci s INRAE, Toulouse, Francie

Vedoucí: prof. Anne Lespine

Náplň: Cílem stáže bylo osvojení základních laboratorních metod a esejí nezbytných pro práci s modelovým organismem *Caenorhabditis elegans* a ověření zkřížené rezistence anthelmintik z rodiny benzimidazolů a makrocyclických laktonů.

## 7.3 Řešené granty

Hlavní řešitel

2021 – 2024 Grantová agentura Univerzity Karlovy č. 194421

Ontogenetic changes in expression and inducibility of carbonyl reductases in parasitic nematode *Haemonchus contortus*

Člen týmu

2019 – 2020 Grantová agentura Univerzity Karlovy č. 156819

Metabolic pathways of new potential anthelmintics in *Haemonchus contortus* and its host

2021 – 2023 START/SCI/052

Anthelmintics in the environment – detection, consequences, a possible solutions

2023 Grantová agentura České republiky č. 20-14581Y

Transcriptomic, proteomic and functional analysis of carbonyl reductases in parasitic nematode *Haemonchus contortus*

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ABZ	albendazol
AKR	aldo-keto reduktázy
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochrom
FLU	flubendazol
GST	glutathion-S-tranferázy
GT	glykosyltransferázy
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace
IRE	Inbred Resistant Edinburgh strain
ISE	Inbred Susceptible Edinburgh strain
IVM	ivermektin
L1	1. larvální stádium
L2	2. larvální stádium
L3	3. larvální stádium
xL3	odpláštěné 3. larvální stádium
L4	4. larvální stádium
L5	5. larvální stádium
MDR	dehydrogenázy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem
MOP	monepantel
NDP	nukleosid difosfát
Pgp	P-glykoprotein
SDR	dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem
SE	Susceptible Edinburgh strain
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glycosyltransferázy
XME	enzymy metabolizující xenobiotika



## 9 POUŽITÁ LITERATURA

- Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., 2008. Enzyme systems of detoxication - overview of recent approaches. *Interdiscip Toxicol* 1, 6-7.
- AP, D.E.L., Lorenzon, L.B., Vianna, A.M., Santos, F.D., Pinto, L.S., Aires Berne, M.E., Leite, F.P., 2016. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 143, 1665-1671.
- Arai, Y., Endo, S., Miyagi, N., Abe, N., Miura, T., Nishinaka, T., Terada, T., Oyama, M., Goda, H., El-Kabbani, O., Hara, A., Matsunaga, T., Ikari, A., 2015. Structure-activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1). *Fitoterapia* 101, 51-56.
- Ash, R.W., 1959. Inhibition and excitation of reticulo-rumen contractions following the introduction of acids into the rumen and abomasum. *J Physiol* 147, 58-73.
- Ballweber, L.R., 2001. *Veterinary Parasitology*. Butterworth-Heinemann.
- Barger, I.A., 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *Int J Parasitol* 29, 41-47; discussion 49-50.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A., 2008. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and Its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metab Rev* 40, 553-624.
- Bartikova, H., Krizova, V., Lamka, J., Kubicek, V., Skalova, L., Szotakova, B., 2010. Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *J Vet Pharmacol Ther* 33, 56-62.
- Bartikova, H., Skalova, L., Stuchlikova, L., Vokral, I., Vanek, T., Podlipna, R., 2015. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metab Rev* 47, 374-387.
- Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 136, 1081-1088.
- Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A., 2016. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Adv Parasitol* 93, 95-143.
- Bill, R., 1995. *Pharmacology for Veterinary Technicians*. Mosby.
- Bishop, S.C., 2012. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal* 6, 741-747.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141, 1007-1014.
- Bock, K.W., 2016. The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology* 99, 11-17.
- Calvete, C., Gonzalez, J.M., Ferrer, L.M., Ramos, J.J., Lacasta, D., Delgado, I., Uriarte, J., 2020. Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Vet Parasitol* 277, 109018.
- Carson, A., Reichel, R., Bell, S., Collins, R., Smith, J., Bartley, D., 2023. *Haemonchus contortus*: an overview. *Vet Rec* 192, 26-28.

- Carvalho, N., Henrique das Neves, J., Pennacchi, C.S., Talamini do Amarante, A.F., 2023. Hypobiosis and Development of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* Infection in Lambs under Different Levels of Nutrition. *Ruminants* 3, 401-412.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44, 35-44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136, 167-185.
- Coyne, M.J., Smith, G., 1992. The mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-naive and parasite-exposed sheep following single experimental infections. *Int J Parasitol* 22, 315-325.
- Cvilink, V., Kubicek, V., Nobilis, M., Krizova, V., Szotakova, B., Lamka, J., Varady, M., Kubenova, M., Novotna, R., Gavelova, M., Skalova, L., 2008. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 151, 242-248.
- Cvilink, V., Lamka, J., Skalova, L., 2009. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab Rev* 41, 8-26.
- Doyle, S.R., Laing, R., Bartley, D.J., Britton, C., Chaudhry, U., Gilleard, J.S., Holroyd, N., Mable, B.K., Maitland, K., Morrison, A.A., Tait, A., Tracey, A., Berriman, M., Devaney, E., Cotton, J.A., Sargison, N.D., 2018. A Genome Resequencing-Based Genetic Map Reveals the Recombination Landscape of an Outbred Parasitic Nematode in the Presence of Polyploidy and Polyandry. *Genome Biol Evol* 10, 396-409.
- Dykes, G., Terrill, T., Whitley, N., Singh, A., Mosjidis, J., Burke, J., Miller, J., 2019. Effect of Ground and Pelleted *Sericea Lespedeza* Whole Plant and Leaf Only on Gastrointestinal Nematode and Coccidial Infection in Goats. *Journal of Agricultural Science and Technology* A9, 93-102.
- Emery, D.L., Hunt, P.W., Le Jambre, L.F., 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int J Parasitol* 46, 755-769.
- Eysker, M., Bakker, N., Kooyman, F.N., Ploeger, H.W., 2005. The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. *Vet Parasitol* 129, 95-104.
- Flay, K.J., Hill, F.I., Muguiro, D.H., 2022. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. *Animals (Basel)* 12.
- Fontaine, P., Choe, K., 2018. The transcription factor SKN-1 and detoxification gene *ugt-22* alter albendazole efficacy in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8, 312-319.
- Gasser, R.B., von Samson-Himmelstjerna, G., 2016. ADVANCES IN PARASITOLOGY and Haemonchosis - Past, Present and Future Trends PREFACE. *Adv Parasit* 93, Xv-Xvi.
- Gatongi, P.M., Prichard, R.K., Ranjan, S., Gathuma, J.M., Munyua, W.K., Cheruiyot, H., Scott, M.E., 1998. Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya. *Vet Parasitol* 77, 49-61.
- Gibbs, H.C., 1964. Observations on an Outbreak of Clinical Parasitism in Ewes During the Winter Months. *Can Vet J* 5, 8-11.

- Gill, J.H., Redwin, J.M., 1995. Cryopreservation of the first-stage larvae of trichostrongylid nematode parasites. *Int J Parasitol* 25, 1421-1426.
- Gilleard, J.S., 2004. The use of *Caenorhabditis elegans* in parasitic nematode research. *Parasitology* 128 Suppl 1, S49-70.
- Gilleard, J.S., 2006. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *Int J Parasitol* 36, 1227-1239.
- Gilleard, J.S., 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology* 140, 1506-1522.
- Guengerich, F.P., 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8, E101-111.
- Hartman, J.H., Widmayer, S.J., Bergemann, C.M., King, D.E., Morton, K.S., Romersi, R.F., Jameson, L.E., Leung, M.C.K., Andersen, E.C., Taubert, S., Meyer, J.N., 2021. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 24, 51-94.
- Hashimoto, K., Tokimatsu, T., Kawano, S., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Goto, S., Kanehisa, M., 2009. Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans. *Carbohydr Res* 344, 881-887.
- Horák, P., Scholz, T., 1998. *Biologie helmintů*. Karolinum, Praha.
- Hu, D.G., Hulin, J.U., Nair, P.C., Haines, A.Z., McKinnon, R.A., Mackenzie, P.I., Meech, R., 2019. The UGTome: The expanding diversity of UDP glycosyltransferases and its impact on small molecule metabolism. *Pharmacol Ther* 204, 107414.
- Hu, Y.N., Walker, S., 2002. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol* 9, 1287-1296.
- Chaudhry, U., Redman, E.M., Raman, M., Gilleard, J.S., 2015. Genetic evidence for the spread of a benzimidazole resistance mutation across southern India from a single origin in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 45, 721-728.
- Itoda, M., Takase, N., Nakajin, S., 2002. Inhibition of 3 $\alpha$ / $\beta$ ,20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase by dexamethasone, glycyrrhetic acid and spironolactone is attenuated by deletion of 12 carboxyl-terminal residues. *Biol Pharm Bull* 25, 1220-1222.
- James, C.E., Hudson, A.L., Davey, M.W., 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* 25, 328-335.
- Janssen, I.J., Krucken, J., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2015. Transgenically expressed *Parascaris* P-glycoprotein-11 can modulate ivermectin susceptibility in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5, 44-47.
- Jez, J.M., Penning, T.M., 2001. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* 130-132, 499-525.
- Jörnvall, H., Höög, J.O., Persson, B., Parés, X., 2000. Pharmacogenetics of the alcohol dehydrogenase system. *Pharmacology* 61, 184-191.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D., 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34, 6003-6013.
- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B.C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res* 103, 931-939.

- Kellerova, P., Matouskova, P., Lamka, J., Vokral, I., Szotakova, B., Zajickova, M., Pasak, M., Skalova, L., 2019. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults. *Vet Parasitol* 273, 24-31.
- Kellerova, P., Navratilova, M., Nguyen, L.T., Dimunova, D., Raisova Stuchlikova, L., Sterbova, K., Skalova, L., Matouskova, P., 2020a. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Front Physiol* 11, 594116.
- Kellerova, P., Raisova Stuchlikova, L., Matouskova, P., Sterbova, K., Lamka, J., Navratilova, M., Vokral, I., Szotakova, B., Skalova, L., 2020b. Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. *Vet Res* 51, 94.
- Kenyon, F., Jackson, F., 2012. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet Parasitol* 186, 10-17.
- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R., von Samson-Himmelstjerna, G., 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22, 332-346.
- Kisiela, M., Faust, A., Ebert, B., Maser, E., Scheidig, A.J., 2018. Crystal structure and catalytic characterization of the dehydrogenase/reductase SDR family member 4 (DHRS4) from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS J* 285, 275-293.
- Kotze, A.C., Cowling, K., Bagnall, N.H., Hines, B.M., Ruffell, A.P., Hunt, P.W., Coleman, G.T., 2012. Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNPs in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2, 92-97.
- Krizova, V., Nobilis, M., Pruskova, L., Chladek, J., Szotakova, B., Cvilink, V., Skalova, L., Lamka, J., 2009. Pharmacokinetics of flubendazole and its metabolites in lambs and adult sheep (*Ovis aries*). *J Vet Pharmacol Ther* 32, 606-612.
- Kuchai, J.A., Ahmad, F., Chishti, M.Z., Tak, H., Ahmad, J., Ahmad, S., Rasool, M., 2012. A Study on Morphology and Morphometry of. *Pak J Zool* 44, 1737-1741.
- Laing, R., Bartley, D.J., Morrison, A.A., Rezansoff, A., Martinelli, A., Laing, S.T., Gilleard, J.S., 2015. The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 45, 243-251.
- Laing, R., Martinelli, A., Tracey, A., Holroyd, N., Gilleard, J.S., Cotton, J.A., 2016. *Haemonchus contortus*: Genome Structure, Organization and Comparative Genomics. *Adv Parasitol* 93, 569-598.
- Laing, S.T., Ivens, A., Butler, V., Ravikumar, S.P., Laing, R., Woods, D.J., Gilleard, J.S., 2012. The Transcriptional Response to Ivermectin Exposure Identifies Novel Genes Involved in the Response to Reduced Food Intake. *Plos One* 7.
- Laing, S.T., Ivens, A., Laing, R., Ravikumar, S., Butler, V., Woods, D.J., Gilleard, J.S., 2010. Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites. *Biochem J* 432, 505-514.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metab Rev* 25, 235-279.
- Larigot, L., Mansuy, D., Borowski, I., Coumoul, X., Dairou, J., 2022. Cytochromes P450 of *Caenorhabditis elegans*: Implication in Biological Functions and Metabolism of Xenobiotics. *Biomolecules* 12.
- Lincke, C.R., The, I., van Groenigen, M., Borst, P., 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *J Mol Biol* 228, 701-711.

- Linton, K.J., Higgins, C.F., 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch* 453, 555-567.
- Liu, X.Y., Chang, F.F., Zhao, T.Y., Huang, H.Y., Li, F.D., Wang, F., Wang, B.B., Wang, F.H., Liu, Q., Luo, Q.H., Cai, K.Z., Zhong, R.M., 2020. Biological control of sheep gastrointestinal nematode in three feeding systems in Northern China by using powder drug with nematophagous fungi. *Biocontrol Sci Techn* 30, 701-715.
- Lubega, G.W., Prichard, R.K., 1991. Beta-tubulin and benzimidazole resistance in the sheep nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 47, 129-137.
- Lyndal-Murphy, M., Ehrlich, W.K., Mayer, D.G., 2014. Anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in inland southern Queensland. *Aust Vet J* 92, 415-420.
- Malatkova, P., Wsol, V., 2014. Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 46, 96-123.
- Malik, V., Black, G.W., 2012. Structural, Functional, and Mutagenesis Studies of Udp-Glycosyltransferases. *Adv Protein Chem Str* 87, 87-115.
- Marschall, H.U., Oppermann, U.C.T., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Höög, J.O., Jörnvall, H., 2000. Human liver class I alcohol dehydrogenase  $\gamma\gamma$  isozyme:: The sole cytosolic  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of iso bile acids. *Hepatology* 31, 990-996.
- Martin, R.J., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 154, 11-34.
- Matouskova, P., Lecova, L., Laing, R., Dimunova, D., Vogel, H., Raisova Stuchlikova, L., Nguyen, L.T., Kellerova, P., Vokral, I., Lamka, J., Szotakova, B., Varady, M., Skalova, L., 2018. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8, 420-429.
- Matouskova, P., Vokral, I., Lamka, J., Skalova, L., 2016. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends Parasitol* 32, 481-491.
- McCavera, S., Rogers, A.T., Yates, D.M., Woods, D.J., Wolstenholme, A., 2009. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology* 75, 1347-1355.
- McDonnell, A.M., Dang, C.H., 2013. Basic review of the cytochrome p450 system. *J Adv Pract Oncol* 4, 263-268.
- McKellar, Q.A., Jackson, F., 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol* 20, 456-461.
- Menzel, R., Bogaert, T., Achazi, R., 2001. A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible. *Arch Biochem Biophys* 395, 158-168.
- Menzel, R., Sturzenbaum, S., Barenwaldt, A., Kulas, J., Steinberg, C.E., 2005. Humic material induces behavioral and global transcriptional responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol* 39, 8324-8332.
- Naeem, M., Iqbal, Z., Roohi, N., 2020. Ovine haemonchosis: a review. *Trop Anim Health Prod* 53, 19.
- Navratilova, M., Raisova Stuchlikova, L., Matouskova, P., Ambroz, M., Lamka, J., Vokral, I., Szotakova, B., Skalova, L., 2021. Proof of the environmental circulation of veterinary drug albendazole in real farm conditions. *Environ Pollut* 286, 117590.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., et al., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession

- numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12, 1-51.
- Nielsen, P., Rasmussen, F., 1983. Pharmacokinetics of levamisole in goats and pigs. *Veterinary Pharmacology and Toxicology*, 241-244.
- Nordling, E., Jornvall, H., Persson, B., 2002. Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modeling. *Eur J Biochem* 269, 4267-4276.
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol* 142, 1-15.
- Oppermann, U., 2007. Carbonyl reductases: The complex relationships of mammalian carbonyl and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu Rev Pharmacol* 47, 293-322.
- Osmani, S.A., Bak, S., Moller, B.L., 2009. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70, 325-347.
- Palotto, L.M., Dilks, C.M., Park, Y.J., Smit, R.B., Lu, B.T., Gopalakrishnan, C., Gilleard, J.S., Andersen, E.C., Mains, P.E., 2022. Interactions of *Caenorhabditis elegans*  $\beta$ -tubulins with the microtubule inhibitor and anthelmintic drug albendazole. *Genetics* 221.
- Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Lespine, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Krucken, J., Hodgkinson, J.E., 2017. P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7, 388-398.
- Penning, T.M., 2015. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact* 234, 236-246.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jörnvall, H., Kavanagh, K.L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maserk, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions* 178, 94-98.
- Playford, M.C., Smith, A.N., Love, S., Besier, R.B., Kluver, P., Bailey, J.N., 2014. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). *Aust Vet J* 92, 464-471.
- Porto, R.S., Pinheiro, R.S.B., Rath, S., 2021. Leaching of benzimidazole antiparasitics in soil columns and in soil columns amended with sheep excreta. *Environ Sci Pollut Res Int* 28, 59040-59049.
- Prchal, L., Podlipna, R., Lamka, J., Dedkova, T., Skalova, L., Vokral, I., Lecova, L., Vanek, T., Szotakova, B., 2016. Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 13015-13022.
- Qasba, P.K., Ramakrishnan, B., Boeggeman, E., 2005. Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 30, 53-62.
- Raisova Stuchlikova, L., Kralova, V., Lnenickova, K., Zarybnicky, T., Matouskova, P., Hanusova, V., Ambroz, M., Subrt, Z., Skalova, L., 2018. The metabolism of flubendazole in human liver and cancer cell lines. *Drug Test Anal.*
- Robinson, M.W., Lawson, J., Trudgett, A., Hoey, E.M., Fairweather, I., 2004. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res* 92, 205-210.

- Rocha, R.A., Bricarello, P.A., Silva, M.B., Houdijk, J.G., Almeida, F.A., Cardia, D.F., Amarante, A.F., 2011. Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 181, 229-238.
- 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.
- Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., de Waal, T., Skuce, P., Charlier, J., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., Hendrickx, G., Vercruyse, J., Morgan, E.R., 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet Rec* 176, 546.
- Rothwell, J., Sangster, N., 1997. *Haemonchus contortus*: The uptake and metabolism of closantel. *International Journal for Parasitology* 27, 313-319.
- Saccareau, M., Salle, G., Robert-Granie, C., Duchemin, T., Jacquiet, P., Blanchard, A., Cabaret, J., Moreno, C.R., 2017. Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasit Vectors* 10, 201.
- Sakkas, P., Jones, L.A., Houdijk, J.G., Athanasiadou, S., Knox, D.P., Kyriazakis, I., 2013. Leucine and methionine deficiency impairs immunity to gastrointestinal parasites during lactation. *Br J Nutr* 109, 273-282.
- Sangster, N.C., Gill, J., 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol Today* 15, 141-146.
- Sarai, R.S., Kopp, S.R., Coleman, G.T., Kotze, A.C., 2014. Drug-efflux and target-site gene expression patterns in *Haemonchus contortus* larvae able to survive increasing concentrations of levamisole in vitro. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4, 77-84.
- Shi, S.M., Di, L., 2017. The role of carbonyl reductase 1 in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13, 859-870.
- Schwarz, E.M., Korhonen, P.K., Campbell, B.E., Young, N.D., Jex, A.R., Jabbar, A., Hall, R.S., Mondal, A., Howe, A.C., Pell, J., Hofmann, A., Boag, P.R., Zhu, X.Q., Gregory, T., Loukas, A., Williams, B.A., Antoshechkin, I., Brown, C., Sternberg, P.W., Gasser, R.B., 2013. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biol* 14, R89.
- Sinott, M.C., de Castro, L.L., Leite, F.L., Gallina, T., De-Souza, M.T., Santos, D.F., Leite, F.P., 2016. Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep. *J Helminthol* 90, 68-73.
- Skalova, L., Bousova, I., Machala, M., Pavek, P., Podlipna, R., Soucek, P., Szotakova, B., Vondracek, J., Wsol, V., 2011. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Univerzita Karlova v Praze.
- Smith, J.M., Prichard, R.K., 2002. Localization of p-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *J Parasitol* 88, 612-620.
- Sterbova, K., Rychla, N., Matouskova, P., Skalova, L., Raisova Stuchlikova, L., 2023. Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Vet Res* 54, 19.
- Stuchlikova, L., Jirasko, R., Vokral, I., Valat, M., Lamka, J., Szotakova, B., Holcapek, M., Skalova, L., 2014. Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Test Anal* 6, 1055-1062.
- Stuchlikova, L.R., Matouskova, P., Vokral, I., Lamka, J., Szotakova, B., Seckarova, A., Dimunova, D., Nguyen, L.T., Varady, M., Skalova, L., 2018. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults:

- Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8, 50-58.
- Sutherland, I., Scott, I., 2010. *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control*. Wiley-Blackwell.
- Svobodová, V., Svoboda, M., 1995. *Klinická parazitologie psa a kočky*. Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat.
- Thompson, D.P., Ho, N.F., Sims, S.M., Geary, T.G., 1993. Mechanistic approaches to quantitate anthelmintic absorption by gastrointestinal nematodes. *Parasitol Today* 9, 31-35.
- Thorsoe, K.S., Bak, S., Olsen, C.E., Imberty, A., Breton, C., Moller, B.L., 2005. Determination of catalytic key amino acids and UDP sugar donor specificity of the cyanohydrin glycosyltransferase UGT85B1 from *Molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses*. *Plant Physiol* 139, 664-673.
- Thorson, J.S., Hosted, T.J., Jiang, J.Q., Biggins, J.B., Ahlert, J., 2001. Nature's carbohydrate chemists: The enzymatic glycosylation of bioactive bacterial metabolites. *Curr Org Chem* 5, 139-167.
- Turnbull, F., Jonsson, N.N., Kenyon, F., Skuce, P.J., Bisset, S.A., 2018. P-glycoprotein-9 and macrocyclic lactone resistance status in selected strains of the ovine gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8, 70-80.
- Urguhart, G.M., Jennings, F.W., Dunn, A.M., Duncan, J.L., Armour, J., 1996. *Veterinary Parasitology*. Wiley.
- van Dijk, J., Morgan, E.R., 2011. The influence of water on the migration of infective trichostrongyloid larvae onto grass. *Parasitology* 138, 780-788.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Gerber, H.M., Alves, R.M., 1989. The problem of escalating resistance of *Haemonchus contortus* to the modern anthelmintics in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 56, 41-49.
- Vokral, I., Bartikova, H., Prchal, L., Stuchlikova, L., Skalova, L., Szotakova, B., Lamka, J., Varady, M., Kubicek, V., 2012. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology* 139, 1309-1316.
- Vokrál, I., Jedlicková, V., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Skálová, L., Lamka, J., Holcapek, M., Szotáková, B., 2013. The metabolic fate of ivermectin in host and parasite. *Parasitology* 140, 361-367.
- Vokral, I., Jirasko, R., Stuchlikova, L., Bartikova, H., Szotakova, B., Lamka, J., Varady, M., Skalova, L., 2013. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet Parasitol* 196, 373-381.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, J.S., Skuce, P.J., 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology* 134, 1077-1086.
- Widiarso, B.P., Kurniasih, K., Prastowo, J., Nurcahyo, W., 2018. Morphology and morphometry of *Haemonchus contortus* exposed to *Gigantochloa apus* crude aqueous extract. *Vet World* 11, 921-925.
- Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180, 99-105.



Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., Prichard, R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91, 327-335.