

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství**

## **P-glykoprotein a rezistence na anthelmintika u *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová)**

**Renáta Šormová  
Královéhradecký kraj**

**Dvůr Králové nad Labem 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství

**P-glykoprotein a rezistence na anthelmintika  
u *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová)**

**P-glycoprotein and anthelmintic resistance  
in *Haemonchus contortus***

**Autor:** Renáta Šormová

**Škola:** Gymnázium Dvůr Králové, nám. Odboje 304, 544 01

**Kraj:** Královéhradecký kraj

**Konzultant:** Mgr. Pavlína Kellerová, RNDr. Jana Dobroruková

Dvůr Králové nad Labem 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Dvoře Králové nad Labem dne 16. 3. 2020.....

Renáta Šormová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Pavlíně Kellerové za to, že mi poskytla příležitost uskutečnit svoji Středoškolskou odbornou činnost pod jejím odborným vedením. Za její trpělivost, ochotu a vřelost, se kterou mi pomáhala při vypracování mé práce. Velký dík patří i RNDr. Janě Dobrorukové za dodávání cenných zdrojů, informací a potřebných připomínek při tvorbě písemné části mé práce ve škole. Děkuji též katedře Biochemických věd, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za poskytnuté zázemí během experimentální části.

## Anotace

Tato práce se zabývá mechanismy vzniku rezistence parazitů hospodářských zvířat na anthelmintická léčiva. Na molekulární úrovni srovnává konstitutivní expresi genů kódujících transmembránový přenašeč P-glykoprotein u parazitární hlístice vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). P-glykoprotein odpovídá za přenášení léčiv a ostatních cizorodých látek z buněk do jejich extracelulárního prostoru odkud jsou vylučovány z organismu. Zvýšená exprese genu a s ní související množství P-glykoproteinu na cytoplazmatických membránách buněk může mít za následek vznik a rozvoj rezistence nejen u *H. contortus*, ale i další významných parazitů hospodářských zvířat.

Potenciální mechanismus vzniku rezistence byl zjišťován pozorováním a porovnáváním exprese genů mezi citlivým (ISE), rezistentním (IRE) a multi-rezistentním (WR) kmenem *H. contortus*. Provedený experiment měl několik částí: kultivace a izolace dospělců tří kmenů *H. contortus*, izolace RNA, ošetření RNA pro reverzní transkripci, reverzní transkripce RNA na cDNA a kvantitativní PCR v reálném čase. Ze získaných dat zpracovaných pomocí statistické analýzy dat delta-delta Ct skutečně vyplývá, že by několik určitých genů mohlo mít vliv na vznik helminto-rezistence. Tento výsledek může v budoucnu napomoci vývoji nových léčiv a strategií v boji proti parazitárním hlísticím.

**Klíčová slova:** *Haemonchus contortus*, P-glykoprotein, exprese genů, rezistence

## Annotation

This work deals with mechanism of development anthelmintic resistance of farm animal parasites. At the molecular level it compares the constitutive expression of genes encoding the transmembrane transporter P-glycoprotein in a parasitic nematode *Haemonchus contortus*. P-glycoprotein is responsible for drug transport and other exogenic substrates from cells to their extracellular space from where they are excreted from the organism. Overexpression of the gene and the related amount of P-glycoprotein on the cytoplasmic membranes of target cells may result in the development of resistance not only in *H. contortus* but also in other important parasites of farm animals.

The potential mechanism of resistance development was ascertained by observing and comparing of gene expression between susceptible (ISE), resistant (IRE) and multi-resistant (WR) strains of *H. contortus*. The performed experiment had several parts: *H. contortus* adults' cultivation and isolation, RNA isolation, RNA treatment for reverse transcription, reverse transcription of RNA to cDNA, and real-time quantitative PCR. The data, which were processed by using statistical analysis of delta-delta Ct indicate that several genes could have an effect on helminth-resistance. This result might be helpful in the future in order to develop new drugs and strategies for fight with parasitic nematodes.

**Keywords:** *Haemonchus contortus*, P-glycoprotein, resistance, gene expression

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Přehled literatury .....	8
2.1	Problematika parazitóz .....	8
2.1.1	Prevalence helmintóz v České republice .....	9
2.2	Hemonchóza .....	10
2.2.1	Haemonchus contortus .....	11
2.2.2	Léčba .....	14
2.2.3	Rezistence na anthelmintika .....	16
2.3	P-glykoprotein (P-gp) .....	19
2.3.1	Vliv P-glykoproteinu na vznik rezistence .....	20
3	Cíl práce .....	22
4	Metodika .....	22
4.1	Modelový organismus .....	22
4.2	Získávání dospělců <i>H. contortus</i> – Agarová metoda .....	22
4.3	Fixace dospělců <i>H. contortus</i> .....	25
4.4	Izolace RNA .....	25
4.5	Ošetření RNA pro reverzní transkripci .....	27
4.6	Reverzní transkripce (syntéza cDNA) .....	28
4.7	Real-time PCR .....	28
4.8	Statistická analýza dat .....	29
5	Výsledky .....	30
5.1	Izolovaná RNA .....	30
5.2	Výpočet RNA pro ošetření DNAsou .....	31
5.3	Analýza qPCR .....	32
5.3.1	Princip metody .....	32
5.3.2	Vlastní výsledky qPCR .....	34
6	Diskuze .....	37
7	Závěr .....	39
8	Použité zkratky .....	40
9	Literatura .....	42

# 1 Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je významným původcem gastrointestinálního onemocnění malých přežvýkavců zvaného hemonchóza. Postižení jedinci slábnou a vykazují známky anémie, která je způsobena sáním krve *H. contortus* na sliznici slezu. Toto onemocnění snižuje užitkovost, čímž ohrožuje produkci malých i velkých chovů hospodářských zvířat po celém světě. Často končí úhynem vyčerpaných jedinců. Významnou roli hraje i patogenita tohoto druhu. Samička denně klade několik tisíc vajíček, která se s trusem dostávají na pastvinu a infikují další jedince. Podstatná je tudíž prevence a včasný záchyt infekce.

Prevence a léčba hemonchózy se provádí podáváním anthelmintických léčiv. Závažným problémem je však vznik rezistence vůči hlavním třídám používaných anthelmintik. Rezistence se vyvíjí zejména z důvodu častého a chybného podávání léčiv. Anthelmintika proti hemonchóze jsou proto často účinná pouze několik let od jejich uvedení na trh.

Mechanismy a faktory vzniku rezistence nejsou v dnešní době dostatečně prozkoumány a vyžadují vyšší pozornost. Je pravděpodobné, že vliv na rozvoj rezistence má zvýšená exprese genů kódující transmembránový přenašeč P-glykoprotein (P-gp). P-glykoprotein, umístěný na cytoplazmatické membráně parazita, přenáší léčiva z buňky do jejího extracelulárního prostoru. Předložená práce je zaměřena na rozdíly v expresi P-gp genů mezi citlivým, rezistentním a multi-rezistentním kmenem *H. contortus*.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Problematika parazitóz

„Parazitismus je jednou z nejvíce rozšířených životních strategií organismů a hraje důležitou roli v evoluci.“ „Jedná se o vztah mezi organismy, při kterém jeden z partnerů má z tohoto soužití prospěch, a druhý škodu.“

„Z hlediska životních cyklů parazity rozdělujeme na jednohostitelské (monoxenní, např. giardie) a vícehostitelské (heteroxenní, např. echinokok).“ „Podle toho, kde probíhá sexuální fáze rozmnožování, potom hostitele v rámci vícehostitelských cyklů dělíme na mezihostitele (žádné množení nebo pouze asexuální množení) a definitivní (finální) hostitele (sexuální část cyklu).“ Některé z helmintóz jsou současně zoonózami, což znamená, že jsou schopny přenosu ze zvířete na člověka. „Podle toho, kde se parazit v hostiteli nalézá, rozlišujeme endoparazity a ektoparazity. Endoparaziti žijí uvnitř těla hostitele (např. giardie a tasemnice) a můžeme je rozdělit na vnitrobuněčné (intracelulární) a mimobuněčné (extracelulární), kteří žijí mezi buňkami hostitele nebo uvnitř jeho tělních dutin. Ektoparaziti se vyskytují na povrchu těla hostitele (např. vši).“

Jedněmi z významných parazitárních infekcí jsou helmintózy vyvolané parazitickými červy (helminthy) nebo jejich infekčními stádii. [23] Helminti jsou velmi různorodou skupinou živočichů, do níž bývají tradičně zahrnováni zástupci motolic (Trematoda), tasemnic (Cestoda), jednorodých (Monogenea) a hlístic (Nematoda). Helmintózy, jejichž původcem je parazit z rodu *Haemonchus*, jsou označovány jako hemonchózy. Z hlediska ontogenetického vývoje jsou helminti velmi variabilní skupinou. „Kromě dospělců a vajíček mohou mít i poměrně velký počet morfologicky odlišných larválních stádií, využívajících během ontogenetického vývoje i několik typů hostitelů.“

„Šíření parazitů v populacích hostitele, které může probíhat mezi nepříbuznými jedinci, se nazývá horizontální přenos. Sexuálně přenosní paraziti se přenášejí mezi sexuálními partnery při rozmnožování příslušného hostitelského druhu. Některé paraziti se mohou přenášet přednostně či dokonce výhradně na potomstvo infikovaného hostitele, pak se tento přenos nazývá vertikální.“ [41]

Parazité způsobují značné ekonomické ztráty chovatelům malých přežvýkavců a představují závažný problém pro celosvětovou hospodářskou produkci. „Silné parazitární infekce nezpůsobují pouze ztráty přímé (zvýšený úhyn, vyšší podíl konfiskovaných částí těla na jatkách a nižší kvalita masa), ale i ztráty nepřímé – snížení produkce (výrazně zhoršená užitkovost, především hmotnost odstavovaných jehňat), mají negativní vliv na reprodukci (výrazně snížená plodnost), způsobují zvýšenou vnímavost k ostatním onemocněním (zvýšený výskyt infekčních i neinfekčních chorob a sekundárně zvýšený úhyn).“ [13]

„Význam helmintů jako patogenů člověka i zvířat je nesporný, o čemž svědčí odhady počtu infikovaných lidí. Například schistosomy parazitují asi u 200 milionů a ohrožují kolem 600 milionů osob, počet lidí infikovaných lymfatickými filariemi je asi 120 milionů. Kolem



miliardy osob je nakaženo škrkavkami. Téměř jedné miliardy dosahuje odhad počtu infekcí tenkohlavci (*Trichuris trichiura*).“ [41]

Ochranu hostitelů před helminty zajišťují látky ze skupiny anthelmintických léčiv, jejichž nejvýznamnějšími třídami jsou benzimidazoly, makrocyclické laktony a nikotinové agonisté. Nicméně svět v posledních letech sužuje rozvíjející se rezistence helmintů vůči těmto léčivům, která ohrožuje řadu chovů hospodářských zvířat. Proto je nutné věnovat problematice rezistence vyšší pozornost a zohledňovat ji v preventivních chovatelských opatřeních.

### 2.1.1 Prevalence helmintózy v České republice

„Nejpodstatnějšími parazitologickými nálezy v českých chovech jsou nálezy plicní, střevní a slezové červivosti, motolic a tasemnic.“ [13] K původcům plicní červivosti patří zástupci čeledi Metastrongylidae, Dictyocaulidae (např. *Dictyocaulus filaria* způsobující onemocnění diktyokaulóza) a Protostrongylidae (např. *Mullerius capillaris* způsobující onemocnění protostrongylidóza). Mezi významné parazity žijící ve slezu a tenkém střevě jsou *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia curticei*, *Nematodirus filicollis* a četné druhy rodu *Trichostrongylus*. Původci jaterní monoličnatosti jsou *Dicrocoelium dendriticum* a *Fasciola hepatica*, která již v období migrace larev může způsobit tzv. akutní fasciolózu. Nejvýznamnější zástupci tasemnic žijících v tenkém střevě hostitele jsou *Moniezia benedeni*, *Moniezia expansa*. [25]

„Prevalenci gastrointestinálních hlístic u ovcí v České republice publikovali Langrová et al. (2008). Nejčastěji se u ovcí v České republice vyskytovaly hlístice rodu *Trichostrongylus* (*Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis* i *Trichostrongylus vitrinus*) a *Teladorsagia circumcincta*.“ „Přibližně u 50 % ovcí v České republice se vyskytuje druh tasemnice *Moniezia expansa*. (viz tab. 1)“ [28]

Tab. 1: Prevalence gastrointestinálních hlístic v České republice [28]

Druhy řádu Strongylida:	Prevalence (%)
<i>Trichostrongylus axei</i>	87.50
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	75.00
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	75.00
<i>Chabertia ovina</i>	68.75
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	62.50
<i>Nematodirus filicollis</i>	52.08
<i>Oesophagostomum venulosum</i>	50.00
<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	47.90
<i>Nematodirus battus</i>	31.25
<i>Haemonchus contortus</i>	29.17
<i>Cooperia curticei</i>	18.75
<i>Ostertagai trifurcata</i>	6.25

Kudrnáčová (2012) prováděla studii, jejímž cílem bylo zjistit výskyt a sezónnost gastrointestinálních parazitů u ovce domácí (*Ovis aries*). Od března 2009 do února 2010 uskutečnila průzkum parazitologického stavu stáda (15 beranů, 15 ovcí a 15 jehňat) na severu České republiky. Ze všech parazitů v této studii byl nejběžnějším zástupcem rod *Trichostrongylus* (58 % u bahnic a 69 % u beranů). [19]

## 2.2 Hemonchóza

Hemonchóza je gastrointestinální parazitóza, jejímiž původci jsou zástupci rodu *Haemonchus*. „Nejčastěji postihuje jehňata ve věku 6-10 týdnů.“ „K největší vlně invazí dochází v našich podmínkách v období května a června, jsou ale běžné i u starších jehňat v období pozdního léta a podzimu.“ [13] Hemonchóza se vyskytuje s různou mírou nástupu a úmrtnosti, která závisí na množství přijatých larev parazitů hostiteli. Projevy infekce jsou spojeny s úbytkem krve v organismu hostitele způsobeného sáním krve jedinci *H. contortus*. Zahrnují anémii, projevující se bledostí sliznic spojivek. Jejich barva se v nejzávažnějších případech mění z běžné červené až na bílou. [3] Tato změna se využívá k identifikaci jedinců, u kterých je podání léčiva již nezbytné, prostřednictvím metody zvané FAMACHA (obr. 1). Porovnáním zbarvení sliznice spojivek se speciální kartou, na níž jsou znázorněny různé barevné stupně anémie, lze snadno zjistit úroveň infekce daného jedince. [15]



Obr. 1: Použití systému FAMACHA v praxi [34]

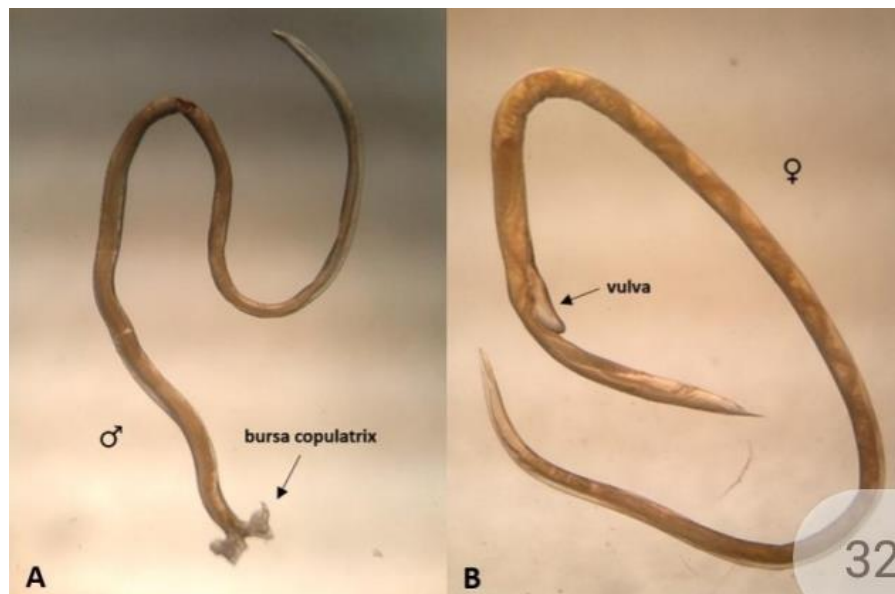
Se zvyšující se ztrátou krve zvířata slábnou a jsou neschopna aktivního pohybu. Výkaly bývají tmavé, což je způsobeno přítomností krve, vodnaté a silně páchnoucí. Během této infekce může též dojít k úbytku hmotnosti, tvorbě edému či odlupování pramenů vlny.

U jedinců se však obvykle míra náchylnosti k hemonchóze liší. Podíl zvířat ve stádu postižených různými stupni onemocnění je z velké části určen geneticky a významně zprostředkován jejich příjmem nutričně vyvážené stravy. [3]

### 2.2.1 *Haemonchus contortus*

*Haemonchus contortus* (vlasovka slezová) patří mezi hematofágní hlístice malých přežvýkavců. Řadíme jej do třídy *Secernentea*, řádu *Strongylida*, nadčeledi *Trichostrongyloidea*, čeledi *Trichostrongylidae*. [41]

Je nejrozsáhleji studovaným trichostrongylidním nematodem s ohledem na anthelmintickou rezistenci. Ukázalo se, že má schopnost vyvinout rezistenci ke všem hlavním třídám anthelmintických léčiv. Kromě toho byl tento druh také předně studován, neboť je díky svým biologickým a fyziologickým znakům výborným experimentálním modelem. K těmto faktorům patří značná plodnost, ideální velikost dospělých červů, snadné zavádění a udržování infekcí několika tisíců červů v hostitelích. [18]



Obr. 2: *H. contortus* – morfologické rozdíly mezi samcem a samicí [24]

#### Morfologie

„Hlístice jsou velmi početnou, morfologicky i biologicky různorodou skupinou helmintů.“ [35] „Popsáno je celkem na 30 000 druhů, ale předpokládán je mnohem větší počet (až 0,5 milionu druhů).“ „Tělo mají válcovitého až nit'ovitého tvaru, nesegmentované, dlouhé od několika milimetrů po několik decimetrů i metrů.“ [17] Povrch těla hlístic je tvořen mnohvrstevnou kutikulou, která *H. contortus* chrání před nepříznivými podmínkami v trávicím traktu hostitele. Kutikula hlístic bývá rozčleněna hlubokými zářezy do prstencovitých útvarů, které připomínají článkování - pseudosegmentace. [35] Plní ochrannou a opornou funkci (vnější skelet neboli exoskelet). Jedinci ji během růstu několikrát svlékají. „Pod kutikulou se nachází pokožka (hypodermis)“ a podélné hladké svalstvo. Stahy svalstva nahrazují střevní peristaltiku. „Mezi tělní stěnou a trávicím traktem je kompaktní tělní dutina – pseudocoel, vyplněná tekutinou. Ta zde nahrazuje oběhovou soustavu a funguje jako hydrostatická opora pro svalovinu. Trávicí soustava a pohlavní orgány jsou v pseudocoelu uloženy volně, přirostlé jsou pouze na svých vývodech. Tvar těla způsobuje, že i orgánové soustavy mají protáhlou, nit'ovitou formu.“ [17]

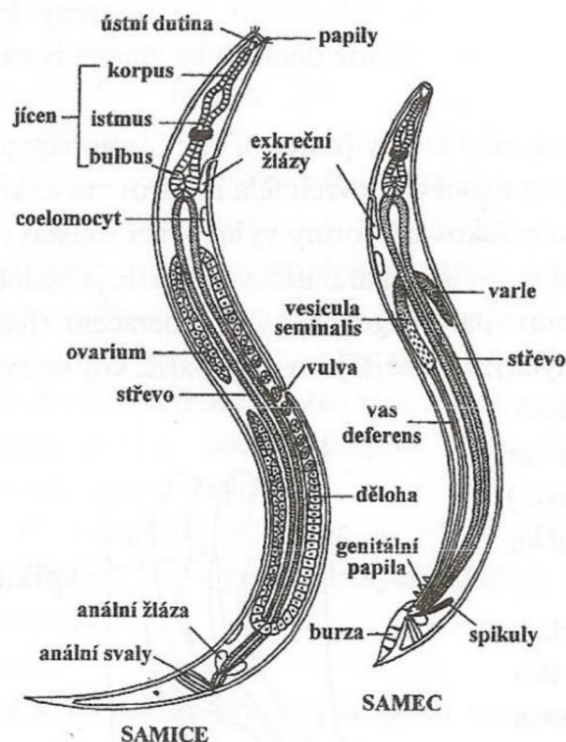
Morfologie samce a samice hlístice je zobrazena na obrázku 3. V přední části se nachází dutina ústní (kapsula). Okolo ústního otvoru hlístic bývají rozmístěny hlavové papily, které slouží jako chemorecepční orgány a zároveň i jako orgány hmatu. Níže pod hlavovým koncem jsou šíjové papily neboli deiridy. „Do všech těchto papil ústí nervová vlákna.“ Okolo ústního otvoru mohou být umístěny pysky (labia). Na dně ústní dutiny bývají zuby či lišтовité útvary. Na spodní část dutiny ústní nasedá jícen, který se směrem k zadnímu konci často rozšiřuje v kulovitý útvar (bulbus). Na jícen navazuje ve střední části střevo, které na povrch ústí řitním otvorem u zadního konce těla. „U samečků se v zadní části střeva připojují vývody pohlavních žláz a spolu s ním ústí do kloaky.“ „U samic střevo vyúsťuje do rektálního otvoru.“ [35]

Hlístice jsou odděleného pohlaví (gonochoristé) s viditelným sexuálním dimorfismem. Samci jsou obvykle menší, s odlišně utvářenou koncovou částí těla (obr. 2). „Pohlavní orgány samečků bývají nepárové.“ Tvoří je varle přecházející v chánovod, semenný váček a vývodní váček, který ústí do kloaky. [35] „Zadní konec těla samce bývá zahnut či spirálovitě stočen a může tvořit rozšířeninu – kopulační bursu (bursa copulatrix).“ „Další součástí samčí pohlavní soustavy jsou přídatné kopulační struktury jako sklerotizované párové jehlice – spikuly či nepárové gubernakulum.“ [17] Pohlavní orgány samic jsou párové. „Ve vaječnicích se vytvářejí vaječné buňky, které procházejí vejcovodem do dělohy, kde se po oplození samčím spermatem vytvářejí vajíčka. Vajíčka odcházejí z těla samic vulvou buď v pouze rozrýhovaném stavu (samičky oviparní), nebo již s vyvinutými larvami (samičky ovoviviparní), u mnoha skupin hlístic odcházejí z těla samic již vyvinuté larvy (samičky viviparní).“ [35]

„Dýchací ani cévní systém není vytvořen. Výměna plynů se děje celým povrchem těla, při přenosu se někdy může uplatnit hemoglobin rozpuštěný v tělní tekutině. Některé druhy mohou částečně přejít na anaerobní metabolismus.“ [17]

„Centrální nervový systém tvoří nervový prstenec, který obklopuje jícen a spojuje nervová ganglia. Z tohoto prstence vychází několik nervových stvolů, které směřují jak do přední části těla, tak i do zadní, kde jsou navzájem spojeny různým počtem příčných spojek (komisur). [35]

*H. contortus* má bílou průhlednou barvu, ale zástupci se často zdají být červení, což je způsobeno krví hostitele obsažené v trávicí trubici. Samci dosahují délky 12-22 mm a na konci těla mají dobře vyvinutou kopulační burzu. Samice dosahují 18-30 mm, výrazně prosvítá zažívající aparát naplněný krví, kolem něhož se spirálovitě vine děloha. [8]

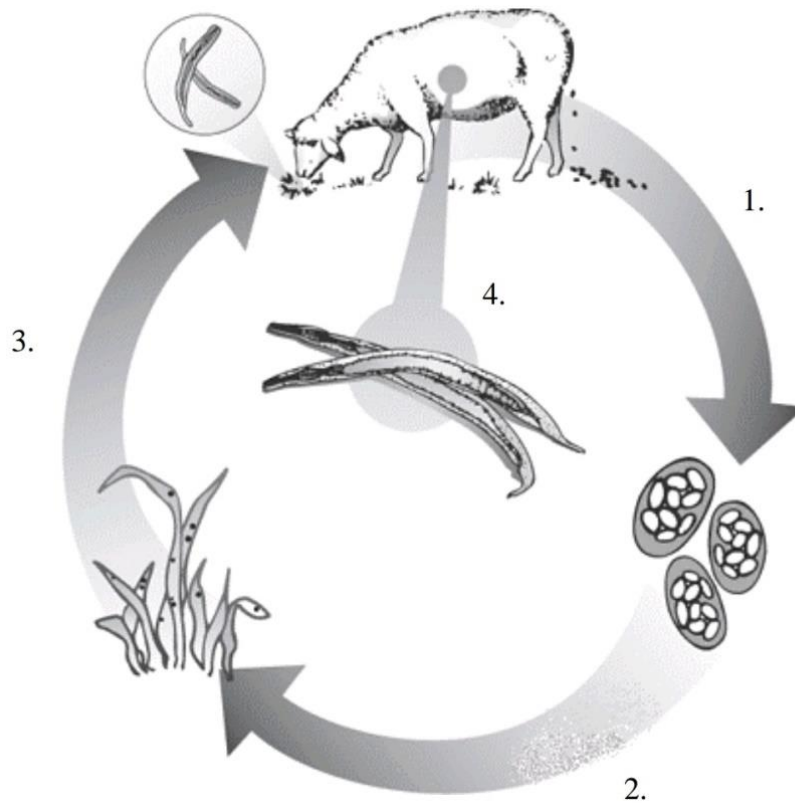


Obr. 3: Morfologie samce a samice hlístice [14]

### Vývojový cyklus *H. contortus*

*H. contortus* se řadí mezi geohelmintry neboli helminty s přímým životním cyklem, který je zobrazen na obrázku 4.

Dospělci žijí ve slezu, kde produkují až 5 000 vajíček denně. Vajíčka vycházejí společně s exkrementy z těla hostitele do vnějšího prostředí. [31, 35] „Vajíčko je vysoce rezistentní na vysušení a vůči nízkým teplotám, na pastvinách proto může přežít až 1 rok.“ [13] „Optimální podmínky pro vývoj vajíček jsou 25-30 °C a vlhkost 70-80 %.“ [31] Z vajíček se za takovýchto podmínek již velmi brzo (za 14-17 hodin) líhnou larvy I. stadia (L1), které se v průběhu následujících 80-90 hod. 2x svlékají a vyvíjí se v larvu II. stadia (L2). L1 a L2 se živí bakteriemi přítomnými na pastvině. „Mají schopnost rozsáhlé horizontální i vertikální migrace po pastvinách, zejména za vlhka.“ Odolnost larev ve vnějším prostředí roste se stupněm invaze. [8] Larvy III. stadia (L3) již potravu nepřijímají. Jedná se o stadium, které je velmi odolné vůči vnějším podmínkám. [31] „Snášejí teploty i pod 0 °C, přes zimu však značná část larev hyne. Přímé sluneční světlo je také usmrcuje.“ Schopné nákazy zůstávají asi 4-6 měsíců. [8] L3 nazýváme larvou infekční, které přichází do hostitele pasivně perorálně, s potravou. [35] Ve slezu proniká do sliznice, kde dospívá do IV. stadia (L4). V tomto stadiu může dojít k hypobióze, což je stav, který nastává za nepříznivých podmínek. Hypobióza bývá ovlivněna prostředím (v žaludku i mimo hostitele), odpovědí imunitního systému na parazitózu a dalšími faktory. Nejčastěji probíhá během chladných měsíců, případně během období sucha. Larva zastaví svůj vývoj, zpomalí metabolismus a v hostiteli pouze přežívá, dokud nastane období s příznivějšími podmínkami. Po znovuoživení vývoje L4 opouští mukózu a po dalším svlékání se následujících 15-18 dní vyvíjí v dospělého jedince připraveného kopulovat. [31]



Obr. 4: 1. Vajíčka vyloučená dospělými jedinci *H. contortus* s trusem do vnějšího prostředí 2. Líhnutí larev na vzduchu a jejich dospívání do infekčního stádia 3. Příjem infekční larvy hostitelem 4. Život dospělých červů ve slezu [6]

### 2.2.2 Léčba

V našich podmínkách je častá koexistence několika endoparazitů, proto je při prevenci endoparazitóz nutný systémový přístup.

„Doba odčervení, jeho četnost a volba použitého preparátu je založena na místních znalostech, průběhu počasí, druhovém nálezu parazitů a počtech parazitárních vajíček v trusu zjištěných při kontrolním vyšetření. „Ideální anthelmintikum“ by mělo být bezpečné pro zvířata, ale vysoce efektivní proti dospělcům a nedospělým stádiím vyskytujících se parazitů, rychle, úplně metabolizované, dostupné v nejrůznějších aplikačních formách, ekonomické a kompatibilní s dalšími léky.“

„Každému odčervení stáda by mělo předcházet koprologické vyšetření“. Při tomto vyšetření je laboratorním vyšetřením určen druh parazitů a počet jejich vajíček na 1 g trusu (kvantitativní koprologie). „Z počtu nalezených vajíček se odvodí, zda je odčervení nutné (léčbu vyžadují nálezy 10 000 vajíček v 1 g trusu).“ Odčervení bez koprologického vyšetření je zásadní chybou. „Nevíme, jaký typ endoparazitů se v chovu vyskytuje a který preparát k odčervení použít, a pokud není odčervení nutné, zbavíme stádo i střevních parazitů, které potřebuje k formování imunity.“

„Prevence parazitóz musí splnit tato kritéria:

1. Zabránit těžkým invazím, u nichž dochází k velmi častým úhynům.
2. Snížit kontaminaci pastvin vývojovými stádii parazitů.
3. Minimalizovat dopad parazitóz na užitkovost zvířat.
4. Formou koprologických vyšetření sledovat účinnost odčervení a vývoj imunity nebo rezistence parazitů.“ [13]

## **Anthelmintika**

„Anthelmintika jsou léčiva většinou syntetického, částečně biosyntetického původu“. V praxi se užívají proti více třídám endoparazitů i ektoparazitů. „Antiparazitární léčivé přípravky jsou často založeny na kombinaci anthelmintik nebo anthelmintik a antiectoparazitik.“ [22]

„Anthelmintika lze podávat ve formě roztoku (benzimidazoly a ivermektiny), injekčně (imidathiazoly a ivermektiny) nebo ve formě medikace jaderného krmiva. Tato aplikační forma je ale z důvodu možnosti vzniku parazitární rezistence nejméně vhodná.“ [13]

„Léčiva s účinkem proti původcům nematodóz jsou v současnosti řazena do skupin makrocyclických laktonů, benzimidazolů, imidazothiazolů a léčiv ostatních chemických struktur.“ [22]

### **I. Benzimidazoly (BZ)**

Benzimidazoly jsou nejrozsáhlejší skupinou anthelmintik odvozenou od jediné chemické struktury. „Jsou to léčiva s antinematodní, z části s antitrepatodní i anticestodní aktivitou.“ „Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku.“ „Většina léčiv skupiny působí jak proti vývojovým, tak i dospělým stádiím helmintů, některé i ovocidně.“

„Mechanismus účinku je založen na inhibici  $\beta$ -tubulinových subjednotek nezbytných pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Jejich narušená tvorba se návazně projeví žádoucím poškozením funkčnosti celé parazitární buňky. Afinita BZ k parazitárnímu typu  $\beta$ -tubulinu je mnohonásobně vyšší než k  $\beta$ -tubulinu buněk ošetřovaných zvířat, což umožňuje jejich účinné dávkování bez vedlejších projevů u léčených zvířat.“ [22]

„Od zavedení thiabendazolu (TBZ) v roce 1961 byly na trh postupně uvedeny další přípravky: fenbendazol, mebendazol, albendazol, oxfendazol, oxibendazol, parbendazol a kambendazol.“ [37]

### **II. Makrocyclické laktony (ML)**

„Makrocyclické laktony jsou léčiva biosyntetického původu s antinematodní a antiectoparazitární účinností. Jsou členěny na avermektiny a milbemyciny.“ Pozměňují funkčnost glutamátu, jímž je podporován nervový přenos chloridovými kanály.

„Ivermektin (IVM) je historicky prvním léčivem avermektinové skupiny, i v současnosti stále patří mezi nejvýznamnější makrocyclické laktony a zároveň i léčiva veterinární medicíny.“ „Působí proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic.“ Mezi avermektiny dále patří moxidectin, doramektin i eprinomectin. [22]

### III. Nikotinoví agonisté

Nikotinoví agonisté jsou léčiva uplatňující se proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic. Působí jako excitační neurotransmitter na acetylcholinových receptorech svalových buněk nematod. Jejich výsledným efektem je spastická paralýza vnímavých nematod, která jsou následně vypuzena peristaltikou střeva v živém stavu. Do této skupiny léčiv zahrnujeme imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny (pyrantel, oxantel a morantel) a deriváty amino-acetonitrilu.

„Imidazothiazoly je dlouhodobě užívaná skupina anthelmintik, která má výhradně antinematodní účinky.“ [22] Jediným v současnosti registrovaným zástupcem této skupiny je levamizol (levotočivý isomer tetramizolu), který je „účinný proti dospělým i vývojovým stádiím nematod, ovocidní účinky ale nemá“.

Významným zástupcem derivátů amino-acetonitrilu je monepantel, nejnovější objev mezi léčivy s antinematodním účinkem. Roku 2009 byl schválen pro veterinární použití. Je účinný proti širokému spektru hlístic včetně kmenů rezistentním na BZ, imidazothiazoly či ML. [27]

#### **2.2.3 Rezistence na anthelmintika**

Obecně lze rezistenci charakterizovat jako schopnost jedinců určitého kmene parazitů tolerovat dávku léčiva, která je pro většinu jedinců téhož kmene za běžných podmínek citlivé populace smrtelná. „Tato rezistence se projevuje sníženou účinností terapeutické dávky, přičemž k docílení normální účinnosti je potřeba buď zvýšeného dávkování, nebo častějšího opakování léčby.“ Tyto skutečnosti „neúměrně zvyšují náklady na léčbu a v konečné fázi je nutná změna antiparazitika.“ [36]

Poprvé byla hlášena rezistence na benzimidazolová léčiva u *H. contortus*. Tento druh si postupně vyvinul rezistenci na všechny třídy anthelmintických léčiv. Uvádí se, že rezistence se ve většině případů objevila do 10 let od zavedení každé nové skupiny léčiv. Schopnost kontrolovat tohoto parazita byla ztížena během 90. let minulého století, kdy se objevily první izoláty, které vykazovaly multi-rezistenci (tj. rezistenci vůči třem nebo více různým třídám anthelmintických léčiv). Dnes většina polních izolátů vykazuje určitou úroveň rezistence na BZ, imidazothiazoly i ML. Rezistence byla hlášena u *H. contortus* také vůči naposledy zavedené skupině léčiv, derivátům aminoacetonitrilu, z nichž nejznámějším je monepantel. Jak se úrovně multi-rezistence zvyšují (tj. jak se snižuje účinnost každého jednotlivého léčiva) a tato rezistence začíná zahrnovat i monepantel, bude kontrola *H. contortus* stále obtížnější. [18]

„Detekce rezistence se provádí několika metodami. Nejběžnějším způsobem v případě, že známe počet vajíček ve výkalech, může být FECRT (z angl. faecal egg count reduction



test). FECRT je test redukce počtu vajíček nacházejících se ve výkalech hostitele po podání léčiva. Světová asociace pro rozvoj veterinární parazitologie definuje rezistence při redukcí nižší než 95 %. Dalším nástrojem používaným k vyjádření úspěšnosti odčervení je ERP (z angl. Egg Reappearance Period), tedy doba, za kterou jsou po odčervení ve výkalech detekována vajíčka parazitů. Je vyjádřena v týdnech po aplikaci anthelmintika, kdy procentuální redukce klesne pod 80 % pro BZ a pyrantel a pod 90 % v případě IVM nebo moxidektinu. Koprologické vyšetření se provádí každý týden, dokud nedojde k nálezů vajíček ve výkalech. Zkracující se doba od odčervení do znovuobjevení vajíček je předpokladem pro rozvoj rezistence. Mezi další metody, které lze použít k detekci rezistence, patří test líhnutí vajíček EHT (z angl. Egg Hatch Test) užívaný pro BZ a test vývoje larev na mikroagaru MALDT (z angl. Microagar Larval Development Test).“ Oba tyto testy jsou založeny na schopnosti larev přežít a vyvíjet se v prostředí s různými koncentracemi anthelmintických léčiv. [4]

### **Výskyt rezistence ve světě**

„Ke vzniku rezistence na jednotlivé skupiny anthelmintik došlo brzy po jejich uvedení na trh. První zmínka o rezistenci se objevila na tehdy velmi rozšířené anthelmintikum fenothiazin v 50. letech minulého století.“ Tři roky po uvedení na trh byla roku 1964 hlášena rezistence na thiabendazol. V roce 2012 byla hlášena rezistence též na monepantel, který byl uveden do praxe roku 2009.

Zprávy o výskytu rezistentních kmenů jsou řadu let publikovány ze zemí s rozvinutým chovem ovcí (Austrálie, Nový Zéland, JAR), dále ze zemí Latinské Ameriky, Indonésie a z evropských zemí jsou to zejména Anglie, Skotsko, Wales, Irsko, Dánsko, Francie, Německo, Belgie, Nizozemí a Řecko. Ve všech zemích světa, kde byla rezistence zjištěna, se jedná především o nematoda z řádu Strongylida, u ovcí a koz z čeledi Trichostrongylinae (*H. contortus*, *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp.). „Nedávné studie v USA a Evropě zjistily prevalenci BZ-rezistence větší než 75 %. Studie rezistence na pyrantel na jihu USA ukázala, že u více než 40 % farem se objevila tato rezistence.“ [28]

### **Rezistence na území České a Slovenské republiky**

V Čechách i na Slovensku je nejvíce rozšířená rezistence na benzimidazolová léčiva. Chroust (2000) prokázal na území České republiky přítomnost rezistentních rodů *Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. u ovcí provedeným FECRT testem. Test prokázal rezistenci na levamizol v 67,8 % a fenbendazol v 85,7 %. [5]

Studie provedené na Slovensku mezitím prokázaly, že se i v této zemi vyskytují ovčí farmy s výskytem gastrointestinálních nematod rezistentních na benzimidazoly. Čerňanská et al. (2006) našli rezistentní parazity na třech z 25 vyšetřovaných chovů ovcí z různých regionů Slovenské republiky.

Ve studii z roku 2007 byly ze 14 testovaných chovů z různých regionů České republiky prokázány 3 chovy s výskytem rezistence vůči benzimidazolům s výsledky testu FECRT v rozmezí mezi 68-75 %. [40]

## **Faktory vzniku rezistence**

Rozvoj rezistence nejvíce ovlivňuje selekční tlak, což znamená, že se dále rozmnožují pouze jedinci, kteří přežili léčbu anthelmintiky.

Aby bylo možné předejít rozvoji selekčního tlaku, je nutné dodržovat několik zásad:

1. Karanténa nových i čerstvě odčervěných zvířat. Nežádoucí je též sdílení pastviny několika farmáři, čímž by se populace rezistentních parazitů snadno rozšířila mezi několik stád dobytka. [15]
2. Dodržování aplikační dávky anthelmintik dle hmotnosti a věku zvířete. Nutné je předcházet poddávkování, které bývá způsobeno zejména nesprávným odhadem tělesné hmotnosti hostitele zvířete.
3. Optimálně léčit pouze zvířata s vysokým počtem vajíček nalezených ve výkalech či zvířata s patrnými klinickými příznaky onemocnění.
4. Neaplikovat léčiva příliš často a v pravidelných intervalech střídat účinné látky. Dlouhodobým používáním stejného léčiva dochází k účinné selekci jedné subpopulace parazitů, která je schopna přežít v přítomnosti konkrétního typu léčiva. [27]
5. Horák (2004) doporučoval střídání pastvin – část pastvin mělo být vhodné celoročně pouze sekat, na těchto pastvinách v daném roce nepást. Přístupem UV záření až na půdu dochází k přerušení vývojových cyklů geohelmintů a úhynu larválních forem parazitů. V následujícím roce měla být údajně pastvina vhodná k první pastvě stáda nebo k pastvě stáda po odčervění. [13] „Silvestre et al. (2002) ovšem uvádí, že to může být příčinou silného selekčního tlaku, který vzniká na základě faktu, že po odčervění zůstávají v tělech zvířat pouze rezistentní parazité. Když se tato zvířata vypustí na začátku sezóny na pastvinu, která je čistá, dojde k její kontaminaci vajíčky rezistentních parazitů. Míra selekčního tlaku pak závisí na tom, kolik infekčních larev citlivých jedinců dokázalo na pastvině přežít a vytvořit tak konkurenci rezistentním larvám.“ [15]

## **Mechanismy vzniku rezistence**

Mechanismy rezistence se vůči různým třídám léčiv obecně liší (obr. 5), a proto si určitá třída léčiv může zachovat aktivitu proti červům v polní populaci, kteří jsou rezistentní vůči ostatním třídám léčiv.

Předpokládá se, že se rezistence může rozvíjet třemi mechanismy:

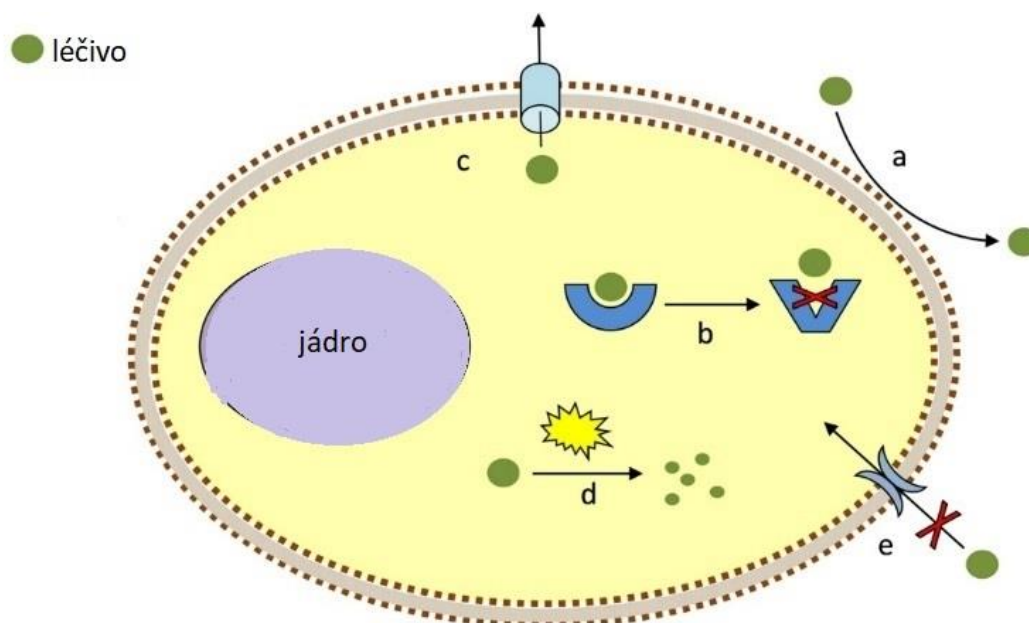
1. Omezením vstupu léčiva do buněk parazitů zvýšenou expresí efluxních transportérů (transportní proteiny). Nejstudovanějšími efluxními transportéry u nematod jsou P-glykoproteiny patřící do rodiny ABC transportérů.
2. Zvýšením aktivity biotransformačních enzymů metabolizujících léčiva, k čemuž může docházet jak u parazita, tak hostitele. V případě parazita dochází k inaktivaci léčiva a k jeho snadnější eliminaci z organismu, což umožní přežití odolných jedinců a vede k rozvoji selekčního tlaku. V případě hostitele zvýšená aktivita metabolických enzymů způsobí zrychlené odbourávání léčiva, kterého se tak do těla parazita dostane

v podstatně menší míře, než je určená doporučená terapeutická dávka. Zvýšená aktivita těchto enzymů může navíc usnadnit vývoj rezistence s jiným mechanismem (např. mutace genu pro daný receptor). [16]

Je známo, že biotransformační enzymy jako cytochrom P450 (CYP), skupina přítomná téměř ve všech živých organismech, je spojena s rezistencí na léky u savců, hmyzu i helmintů. U vajíček a larev gastrointestinálních nematod *Cooperia oncophora* a *Ostertagia ostertagia* byla po expozici inhibitoru CYP piperonylbutoxidu (PBO) prokázána zvýšená toxicita TBZ a IVM. Podobně u *H. contortus* bylo prokázáno, že PBO zvyšuje citlivost na rotenon (sekundární metabolit patřící mezi flavonoidy, který se používá v širokém spektru jako insekticid a pesticid). Navíc se ukázalo, že *H. contortus* a *Caenorhabditis elegans* mají poměrně vysoké množství genů pro tyto enzymy. Například genom *C. elegans* kóduje až 86 CYPů a *H. contortus* 42, včetně čtyř velkých xenobioticky indukovaných enzymových rodin: CYP35, CYP34, CYP33, CYP31.

Gen CYP34/35 vykazuje vysokou expresi v multi-rezistentním izolátu larválního stádia L4 *H. contortus* po expozici TBZ. [26]

3. Změnou cílového místa terapie (např. mutací v genu nebo regulační oblasti pro daný enzym či transportér). Například rezistence vůči BZ u *H. contortus* je zdůvodňována mutací u  $\beta$ -tubulinového isotypu. [16]



Obr. 5: Mechanismy rezistence (a - snížení difuze léčiva, b - modifikace cílové molekuly, c - zvýšení efluxu, d - inaktivace léčiva, e - ztráta schopnosti buňky přijmout léčivo) [10]

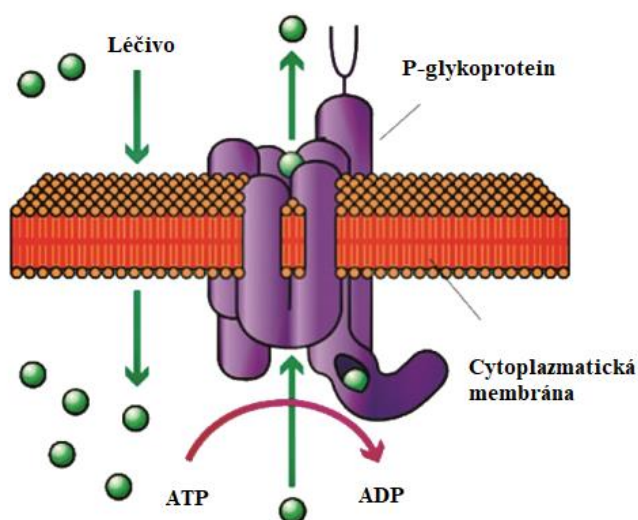
## 2.3 P-glykoprotein (P-gp)

„P-glykoprotein (P-gp) je efluxní transmembránový protein lokalizovaný apikálně v cytoplasmatické membráně (obr. 6).“ Přenáší xenobiotika (látky vstupující do organismu, které nemají žádnou fyziologickou funkci, tj. neslouží jako zdroj energie ani pro výstavbu endogenních látek) skrz lipidovou dvojvrstvu do extracelulárního prostoru buňky.

„Roku 1976 se P-gp stal prvním identifikovaným a klonovaným transportérem rodiny ABC transportérů.“ „Transportéry ABC katalyzují transport širokého spektra endogenních a exogenních substrátů ve všech živých organismech.“ „Patří mezi transportéry, které získávají energii nutnou k transportu hydrolýzou ATP.“

U savců byl identifikován pouze jeden P-gp. U člověka jej kóduje gen *ABCB1* (dříve nazýván MDR1 – odvozeno z angl. multi-drug resistance). „P-gp u savců se podílí na eliminaci léčiv do žluče a cirkulaci léčiv v hepatocytech i enterocytech.“ „V enterocytech významně ovlivňují absorpci řady vysokomolekulárních lipofilních substrátů. Tyto substráty jsou vypuzovány zpět těmito transportéry, což významně snižuje jejich biodostupnost a brání absorpci (například léčiv).“ „Navíc se P-gp podílí na eliminaci některých látek (např. digitoxin – srdeční glykosid podporující činnost srdce) a organických iontů z krve do lumina střeva.“ „V ledvinách se účastní exkrece léčiv do moči.“ „Zamezuje vstup xenobiotik do buněk endotelu, čímž celkově snižuje expozici centrální nervové soustavy cizorodým látkám, léčivům a jejich metabolitům.“

„P-gp hraje významnou roli v absorpci, distribuci a eliminaci řady léčiv, čímž se významně podílí na farmakokinetice léčiv. Nadměrná exprese a funkčnost P-gp je jednou z hlavních příčin lékové rezistence k terapii.“ [38]



Obr. 6: Molekula P-glykoproteinu [1]

### 2.3.1 Vliv P-glykoproteinu na vznik rezistence

První zmínka o rezistenci myších leukemických buněk k terapii se objevila již roku 1950. V roce 1973 byla popsána spojitost mezi efluxním transportem daunomycinu s rezistencí k jiným chemoterapeutikům, ale souvislost tohoto jevu s nadměrnou expresí P-glykoproteinu objevena nebyla. [30] R. L. Juliano a V. Ling jako první izolovali P-gp z ovariálních buněk chemoterapeuticky rezistentního čínského křečka v roce 1976.

V humánní medicíně zvýšená exprese P-gp způsobuje resistenci na anthracykliny, epipodophyllotoxiny, vinca alkaloidy, taxany a další chemoterapeutická léčiva. P-gp na membránách nádorových buněk vytlačuje širokou škálu chemoterapeutik do extracelulárního prostoru, čímž snižuje jejich cytotoxický účinek. Inhibice P-gp způsobuje zvýšení citlivosti rezistentních nádorových buněk na chemoterapeutika a může vést k úspěšné chemoterapii. [9]

„U dětské akutní lymfoblastické leukémie je exprese P-gp značně vyšší při návratu onemocnění ve srovnání s časem primární diagnózy. Také u karcinomu mléčné žlázy byla chemoterapie a hormonální léčba spojena se zvýšením exprese *ABCB1* genu. U pacientů, u nichž byla zaznamenána exprese P-gp v nádorových buňkách, docházelo k trojnásobně vyššímu selhání terapie než u pacientů s negativní expresí P-gp. Zvýšená exprese genu *ABCB1* může být tedy využita v predikci špatné prognózy u některých onemocnění. Ovšem nadměrná exprese P-gp nemusí být indukována jen léčivy nebo chemickými sloučeninami, ale i fyzickým stresem, UV zářením, rentgenovým zářením, tepelným šokem atd.“

U hlodavců je vznik P-gp kódován *Mdr1a*, *Mdr1b* geny [30]. „Představu o hlavní úloze P-gp, jíž má být eliminace lipofilních látek z těla, podporuje především skutečnost, že geneticky manipulované (*knock-out*) myši kmeny postrádající myši homolog P-gp jsou životaschopné bez projevů patologických změn, avšak jsou citlivější k toxickému poškození xenobiotiky.“ [38]

### **Rezistence u *H. contortus***

Zvýšená exprese P-gp u nematod, které byly vystaveny anthelmintické léčbě naznačuje roli P-gp v efluxu anthelmintik a s ní související vznik rezistence. Bylo zaznamenáno zvýšení citlivosti na některá anthelmintika, zejména IVM, u různých P-gp knock-outovaných kmenů *C. elegans*, což také poskytuje důkazy o jejich roli v ochraně před anthelmintiky.

Řada studií, které popisují zvýšenou transkripci genů kódujících P-gp u rezistentních nematod napovídá, že by P-gp mohl souviset s rozvojem rezistence. [32] U *H. contortus* bylo identifikováno 8 homologů *pgp*, z nichž 2 byly lokalizovány: *pgp-2* v hltanu, střevech a neuronech hlavy a *pgp-9.1* v děloze samic. [7] *Pgp-2* i *pgp-9* by mohly souviset s rezistencí na IVM. [11] Lloberas et al. (2013) uvedli, že léčba infikovaných jehňat pomocí IVM zvýšila transkripční hladiny *pgp-2* u rezistentních helmintů *H. contortus* ve srovnání s helminty získanými z neošetřených zvířat. [32] *Pgp-2* byl první charakterizovaný ABC transportní gen spojený s ML rezistencí u *H. contortus*. [13] Některé inhibitory savčího *pgp* mění transportní funkci P-gp. Takové inhibitory mohou také zvýšit citlivost hlístic na ML. [7] Například použití inhibitorů (MDRI – z angl. multi-drug resistance inhibitors) ke zvýšení toxicity anthelmintik vůči nematodám dále naznačuje roli transportérů léčiv na vznik rezistence. Bartley et. al. (2009) uvedli, že současné podávání valsopodaru zvýšilo citlivost rezistentních izolátů *H. contortus* na IVM. [33]

### 3 Cíl práce

1. Zjistit rozdíly v expresi osmi známých P-gp genů mezi citlivým, rezistentním a multi-rezistentním kmenem *H. contortus*, zvláště u samic a samců.
2. Stanovit konkrétní P-gp, které by mohly souviset s anthelmintickou rezistencí u *H. contortus*.

## 4 Metodika

### 4.1 Modelový organismus

Pro testování byly vybrány tři kmeny *H. contortus*:

- citlivý na anthelmintika - ISE (Inbred Susceptible Edinburgh)
- rezistentní na benzimidazolová anthelmintika - IRE (Inbred Resistant Edinburgh)
- multi-rezistentní - WR (White River)

### 4.2 Získávání dospělců *H. contortus* – Agarová metoda

Princip: Dospělí červi kmenů WR, ISE a IRE byli získáni z abomasa ovce pomocí agarové metody.

Postup:

1. Obsah abomasa ovce propláchnout fyziologickým roztokem (obr. 7) a přelit do skleněné nádoby (obr. 8).
2. Nádobu umístit do vodní lázně při 40 °C a nechat pevné části sedimentovat.
3. Odstranit supernatant.
4. Zbývající sedimenty (cca 300 ml) doplnit 300 ml agarové suspenze.
5. Nechat směs gelovat na plátech gázy (obr. 9).
6. Ponořit gázy do fyziologického roztoku.
7. Inkubovat pláty 1 hodinu (v inkubátoru nematoda migrují z agarového gelu do roztoku) (obr. 10).
8. Izolovat nematoda z roztoku.

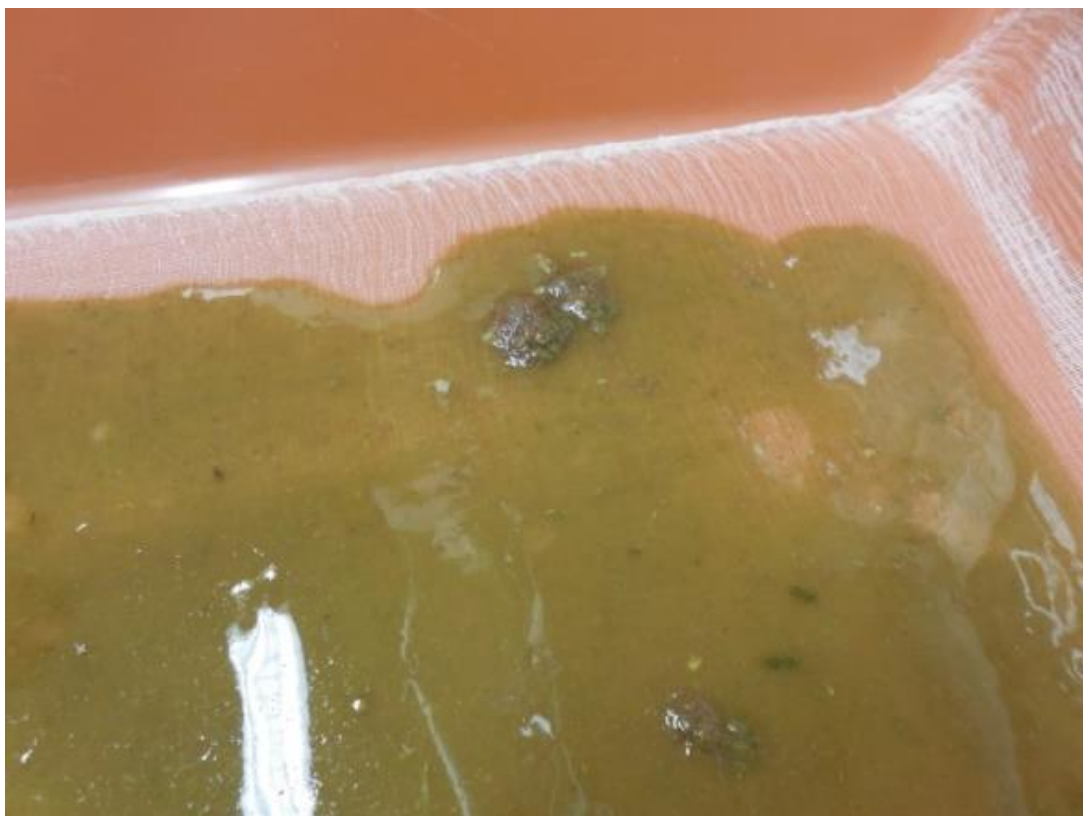
Červi byli následně dle jednotlivých kmenů roztríděni na samice (F) a samce (M) (obr. 11 a 12). Hlavními rozlišovacími morfologickými znaky byla rozdílná velikost samců, žíhané zbarvení samic způsobené propletenými střevy s pohlavními orgány, vulva samic a kopulační bursa samců. Vlasovky byly identifikovány pod binokulárním mikroskopem.



Obr. 7: Abomasum ovce s přítomným ISE kmenem [39]



Obr. 8: Obsah abomasa s fyziologickým roztokem [39]



Obr. 9: Pláty se sedimenty a agarem [39]



Obr. 10: Inkubované pláty [39]



Obr. 11: Udržování *H. contortus* při 37 °C během třídění [39]





Obr. 12: Třídění *H. contortus* kmenu ISE [39]

### 4.3 Fixace dospělců *H. contortus*

Princip: Z důvodu izolace RNA byli červi nejprve fixováni v TRIzolu.

Postup: 10 samic a 15 samců z každého kmene ve 4 biologických replikátech vložit do 1ml TRIzolu (ve 2 ml šroubovací zkumavce) (tab. 2).

Tab. 2: Schéma vzorků jednotlivých samic a samců *H. contortus* umístěných ve zkumavkách s 1 ml TRIzolu

ISE F1 - 10	ISE M1 - 15	IRE F1 - 10	IRE M1 - 15	WR F1 - 10	WR M1 - 15
ISE F2 - 10	ISE M2 - 15	IRE F2 - 10	IRE M2 - 15	WR F2 - 10	WR M2 - 15
ISE F3 - 10	ISE M3 - 15	IRE F3 - 10	IRE M3 - 15	WR F3 - 10	WR M3 - 15
ISE F4 - 10	ISE M4 - 15	IRE F4 - 10	IRE M4 - 15	WR F4 - 10	WR M4 - 15

### 4.4 Izolace RNA

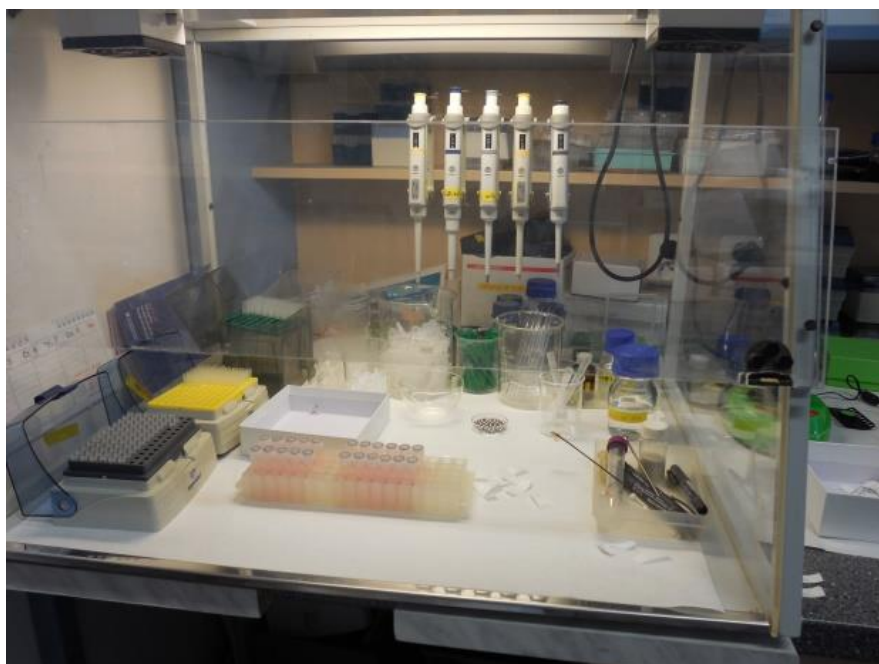
Princip: TRIzol, směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, umožňuje selektivní izolaci celkové RNA z malého množství tkání či buněk. Při izolaci RNA zůstává zachována jeho integrita během homogenizace tkáně. Přídavek chloroformu a následné stočení rozdělí směs na vodní a organickou fázi, přičemž RNA bude výhradně v horní vodní fázi. Následné selektivní vysrážení RNA pomocí isopropanolu umožní izolaci čisté RNA.

Tab. 3: Materiál potřebný pro izolaci RNA

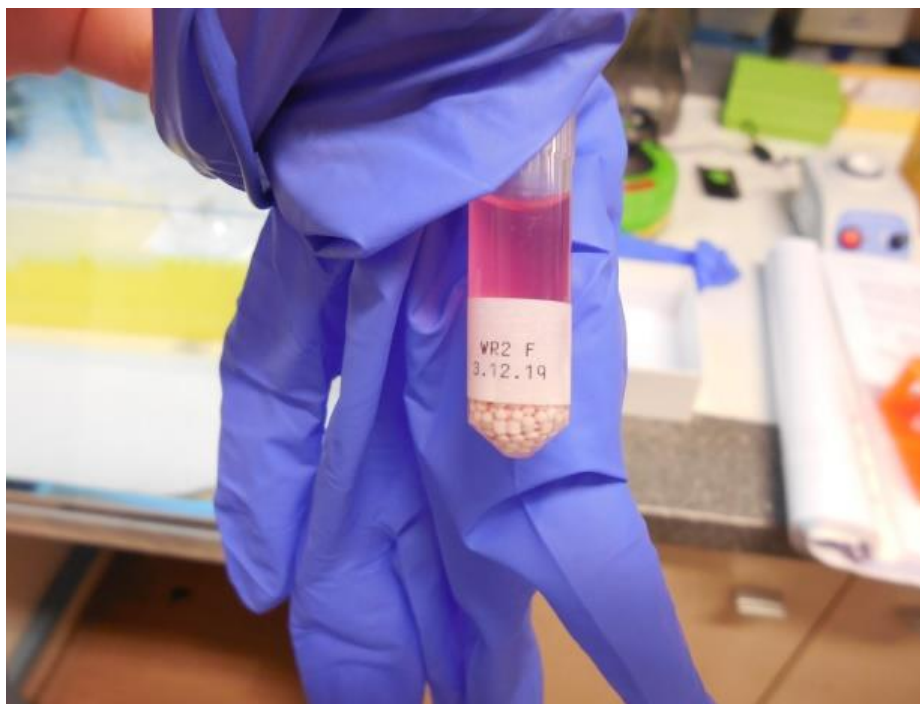
200 $\mu$ l chloroform
500 $\mu$ l isopropanol
1 ml 75 % ethanol
DEPC H <sub>2</sub> O (samci v 20 $\mu$ l, samice v 30 $\mu$ l)

Postup:

1. Zvlášť každý vzorek homogenizovat s keramickými kuličkami – 50/s, 3 minuty, 3x (obr. 14).
2. Směs nechat stát při laboratorní teplotě 5 minut.
3. Ke směsi přidat chloroform a 15 sekund třepat.
4. Směs nechat stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě.
5. Směs stáčet ve vychlazené centrifuze Heraeus – 15 minut, 12.000 g, 4 °C.
6. Ze směsi přepipetovat horní vodní fázi do 1,5 ml zkumavky.
7. K přepipetované vodní fázi přidat isopropanol a promíchat.
8. Směs nechat stát při laboratorní teplotě 10 minut.
9. Stočit směs ve vychlazené centrifuze – 10 minut, 12.000 g, 4 °C.
10. Ihned od směsi odstranit supernatant.
11. Peletu omýt v 75 % ethanolu, zamíchat překlápěním a stočit ve vychlazené centrifuze – 5 minut, 7.500 g, 4 °C.
12. Odstranit supernatant skleněnou pipetou s vytaženým koncem.
13. Usušit peletu na vzduchu.
14. Rozpustit peletu v DEPC H<sub>2</sub>O a promíchat.
15. Směs nechat stát 5 minut při laboratorní teplotě a poté znovu promíchat.
16. Peletu uložit na led.



Obr. 13: Pracovní plocha určená pro izolaci RNA [39]



Obr. 14: Směs tkáně *H. contortus* a TRIzolu za přítomnosti kuliček pro homogenizaci [39]

## 4.5 Ošetření RNA pro reverzní transkripci

Princip: Ošetření vzorků RNA DNAsou, která selektivně štěpí pouze DNA a odstraní případnou kontaminaci vzorků genomovou DNA.

Tab. 4: Materiál potřebný pro ošetření RNA

Materiál pro 1x vzorek:
1,5 $\mu$ l 0,1M EDTA pH 8
8,5 $\mu$ l DEPC H <sub>2</sub> O
4 $\mu$ g RNA
3 $\mu$ l pufr
1 $\mu$ l DNAsa

Postup:

1. Do jednotlivých 0,5 ml zkumavek napipetovat RNA a H<sub>2</sub>O, aby výsledná koncentrace byla 4  $\mu$ g/ $\mu$ l (tab. 10).
2. Připravit master mix pro odpovídající počet vzorků (+2) - pufr, DNAsa (tab. 4).
3. Master mix promíchat ve vortexu a mírně stočit.
4. Master mix rozpipetovat do jednotlivých zkumavek se směsí RNA a H<sub>2</sub>O.
5. Směs promíchat a inkubovat 25 minut při 37 °C s třepáním 500 rpm.
6. Ke směsi přidat 0,1 M EDTA (tab. 4) a nechat inkubovat 10 minut při 75 °C (inaktivace DNAsy).
7. Ke směsi přidat DEPC H<sub>2</sub>O (tab. 4). Výsledná koncentrace směsi je 127 ng/ $\mu$ l.
8. Směs uchovávat v mrazáku na -70 °C.

## 4.6 Reverzní transkripce (syntéza cDNA)

Princip: RNA je reverzní transkriptázou převedena na jedno řetězcovou cDNA (complementary DNA) s použitím jednoho primeru (náhodné hexamery).

Tab. 5: Materiál potřebný pro směs master mixu

Materiál pro 1x vzorek:	Materiál pro 24 + 2 vzorků:
4 $\mu$ l pufr	104 $\mu$ l pufr
2 $\mu$ l DTT	52 $\mu$ l DTT
2 $\mu$ l dNTP	52 $\mu$ l dNTPs
5,5 $\mu$ l DEPC H <sub>2</sub> O	143 $\mu$ l DEPC H <sub>2</sub> O
0,5 reverzní transkriptáza	13 reverzní transkriptáza

Tab. 6: Materiál potřebný pro reverzní transkripci

Materiál pro 1x vzorek:	Materiál pro 24 vzorků:
1 $\mu$ l primer (náhodná hexamera)	24 $\mu$ l primer (náhodná hexamera)
5 $\mu$ l vzorek RNA po ošetření DNAsou	120 $\mu$ l vzorek RNA po ošetření DNAsou
14 $\mu$ l Master mix	336 $\mu$ l Master mix
7,5 $\mu$ l dd H <sub>2</sub> O	180 $\mu$ l dd H <sub>2</sub> O

Postup:

1. Připravit směs primeru a RNA, zamíchat a stočit v centrifuze (tab. 6).
2. Inkubovat 5 minut 65 °C v PCR cykléru.
3. Vzorky vložit na chladicí destičku.
4. Do směsi přidat Master mix, zamíchat, stočit (tab. 5 a 6).
5. Inkubovat 10 minut na 25 °C, poté 50 minut na 42 °C a 5 minut 80 °C.
6. Výslednou směs naředit dd H<sub>2</sub>O (tab. 6).
7. cDNA uchovávat při -20 °C.

## 4.7 Real-time PCR

Princip: Metody real-time PCR jsou schopny poměrně přesně kvantifikovat vstupní množství vyšetřovaného templátu DNA. V qPCR cykléru dochází k reprodukci vybraných úseků cDNA.

Materiál: 15  $\mu$ l Master mix, 5  $\mu$ l cDNA

Tab. 7: Materiál potřebný pro směs Master mixu

Materiál pro 1x vzorek:	Materiál pro 48 + 2 vzorků:
4,2 $\mu$ l dd H <sub>2</sub> O	109,2 $\mu$ l dd H <sub>2</sub> O
10 $\mu$ l SG mix	260 $\mu$ l SG mix
0,8 $\mu$ l směs primerů	20,8 $\mu$ l směs primerů

Postup:

1. Napipetovat Master mix (tab. 7) a cDNA do 96 jamkové destičky (tab. 8). Vzorky byly napipetovány v duplikátech (technický replikát).
2. Zalepit destičku folií.
3. Vložit destičku do PCR cykléru.

Tab. 8: Schéma vzorků pro jeden gen připravených do PCR cykléru:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ISE	ISE	ISE	ISE	IRE	IRE	IRE	IRE	WR	WR	WR	WR
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
B	ISE	ISE	ISE	ISE	IRE	IRE	IRE	IRE	WR	WR	WR	WR
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
C	ISE	ISE	ISE	ISE	IRE	IRE	IRE	IRE	WR	WR	WR	WR
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
D	ISE	ISE	ISE	ISE	IRE	IRE	IRE	IRE	WR	WR	WR	KONTROLA
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	(H <sub>2</sub> O)

## 4.8 Statistická analýza dat

Postup:

1. Zkontrolovat průběh fluorescenčních křivek tání.
2. Exportovat hodnoty Ct do Excelu.
3. Provést výpočet podle metody „comparative Ct“:  $2^{(-\Delta Cq)}$ , kde  $\Delta Cq = Cq(TG) - Cq(RG)$ .
4. V programu GraphPad Prism 4.0 vytvořit grafy pro vizuální znázornění změn exprese genů.

## 5 Výsledky

### 5.1 Izolovaná RNA

Z dospělců ISE kmene *H. contortus* byla pomocí fenol-chloroformové extrakce izolována RNA. Množství a čistota získané RNA byla měřena pomocí spektrofotometru NanoDrop. Množství RNA pro jednotlivé vzorky je uvedeno v tabulce č. 9. Pomocí poměru absorbancí při vlnové délce 260 nm a 280 nm lze zjistit kontaminaci proteiny. Hodnota by měla být v ideálním případě větší než 1,8. Obdobně lze z poměru absorbancí při 260 nm a 230 nm zhodnotit kontaminaci fenolem. Tato hodnota by se měla ideálně blížit 2.

Tab. 9 Koncentrace izolované RNA

Vzorek	Koncentrace RNA (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
ISE F1	2546,07	63,652	32,271	1,97	1,38
ISE F2	332,67	8,317	4,426	1,88	0,82
ISE F3	2126,6	53,165	26,158	2,03	1,85
ISE F4	161,82	4,045	2,188	1,85	0,44
IRE F1	2818,04	70,451	36,248	1,94	2,08
IRE F2	2668,68	66,717	33,63	1,98	2
IRE F3	2574,92	64,373	32,693	1,97	1,27
IRE F4	2454,08	61,352	30,914	1,98	1,23
WR F1	1417,13	35,428	17,181	2,06	1,02
WR F2	2173,56	54,339	27,361	1,99	1,12
WR F3	2062,71	51,568	25,812	2	1,37
WR F4	278,53	6,963	3,718	1,87	0,71
ISE M1	605,57	15,139	7,913	1,91	0,66
ISE M2	809,68	20,242	9,933	2,04	1,52
ISE M3	861,77	21,544	10,748	2	1,18
ISE M4	673,45	16,836	8,319	2,02	1,29
IRE M1	791,97	19,799	9,908	2	1
IRE M2	640,23	16,006	7,994	2	0,88
IRE M3	390,81	9,77	5,129	1,9	0,98
IRE M4	804,56	20,114	10,83	1,86	0,83
WR M1	583,76	14,594	7,247	2,01	0,89
WR M2	91,75	2,294	1,29	1,78	0,26
WR M3	133,75	3,344	1,865	1,79	0,43
WR M4	234,64	5,866	3,077	1,91	0,74

Z tabulky č. 9 je zřejmé, že RNA byla izolována u všech vzorků. Všechny vzorky obsahovaly dostatečné množství RNA. Data názorně ukazují, že množství RNA izolované z většiny samic (F) *H. contortus* několikanásobně přesahuje množství RNA izolované ze vzorků samců (M). To odpovídá rozdílné morfologii samic a samců *H. contortus*. Kontaminace proteiny u všech vzorků splňuje uvedenou normu. Nejnižší množství RNA obsahoval vzorek WR M2. Z poměru absorbancí 260 nm a 230 nm je zřejmé že byl vzorek

WR M2 kontaminován fenolem (0,26). Kontaminace fenolem je vidět i u dalších vzorků, především u těch s koncentrací RNA <500 ng/μl. Nicméně, tato kontaminace nebránila v procesu další plánované metodiky.

## 5.2 Výpočet RNA pro ošetření DNAsou

Pro odstranění případná kontaminace vzorků genomovou DNA byly vzorky ošetřeny DNAsou.

Vzorky bylo nutné standardizovat na stejnou koncentraci RNA. Z toho důvodu byl proveden výpočet, který určil, jaký objem izolovaného materiálu obsahuje 4 μg RNA a jak velkým množstvím H<sub>2</sub>O je potřeba jej doplnit, aby celkový objem vzorku činil 26 μl.

Tab. 10: Koncentrace RNA

vzorek	ng/μl	4 μg RNA [μl]	H <sub>2</sub> O do 26 μl [μl]
ISE F1	2546,07	1,6	24,4
ISE F2	332,67	12,0	14,0
ISE F3	2126,6	1,9	24,1
ISE F4	161,82	24,7	1,3
IRE F1	2818,04	1,4	24,6
IRE F2	2668,68	1,5	24,5
IRE F3	2574,92	1,6	24,4
IRE F4	2454,08	1,6	24,4
WR F1	1417,13	2,8	23,2
WR F2	2173,56	1,8	24,2
WR F3	2062,71	1,9	24,1
WR F4	278,53	14,4	11,6
ISE M1	605,57	6,6	19,4
ISE M2	809,68	4,9	21,1
ISE M3	861,77	4,6	21,4
ISE M4	673,45	5,9	20,1
IRE M1	791,97	5,1	20,9
IRE M2	640,23	6,2	19,8
IRE M3	390,81	10,2	15,8
IRE M4	804,56	5,0	21,0
WR M1	583,76	6,9	19,1
WR M2	91,75	18,0	8,0
WR M3	133,75	18,0	8,0
WR M4	234,64	17,0	9,0

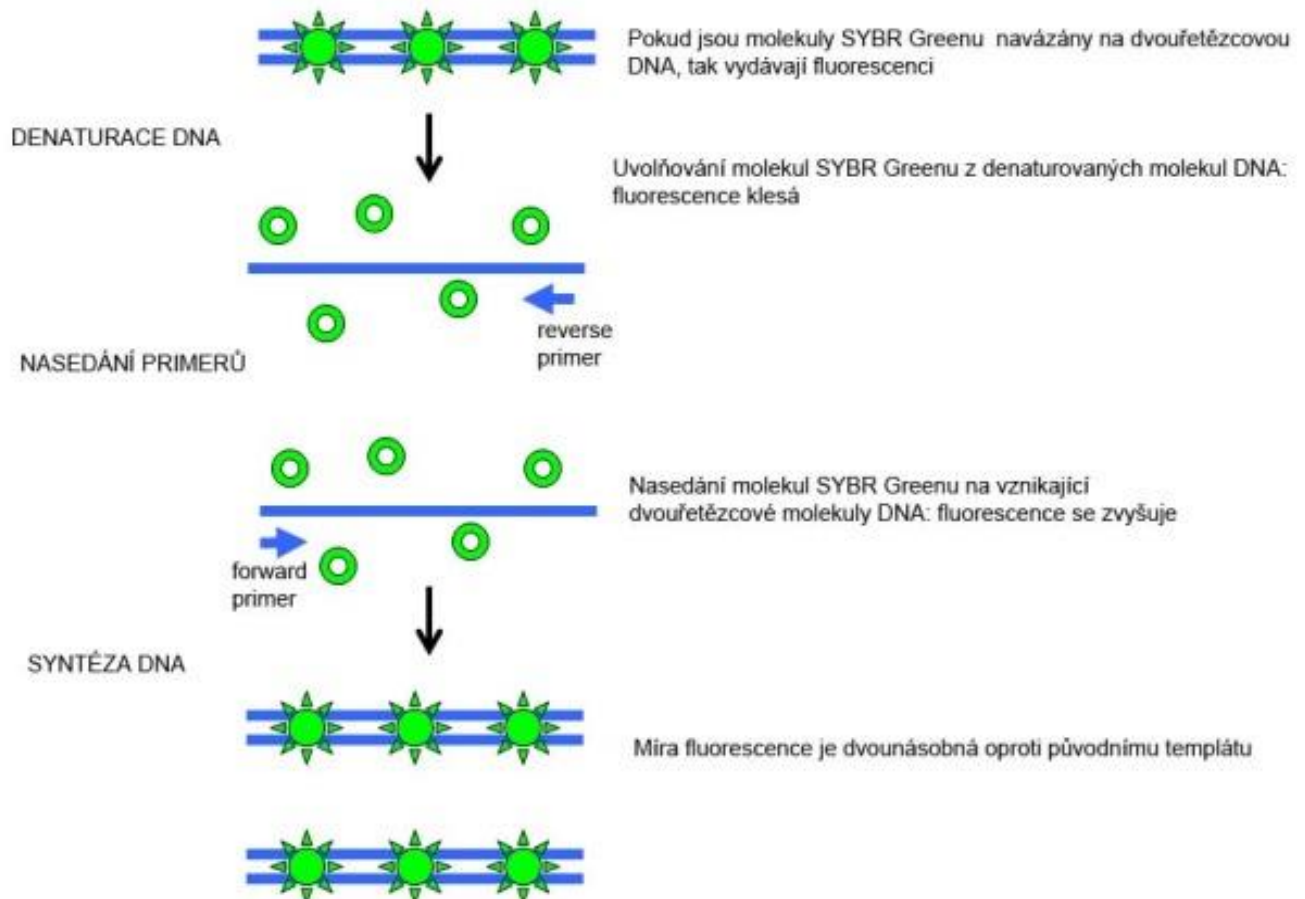
Konečný objem každého vzorku byl tedy 40 μl a výsledná koncentrace RNA odpovídala 127 ng/μl. Vzorek WR M2 obsahoval příliš málo RNA a nebyl tedy naředěn na konečný objem 40 μl. V této fázi byla RNA připravená pro reverzní transkripci (viz metodika 4.5 a 4.6).

## 5.3 Analýza qPCR

### 5.3.1 Princip metody

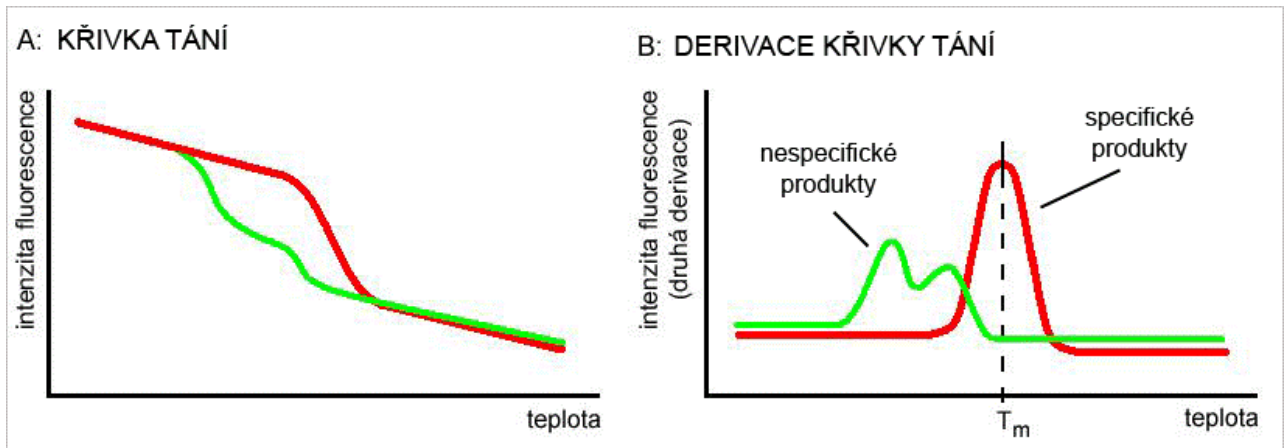
„Metody real-time PCR jsou schopny poměrně přesně kvantifikovat vstupní množství vyšetřovaného templátu DNA.“

Při real-time PCR je reakční směs obohacena o interkalační látku SYBR Green schopnou fluorescence. SYBR Green se v každé reakci vmezeřuje do dvou vlákn DNA. „K vyzařování fluorescenčního záření dochází jen, pokud je v reakční zkumavce amplifikován templát DNA“ (obr. 15). „Nárůst fluorescence pak vykazuje esovitý charakter typický pro PCR“ (obr. 17 a 18). „Tvorbu produktů lze na obrazovce monitoru sledovat v průběhu procesu v „reálném čase.“ „Světelné kvantum zachycené na detektoru by mělo být přímo úměrné množství vznikajícího amplikonu.“ [2]

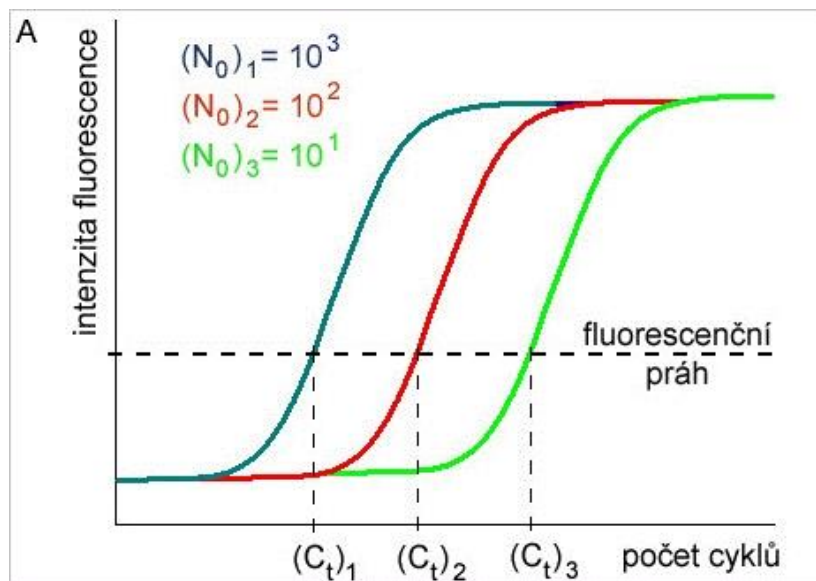


Obr. 15: Zabudování barviva do dvouřetězcového vlákna DNA [21]



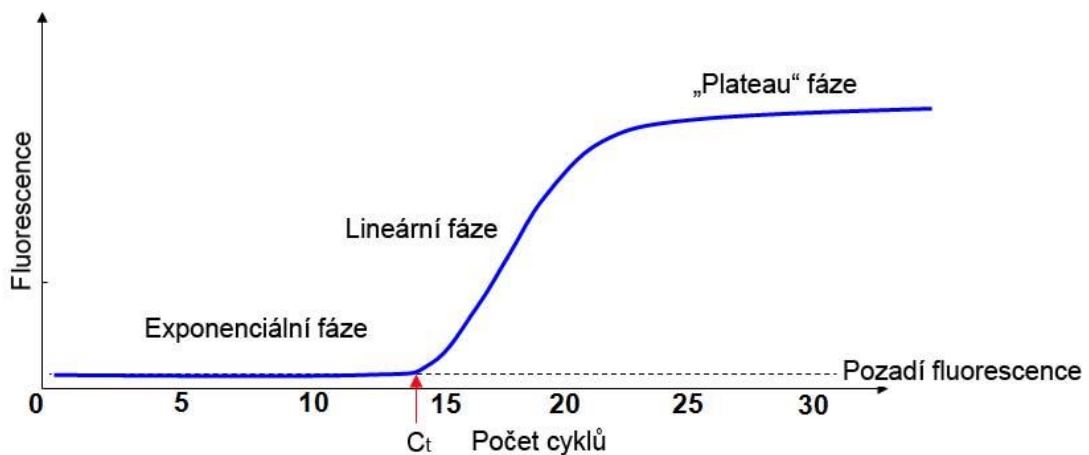


Obr. 16: Zobrazení nespecifických produktů na křivce tání [42]



Obr. 17: Aplifikační křivka [42]

„Amplifikační křivky mají při kvantifikaci vyneseny na ose X počty reakčních cyklů; na ose Y je intenzita fluorescence zachycená na detektoru po korekci pozadí (Rn hodnota)“ (obr. 17). [2]



Obr. 18: Průběh reakce qPCR na amplifikační křivce [20]

„Hodnocení množství molekul DNA se provádí v exponenciální fázi, resp. v takovém cyklu, kdy esovitá amplifikační křivka svou výškou fluorescence poprvé překoná hodnotu meze detekce (*threshold*). Tento cyklus se označuje *cycle threshold* (*Ct*). Čím více molekul templátové DNA je obsaženo v reakční směsi, tím rychleji dojde k překonání meze detekce a bude dosaženo exponenciální fáze reakce“ (obr. 18).

„Při relativní kvantifikaci je současně s vyšetřovaným genem amplifikován a hodnocen též *referenční gen*“, který „musí mít ve sledovaném typu buněk prokázanu konstantní expresi nezávislou na okolních podmínkách.“

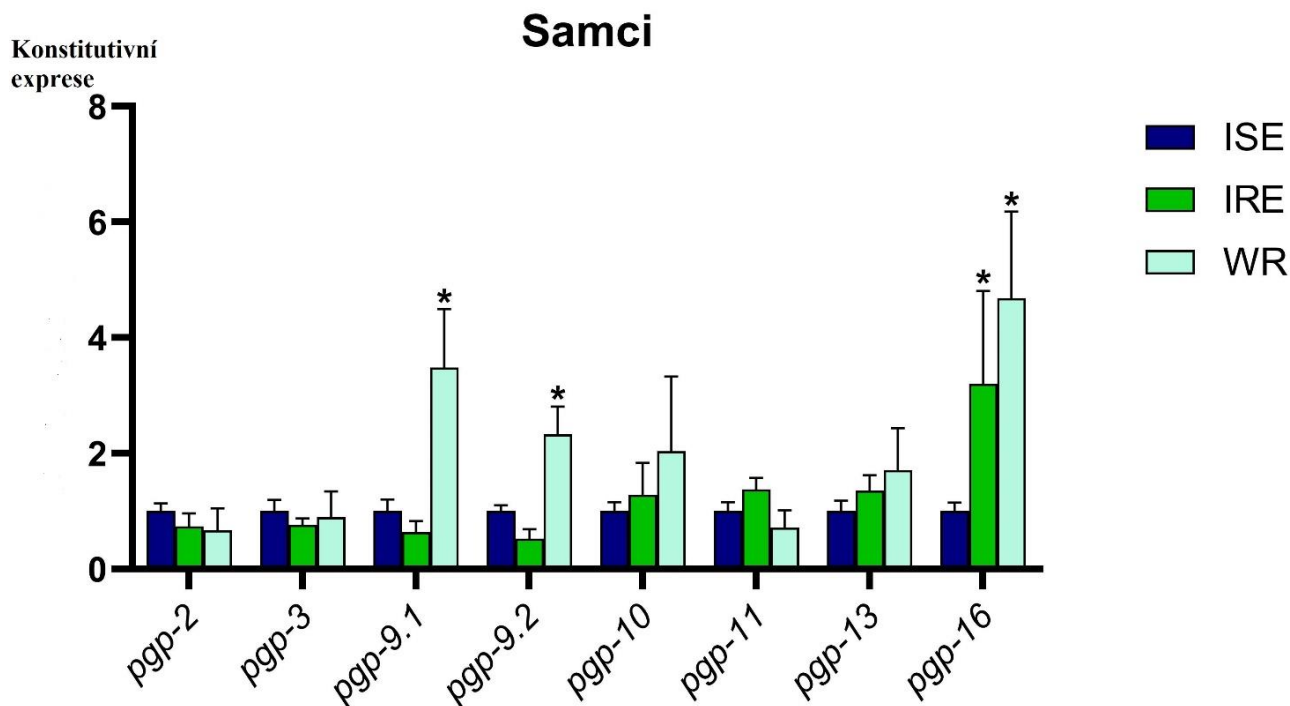
Kvantita lze vyjádřit porovnáním hodnoty *Ct* pro vyšetřovaný a referenční gen. „Pro kvantifikaci je důležitá hodnota *delta Ct* ( $\Delta Ct$ ), která vyjadřuje matematický rozdíl mezi hodnotami *Ct* pro *referenční* a studovaný gen. Je-li hodnota *Ct* pro vyšetřovaný gen nižší než pro gen referenční (má vyšší expresi než referenční gen), musí být hodnota  $\Delta Ct$  kladná. V opačném případě je hodnota záporná.“ [2]

### 5.3.2 Vlastní výsledky qPCR

Měření bylo provedeno na všech připravených vzorcích (24 x) pro známé P-gp geny u *H. contortus*: *pgp-2*, *pgp-3*, *pgp-9.1*, *pgp-9.2*, *pgp-10*, *pgp-11*, *pgp-13*, *pgp-16*. Jako geny referenční byly použity *GAPDH* a *NCPB*.

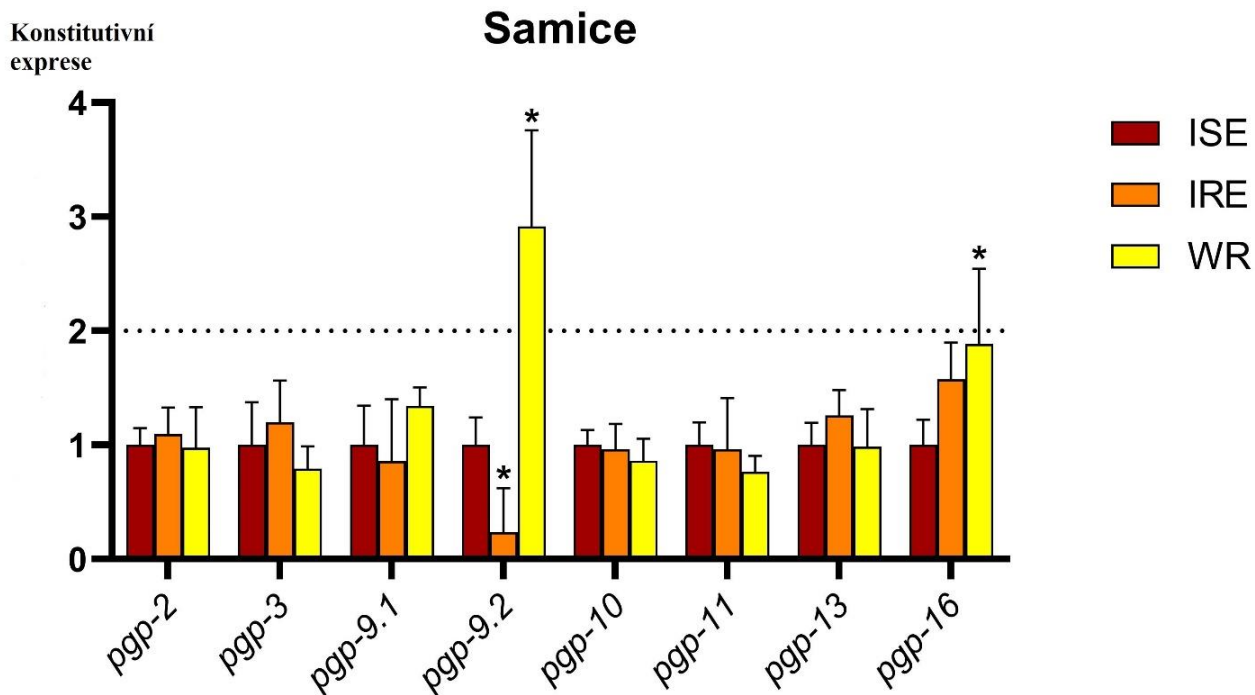
Samotný výpočet genové exprese byl proveden podle rovnice  $2^{(-\Delta Ct)}$ .

Genová exprese byla následně porovnávána mezi kmeny ISE, IRE a WR zvlášť pro samice a pro samce. Ze zjištěných údajů byly pomocí programu GraphPad Prism 4.0 vytvořeny grafy, které umožnily změny v expresi genů vizuálně znázornit.



Obr. 19: Konstitutivní exprese genů samců kmenů ISE, IRE a WR, \*signifikantní změna ( $P < 0,05$ )

Na obrázku č. 19 je zobrazena konstitutivní exprese genů u samců kmenů ISE, IRE a WR. Z grafu lze vidět značné rozdíly v expresi určitých genů. Několikanásobné zvýšení exprese genů kmene WR se ve srovnání s kmenem ISE vyskytlo u *pgp-9.1*, *pgp-9.2* a *pgp-16*. Exprese genu *pgp-16* byla též značně zvýšená u kmene IRE ve srovnání s expresí téhož genu kmene ISE.



Obr. 20: Konstitutivní exprese genů samic kmenů ISE, IRE a WR, \*signifikantní změna ( $P < 0,05$ )

Na obrázku č. 20 je zobrazena konstitutivní exprese genů samic pro kmeny ISE, IRE a WR. Exprese genů probíhala u všech tří kmenů velmi obdobně vyjma genů *pgp-9.2* a *pgp-16*. Ve srovnání s hodnotou ISE je pro gen *pgp-9.2* patrná výrazně vyšší exprese kmene WR, zatímco u kmene IRE je exprese tohoto genu výrazně nižší. Zvýšená je též exprese *pgp-16* kmene WR ve srovnání s expresí téhož genu kmene ISE.

## 6 Diskuze

V boji proti vzniku a vývoji lékové rezistence *H. contortus* na anthelmintika by mohlo pomoci bližší poznání mechanismů vzniku takové rezistence. V této práci jsem se zaměřila na studium mechanismů, které minimalizují vstup léčiva do buněk parazitů zvýšenou expresí efluxních P-gp transportérů (viz Mechanismy rezistence v kapitole 2.2.3: Rezistence na anthelmintika). Zkoumanými geny byly geny kódující transmembránový protein P-glykoprotein, který je zodpovědný za eflux anthelmintik a dalších cizorodých látek z buňky do jejího extracelulárního prostoru, čímž zabraňuje poškození cílových buněk těmito léčivy. Indukce tvorby P-glykoproteinu může představovat výhodnou strategii tohoto parazita v ochraně před toxickými účinky anthelmintik. Cílem této práce tudíž bylo sledování exprese všech doposud prokázaných genů *H. contortus* (*pgp-2*, *pgp-3*, *pgp-9.1*, *pgp-9.2*, *pgp-10*, *pgp-11*, *pgp-13*, *pgp-16*) kódujících P-gp mezi citlivým a rezistentními kmeny ISE, IRE a WR.

Metodou pro zkoumání exprese genů byla zvolena kvantitativní PCR, která je schopna poměrně přesně kvantifikovat vstupní množství vyšetřovaného templátu DNA. Výsledné hodnoty, které kvantitativně zhodnotily expresi vybraných genů, byly zaneseny do grafů pro vizuální grafické porovnání. Na obr. 19, kde je znázorněna P-gp genová exprese u samců, jsou patrné výrazné signifikantní změny ( $P < 0,05$ ) u multi-rezistentního kmene. Jedná se o indukci exprese genů *pgp-9.1*, *pgp-9.2* a *pgp-16* ve srovnání s expresí týchž genů u kmene ISE, který je citlivý vůči působení všech anthelmintických léčiv. Při důkladnějším pozorování lze zaznamenat až sedminásobně vyšší expresi genu *pgp-16*, pětinásobně vyšší genu *pgp-9.1* a téměř čtyřnásobně vyšší genu *pgp-9.2*. Podobný jev lze pozorovat i u genu *pgp-16* kmene IRE, který vykazuje rezistenci vůči některým anthelmintikům (např. BZ), jehož exprese oproti ISE byla zvýšená téměř šestkrát. Z obrázku 20, na němž je zobrazena genová exprese P-gp u samic, jsou patrné signifikantní změny ( $P < 0,05$ ) u kmene WR. Jedná se o čtyřnásobně vyšší indukci exprese *pgp-9.2* a téměř třináásobně vyšší expresi *pgp-16* ve srovnání s expresí týchž genů kmene ISE. Pro gen *pgp-9.2* kmene IRE lze naopak zaznamenat jeho signifikantní inhibici oproti *pgp-9.2* kmene ISE.

Rozdíly v expresi genů *pgp-9.1*, *pgp-9.2* a *pgp-16* u citlivého a rezistentních kmenů by mohly skutečně naznačovat roli těchto genů v rozvoji rezistence. Podobně Raza et al. (2016) ve své studii pozorovali expresi P-gp genů u larválních stádií (L3) *H. contortus* citlivého (Kirby) a rezistentního (WAL) kmene. Transkripce genů *pgp-9.1*, *pgp-9.2* zde byla signifikantně vyšší u rezistentního kmene ve srovnání s citlivým (Kirby). Toto zjištění je v souladu s mojí prací i se studií Sarai et al. (2013), která popsala zvýšenou expresi *pgp-9* u rezistentního kmene WAL ve srovnání s citlivým Kirby, opět u larválních stádií. Tato studie však nemohla zohlednit tři různé homology *pgp-9*, protože jejich existence v té době nebyla známa. Williamson et al. (2011) taktéž uváděli signifikantně zvýšenou expresi *pgp-2* a *pgp-9* v multi-rezistentním izolátu ve srovnání s citlivým izolátem. Raza et al. (2016) naopak nepotvrdili zvýšenou transkripci *pgp-16* u rezistentního kmene WAL, což je v rozporu s mým pozorováním. Na rozdíl od těchto studií, které sledovaly změny P-gp genové exprese na larválních stádiích žijících ve vnějším prostředí, můj experiment je proveden přímo na parazitických stádiích *H. contortus*, a tak přímo dokazuje rozdíl v expresi P-gp genů

mezi rezistentními a citlivým kmenem. Dále je z výsledků zřejmé, že se liší exprese P-gp genů v závislosti na pohlaví a na tento fakt je potřeba brát zřetel v dalších studiích. U samců změny v expresi P-gp genů byly častější než u samic.

Zkoumání exprese vybraných genů pomocí kvantitativní PCR bylo provedeno jednou. Pro potvrzení našich výsledků by bylo nutné experimenty zopakovat. Do budoucna by bylo zajímavé zkoumat vliv různých koncentrací léčiv na expresi P-gp genů. Tímto způsobem by také bylo možno potvrdit či vyvrátit změny, které byly v expresi genů v této práci zaznamenány, ať se jednalo o inhibici či indukci. Otázkou však stále zůstává, zda jsou tyto uvedené změny významné pro reakci organismu parazita na působení anthelmintik a s tím související vznik či případný rozvoj rezistence. Tyto otázky jsou předmětem dalšího zkoumání exprese genů hlístice *H. contortus*.

## 7 Závěr

V této práci byla zkoumána exprese genů kódujících membránový efluxní transportér P-glykoprotein u parazitické hlístice vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Výsledky v předložené práci prokázaly změny v expresi genů mezi citlivým ISE a rezistentními IRE a WR. Konkrétně během exprese genů *pgp-9.1*, *pgp-9.2* a *pgp-16* se projevila signifikantní změna u rezistentních kmenů vlasovky slezové oproti citlivému. Rozdílná exprese těchto genů u rezistentních kmenů by mohla souviset se zvýšenou ochranou parazita proti léčivům, a tedy změna konstitutivní exprese těchto genů (*pgp-9.1*, *pgp-9.2* a *pgp-16*) by mohla být jedním z mechanismů vzniku rezistence u *H. contortus*. Správné pochopení mechanismů vzniku rezistence u *H. contortus* je zásadní pro vývoj léčiv a strategickou léčbu závažného onemocnění ovcí, hemonchózy.

## 8 Použité zkratky

L1	larva I. vývojového stádia
L2	larva II. vývojového stádia
L3	larva III. vývojového stádia
L4	larva IV. vývojového stádia
FECRT	test redukce počtu vajíček ve výkalech hostitele (z angl. faecal egg count reduction test)
ERP	doba, za kterou jsou po odčervení ve výkalech znovu detekována vajíčka parazitů (z angl. Egg Reappearance Period)
EHT	test líhnutí vajíček EHT (z angl. Egg Hatch Test)
MALDT	test vývoje larev na mikroagaru (z angl. Microagar Larval Development Test)
CYP	cytochrom P450
P-gp	p-glykoprotein
ISE	kmen <i>H. contortus</i> citlivý na anthelmintika (z angl. Inbred Susceptible Edinburgh)
IRE	kmen <i>H. contortus</i> rezistentní na BZ (z angl. Inbred Resistant Edinburgh)
WR	multi-rezistentní kmen <i>H. contortus</i> (z angl. White River)
MDRI	inhibitory zvyšující toxicitu anthelmintik (z angl. multi-drug resistance inhibitors)
BZ	benzimidazol
TBZ	thiabendazol
ML	makrocyclické laktony
IVM	ivermektin
PBO	piperonylbutoxid
DEPC	diethylpyrokarbonát
EDTA	kyselinu ethylendiamintetraoctovou
ddH <sub>2</sub> O	dvakrát destilovaná voda (z angl. double-distilled water)
DTT	dithiotreitol
dNTP	deoxynukleosid trifosfáty



RNA ribonukleová kyselina

DNA deoxyribonukleová kyselina

SG mix SYBR Green mix

cDNA DNA syntetizovaná podle RNA v reakci katalyzované enzymem reverzní transkriptázou (z angl. complementary cDNA)

qPCR Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. Real-time polymerase chain reaction)

## 9 Literatura

[1] Absorption Systems. [Online] [Citace: 21. 1. 2020.]

Dostupné z: <https://www.absorption.com/kc/efflux-transporters/>

[2] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalitiky*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

[3] BESIER, Brown et. al. *Chapter Six - Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants*. Advances in Parasitology. Amsterdam: Elsevier, 2016, 93, 181-238. ISSN 0065-308X.

[4] BRUTOVSKÁ, Anna a MARŠÁLEK, Miroslav. *Gastrointestinální parazité v době anthelmintické rezistence: Máme důvod k obavám?* České Budějovice, 2018. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta.

[5] CHROUST, Karel. *Výskyt anthelmintické rezistence u strongylidních nematodů ovcí a koní v České Republice*. Veterinární medicína (VETMED). Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2000, 45, 233-239. ISSN 0375-8427.

[6] CSIROpedia. [Online] [Citace: 3. 2. 2020.]

Dostupné z: <https://csiropedia.csiro.au/gastro-intestinal-parasite-control-of-ruminants/>

[7] DAVID, Marion et al. *Structural model, functional modulation by ivermectin and tissue localization of Haemonchus contortus P-glycoprotein-13*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Amsterdam: Elsevier, 2018, 8, 145-157. ISSN: 2211-3207.

[8] DYK, Václav a CHROUST, Karel. *Parazitologie a invazní choroby: Vybrané kapitoly z veterinární helmintologie: Určeno pro posl. Vys. Školy veter. V Brně*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1972.

[9] FICKOVÁ, Daniela, VLČEK, Jiří a TOPINKOVÁ, Eva. *Role P-glykoproteinového transportu v klinicky významných lékových interakcích*. Remedica. Praha: MEDICAL TRIBUNE CZ, s.r.o., 2002. ISSN 2336-3541.

[10] Frontiers in Pharmacology. [Online] [Citace: 10. 1. 2020.]

Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00351/full>

[11] GODOY, Pablo et al. *Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in Haemonchus contortus*. Parasites & Vectors. London: BioMed Central, 2016. DOI 10.1186/s13071-016-1317-8. ISSN: 1756-3305.

[12] GODOY, Pablo et al. *Haemonchus contortus P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport*. International Journal for Parasitology. Amsterdam: Elsevier, 2015, 45, 85-93. ISSN 0020-7519.

[13] HORÁK, František a kolektiv. *Ovce a jejich chov*. Praha: Nakladatelství Brázda, s.r.o., 2004. ISBN: 80-209-0328-3.

[14] HORÁK, Petr a SCHOLZ, Tomáš. *Biologie helmintů*. Nakladatelství Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-782-8.

[15] JELENKOVÁ, K. *Vliv monepantelu na expresi vybraných enzymů u vlasovky slezové*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd.

[16] KELLEROVÁ, Pavlína, MATOUŠKOVÁ, Petra, LAMKA, Jiří, VOKŘÁL, Ivan, SZOTÁKOVÁ, Barbora, ZAJÍČKOVÁ, Markéta, PASÁKA, Michael, SKÁLOVÁ, Lenka. *Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in Haemonchus contortus female and male adults*. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam: Elsevier, 2019, 273, 24-31. ISSN: 0304-4017.

[17] KLIMEŠ, Jiří a kolektiv. *ZOOLOGIE pro veterinární mediky*. Brno, 2004. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat. ISBN: 80-7305-489-2.

[18] KOTZE, Andrew, PRICHARD, Roger. *Chapter Nine - Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus: History, Mechanisms and Diagnosis*. *Advances in Parasitology*. Amsterdam: Elsevier, 2016, 93, 397-428. ISSN 0065-308X.

[19] KUDRNÁČOVÁ, Marie a LANGROVÁ, Iva. *Occurrence and seasonality of domestic sheep gastro-intestinal parasites*. *Scientia agriculturae bohemica*. Czech University of Life Sciences Prague. Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources. Berlín: De Gruyter, 2012, 43, 104-108. ISSN 1211-3174.

[20] LabGuide – Průvodce laboratoří. [Online] [Citace: 12. 3. 2020.]

Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

[21] LabGuide – Průvodce laboratoří. [Online] [Citace: 12. 3. 2020.]

Dostupné z: <https://labguide.cz/sybergreen/>

[22] LAMKA, Jiří a DUCHÁČEK, Lubomír. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1243-0.

[23] LANGROVÁ, Iva a kolektiv. *Efektivní systém prevence parazitóz v chovu ovcí*. Praha, 2014. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Katedra zoologie a rybářství. ISBN 978-80-7403-132-8

[24] LECOVÁ, Lenka. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

[25] LOCHMANOVÁ, Eva. *Hemonchóza ovce domácí - výsledky laboratorní kontroly v průběhu experimentální infekce*. Hradec Králové, 2010. Diplomová práce. Univerzita

Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra farmakologie a toxikologie.

[26] MATOUŠKOVÁ, Petra, VOKŘÁL, Ivan, LAMKA, Jiří, SKÁLOVÁ, Lenka. *The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths*. Trends in Parasitology. Amsterdam: Elsevier Trends Parasitol, 2016, 32, 481-491. ISSN: 14714922.

[27] MERTLOVÁ, Ivana. *Vliv ivermektinu na dospělce vlasovky slézové*. Hradec Králové 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd.

[28] MERTO VÁ, Pavlína. *Léková rezistence u parazitických helmintů*. Hradec Králové, 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd.

[29] PALONCA, Kateřina. *Vnitřní parazitózy malých přežvýkavců a jejich prevence*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Agronomická fakulta. Ústav výživy zvířat a pícninářství.

[30] PECHANDOVÁ Kristina, BUZKOVÁ, Helena, SLANAŘ, Ondřej, PERLÍK, František. *Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein*. Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie. Praha: Lexis-Nexis CZ, 2006, 14 (35), No. 4, 196–201. ISSN 1210-7921.

[31] PRCHAL, Lukáš. *Transport a biotransformace anthelmintik u citlivých a rezistentních kmenů vlasovky slézové (Haemonchus contortus)*. Hradec Králové, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd.

[32] RAZA, Ali et al. *Effects of in vitro exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in Haemonchus contortus larvae*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Amsterdam: Elsevier, 2016, 6, 103-115. ISSN: 2211-3207.

[33] RAZA, Ali et al. *Effects of third generation P-glycoprotein inhibitors on the sensitivity of drug-resistant and -susceptible isolates of Haemonchus contortus to anthelmintics in vitro*. Veterinary Parasitology. Amsterdam: Elsevier, 2015, 211, 80-88. ISSN 0304-4017.

[34] ResearchGate. [Online] [Citace: 15. 1. 2020.]

Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/FAMACHAC-eye-color-chart-being-used-to-check-level-of-anemia\\_fig5\\_315628684](https://www.researchgate.net/figure/FAMACHAC-eye-color-chart-being-used-to-check-level-of-anemia_fig5_315628684)

[35] RYŠAVÝ, Bohumil. *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1988. ISBN: 80-04-20864-9.

- [36] SCHÁŇKOVÁ, Štěpánka, LANGROVÁ, Iva, VADLEJCH, Jaroslav, JANKOVSKÁ, Ivana. *Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metod in vivo*. Praha, 2013. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Katedra zoologie a rybářství. ISBN 978-80-213-2411-4.
- [37] SCHÁŇKOVÁ, Štěpánka, LANGROVÁ, Iva a VADLEJCH, Jaroslav. *Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metod in vitro*. Praha, 2013. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Katedra zoologie a rybářství. ISBN: 978-80-213-2412-1.
- [38] SKÁLOVÁ, L.; BOHOUSOVÁ, I. a kol. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2013. ISBN: 978-80-246-1917-0.
- [39] ŠOROVÁ, Renáta. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové.
- [40] VERNEROVÁ, E., VONDROVÁ, R., KISOVÁ H., SVOBODOVÁ, V. *Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematode parasites of sheep in the Czech Republic*. Veterinární medicína (VETMED). Praha: Česká akademie zemědělských věd, 2009, 54, 467–472. ISSN 0375-8427.
- [41] VOLF, Petr; HORÁK, Petr a kolektiv. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: TRITON, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.
- [42] VŠCHT Praha. [Online] [Citace: 5. 3. 2020.]
- Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/qpcr/>