

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd



STUDIUM MOŽNÉHO POUŽITÍ SERTRALINU
PROTI GASTROINTESTINÁLNÍM NEMATODÁM

Diplomová práce

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

Nikola Vodvářková

Hradec Králové, 2021

PROHLÁŠENÍ

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

Nikola Vodvářková

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych chtěla poděkovat své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za její stále pozitivní přístup. Další poděkování patří mé konzultantce Mgr. Markétě Zajíčkové především za pomoc při experimentální části diplomové práce a při zpracovávání výsledků. Celá katedra biochemických věd byla příjemným místem pro práci. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za obrovskou podporu po celou dobu studia.

Tato práce byla finančně podpořena z grantů Univerzity Karlovy (projekt SVV260550)
a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1568519)

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Nikola Vodvářková

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

Název: Studium možného použití sertralinu proti gastrointestinálním nematodám

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je celosvětově rozšířená parazitická hlístice gastrointestinálního traktu malých přežvýkavců, která každoročně způsobuje obrovské škody v živočišné produkci. U svých hostitelů vyvolává onemocnění zvané hemonchóza, pro které je typická především anémie v důsledku velkých ztrát krve. Tyto potíže vedou ke snížení produktivity a v některých případech dokonce i k úmrtí hostitele. Pro terapii hemonchózy se využívá poměrně omezená paleta anthelminticky účinných léčiv, přičemž nové látky přibývají jen vzácně. Vzhledem k masivnímu užívání stejných anthelmintik a vysoké adaptabilitě si parazit v průběhu času vytvořil rozsáhlou rezistenci a léčba tak přestává být účinná. Z tohoto důvodu je třeba hledat nová účinná léčiva s jiným mechanismem účinku. Jednou z možností je testovat anthelmintickou účinnost u běžných léčiv z jiných terapeutických skupin.

V této práci byl zkoumán potenciální anthelmintický účinek, metabolismus a toxicita sertralinu, který se běžně využívá pro terapii depresivních a úzkostných onemocnění u lidí. Bylo zjištěno, že sertralin skutečně vůči *H. contortus* vykazuje anthelmintickou aktivitu, přičemž samice se ukázaly jako méně citlivé než samci. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl studován metabolismus sertralinu v *H. contortus*. Byly nalezeny hydroxylované metabolity, ale většina parentní látky zůstala nemetabolizována. Metabolismus se signifikantně nelišil mezi kmeny citlivými a rezistentními na ostatní anthelmintika, ani v závislosti na pohlaví. V ovčích hepatocytech sertralin v koncentracích, které byly dostatečné pro anthelmintický účinek, nevykazoval toxicitu. Ta byla patrná až při koncentracích vyšších.

Sertralin se na základě této práce jeví jako potenciálně využitelný pro terapii hemonchózy. Jeho účinky však musí být prozkoumány *in vivo*.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Nikola Vodvářková

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

Title of diploma thesis: The study of possible use of sertraline against gastrointestinal nematodes

Haemonchus contortus is a widespread parasitic nematode infecting the gastrointestinal tract of many small ruminants that causes enormous damage to animal production every year. It is responsible for a disease in its host called Haemonchosis the main characteristic of which is anaemia caused by severe blood loss. This is responsible for the reduced productivity of the animal, and in some cases results in the death of the host. A relatively limited range of anthelmintic drugs is used for the treatment of Haemonchosis with new substances rarely being added to the list of treatments. Due to the massive use of the same anthelmintic drugs and the parasites adaptability, extensive resistance is pervasive with current treatments being no longer effective. For this reason it has become necessary to look for new effective drugs that have a different mechanism of action (MOA). One possibility is to test the anthelmintic efficacy of common drugs from other therapeutic groups.

In this work, the potential anthelmintic effect, metabolism and toxicity of sertraline was investigated. Sertraline is a commonly prescribed drug for the treatment of depressive and anxiety disorders in humans. Our results showed that sertraline possessed anthelmintic activity against *H. contortus*, with females proving to be less sensitive than males. The metabolism of sertraline in *H. contortus* was studied using high performance liquid chromatography. Hydroxylated metabolites were found, but most of the parent compound remained unmetabolized. Metabolism did not differ significantly between strains sensitive or resistant to other anthelmintics, it was also seen that strain gender did not have any effect on outcome. In sheep hepatocytes, sertraline did not show toxicity at concentrations sufficient for the anthelmintic effect and toxicity being only evident at higher levels.

Based on this work, sertraline appears to be potentially useful for the treatment of haemonchosis. However, its effects must be further investigated *in vivo*.

OBSAH

1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. Taxonomické zařazení <i>Haemonchus contortus</i>	9
2.1.1. Helminté	9
2.1.2. <i>Nematoda</i>	11
2.1.3. Řád Strongylida	15
2.1.4. Nadčeleď Trichostrongyloidea	15
2.1.5. Čeleď <i>Haemonchidae</i>	15
2.1.6. Druh <i>Haemonchus contortus</i>	15
2.2. <i>Haemonchus contortus</i>	16
2.2.1. Výskyt a význam	16
2.2.2. Životní cyklus	17
2.2.3. Symptomy a diagnostika	18
2.2.4. Prevence infekcí způsobených <i>H. contortus</i>	20
2.2.5. Léčba infekcí <i>H. contortus</i>	23
2.3. Anthelmintika	24
2.3.1. Mechanismus účinku anthelmintik	24
2.3.2. Anthelmintické látky používané pro léčbu hemonchóz	25
2.3.3. Přírodní látky s anthelmintickým účinkem	32
2.4. Metabolismus anthelmintik u <i>H. contortus</i>	33
2.5. Rezistence	35
2.5.1. Mechanismus rezistence u některých léčiv	36
2.5.2. Enzymy metabolizující xenobiotika a rezistence	42
2.5.3. Diagnostika rezistence	42
2.6. Vývoj nových léčiv	44
2.6.1. Drug repurposing	45
2.7. Sertralin	48
3. Cíl práce	50
4. Experimentální část	51
4.1. Materiál	51
4.1.1. Chemikálie	51
4.1.2. Spotřební materiál	53
4.2. Pomůcky a přístroje	54

4.3. Metody.....	55
4.3.1. Příprava pufrů, médií a roztoků.....	55
4.3.2. Experimenty s <i>H. contortus</i>	61
Biologický materiál	61
Izolace dospělců <i>H. contortus</i>	61
Inkubace dospělců se sertralinem.....	62
Stanovení množství ATP v dospělcích	62
4.3.3. Experimenty s hepatocyty	63
Příprava destičky pro inkubaci	63
Izolace a inkubace hepatocytů	63
Test cytotoxicity MTT	65
4.3.4. Extrakce sertralinu a jeho metabolitů ze vzorku	66
4.3.5. Analýza metabolitů sertralinu	66
Identifikace metabolitů sertralinu.....	66
Semikvantifikace a potvrzení identifikovaných metabolitů	68
4.3.6. Stanovení bílkoviny pomocí BCA assay.....	70
5. Výsledky	72
5.1. Vliv sertralinu na hladinu ATP u <i>H. contortus</i>	72
5.2. Metabolismus sertralinu u <i>H. contortus</i>	75
Identifikace metabolitů sertralinu.....	75
Semikvantifikace vzniklého metabolitu.....	79
5.3. Vliv sertralinu, albendazolu a ivermektinu na ovčí hepatocyty	80
6. Diskuze	83
7. Závěry.....	88
Seznam použitých zkratk.....	89
Zdroje	91

1. Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je parazitická hlístice z kmene *Nemathelminthes*. V gastrointestinálním traktu svých hostitelů, kterými bývají malí přežvýkavci, se živí krví, čímž hostitele poškozují a snižují jejich produktivitu. Hlavně u mláďat a samic v období porodu může infekce *H. contortus* vést dokonce až ke smrti. Dříve byl tento parazit rozšířený hlavně v teplejších oblastech, ovšem vzhledem k vysoké adaptabilitě se rozšířil prakticky po celém světě a každoročně způsobuje významné ztráty v živočišné produkci. Pro terapii hemonchóz se využívají léčiva zvaná anthelmintika. Kvůli jejich masivnímu a často nevhodnému užívání a již zmíněné adaptabilitě *H. contortus* tato léčiva přestávají být účinná. Rezistence se vyskytuje prakticky u všech užívaných skupin léčiv, což výrazně ohrožuje udržitelnost chovu ovcí a koz po celém světě. U jednoho z nejnovějších anthelmintik na trhu – monepantelu, se začala objevovat rezistence již několik let po jeho uvedení do klinické praxe.

Z tohoto důvodu je nezbytné nalézt nová léčiva s odlišným mechanismem účinku, než které má stávající terapie. Jednou z možností je testovat anthelmintickou účinnost léčiv schválených a používaných k jiným terapeutickým účelům. Mezi léčiva s popsáním účinkem proti některým parazitickým hlísticím patří i sertralin (Weeks et al. 2018), který je běžně užíván v terapii depresivních a úzkostných onemocnění u lidí.

Cílem této práce bylo zjistit, zda sertralin představuje nadějnou látku pro léčbu hemonchóz. Jeho účinek byl zkoumán na dvou kmenech *H. contortus* – ISE (kmen citlivý na anthelmintika) a IRE (kmen rezistentní na benzimidazoly). Byl také hodnocen metabolismus sertralinu na kmenech ISE, IRE a WR (multirezistentní kmen). Pro zjištění potenciální toxicity u ovcí, hostitele *H. contortus*, byl hodnocen účinek sertralinu na ovčí hepatocyty.

2. Teoretická část

2.1. Taxonomické zařazení *Haemonchus contortus*

2.1.1. Helminté

Termín helmint představuje souhrnné označení pro nepříbuzné skupiny organismů, které jsou z praktického hlediska sdružované do jednoho celku (viz obr. 1). Z tohoto důvodu také dodnes neexistuje jednotné dělení helmintů. Typickým znakem pro všechny tyto nepříbuzné skupiny je oboustranně souměrné protostomní tělo (Volf & Horák, 2007).

Helminté jsou bezobratlí živočichové, kteří se dělí na dvě základní skupiny, a to ploché červy (*Platyhelminthes*) a oblé červy (*Nemathelminthes*). Podkmen *Platyhelminthes* zahrnuje přes 9000 parazitických druhů. Mezi nejdůležitější třídy tohoto podkmene patří *Trematoda* (motolice) a *Cestoda* (tasemnice). Podkmen *Nemathelminthes*, nazývaný také jako oblovci, zahrnuje přes 100 000 druhů. Nejdůležitější třídou oblých červů jsou *Nematoda* (hlístice). Dalším, méně početným podkmenem, jsou pak *Acanthocephales* neboli vrtejši, kterých je na 500 druhů (Ryšavý, 1989).

Z hlediska ontogenetického vývoje jsou helminti velmi různorodou skupinou. Kromě dospělců a vajíček mohou mít i poměrně velký počet odlišných larválních stádií, jejichž znalost je nezbytná pro pochopení epidemiologie a patogeneze onemocnění způsobených helminty a také jejich správnou diagnostiku a léčbu. Během svého vývoje mohou tato různá stádia vystřídat i několik různých mezipřehoditelů. Kromě přímých cyklů s jedním hostitelem se setkáváme i s dvou-, tří- nebo dokonce čtyřhostitelskými cykly (Volf & Horák, 2007). Podle vývoje můžeme helminty rozdělit na geohelminty a biohelminty. U geohelmintů (značná část zástupců třídy *Nematoda*, *Monogea*) probíhá vývoj bez mezipřehoditelů, tzn. prostřednictvím přímého cyklu. Životní cykly biohelmintů (třídy *Trematoda*, *Cestoda*, část třídy *Nematoda* a podkmen *Acanthocephales*) naopak probíhají vždy se střídáním hostitelů (Ryšavý, 1989).

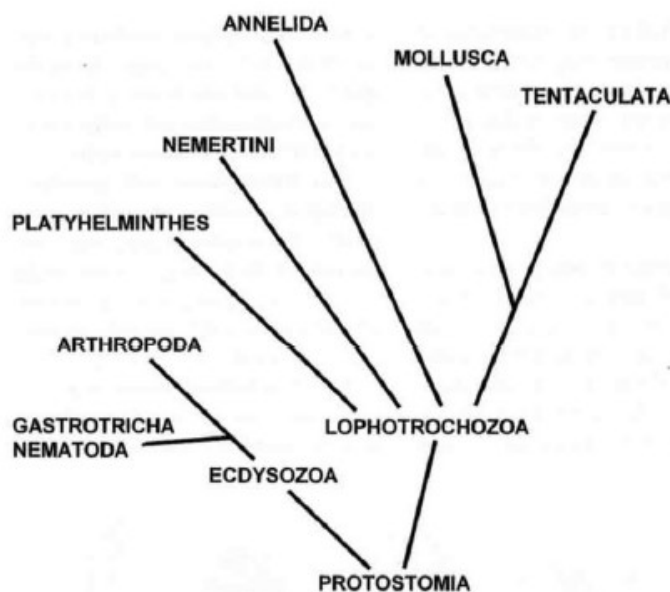
Onemocnění způsobené dospělými červy nebo jejich infekčními nižšími stádii se nazývají helmintózy a mohou postihovat jak člověka, tak zvířata i rostliny. Helmintózy u lidí jsou nejčastější v tropických zemích rozvojového světa (Kořínková, 2006).

Helminté se mohou do těla hostitele dostat několika různými způsoby. Nejčastěji je to perorální cesta, buď formou predace (pozření jednoho hostitele druhým), nebo náhodným pozřením

potravy kontaminované vajíčky nebo larvami helmintů. Zvláštní formou je pak perorální přenos mateřským mlékem. Dalšími možnostmi je přenos perkutánní (tj. přes povrch těla), přenos spojivkovým vakem, popř. prostřednictvím dalších tělních otvorů nebo také kongenitální přenos (Kořínková, 2006).

Přítomností helminta v těle hostitele či mezihostitele dochází k poškozování jejich organismu, a to především mechanicky (např. tlakem na okolní tkáň, snižováním průchodnosti střeva, činností různých specializovaných struktur na těle helminta nebo migrací vývojových stádií uvnitř těla hostitele), dále pak produkcí řady zplodin metabolismu, které působí toxicky zejména na nervovou soustavu hostitele, nebo ochuzováním hostitele o jeho živiny, vitamíny a jiné esenciální látky. Může také docházet ke vzniku celého řetězce imunitních reakcí, a to jak na buněčné, tak na humorální úrovni (Ryšavý, 1989).

Negativní působení helmintů se může projevovat lokálně, kdy jsou postiženy struktury v místě výskytu parazitů. Typickým příkladem je poškození zažívacího traktu (hlavně mechanického původu) s následnými těžkými poruchami zažívání, průjmy a ztrátou iontů. Napadený hostitel je taktéž náchylnější k dalším onemocněním, zejména infekčního charakteru. Většinou však dochází k postižení celkového charakteru, kdy je parazitem ovlivněn celý hostitelský organismus. Nejčastěji pak dochází ke změnám krevního systému, kdy se mění složení krve a ubývá hemoglobin, což se následně projeví jako anémie. Jak lokální, tak celkové poškození mohou vést až ke smrti hostitelského organismu. Průběh helmintózy má však zpravidla spíše chronický charakter (Ryšavý, 1989).



Obr. 1. Zjednodušený fylogenetický strom protostomních živočichů. Konstrukce dle 18S rRNA a Hox genů (převzato z Volf & Horák, 2007, str. 139).

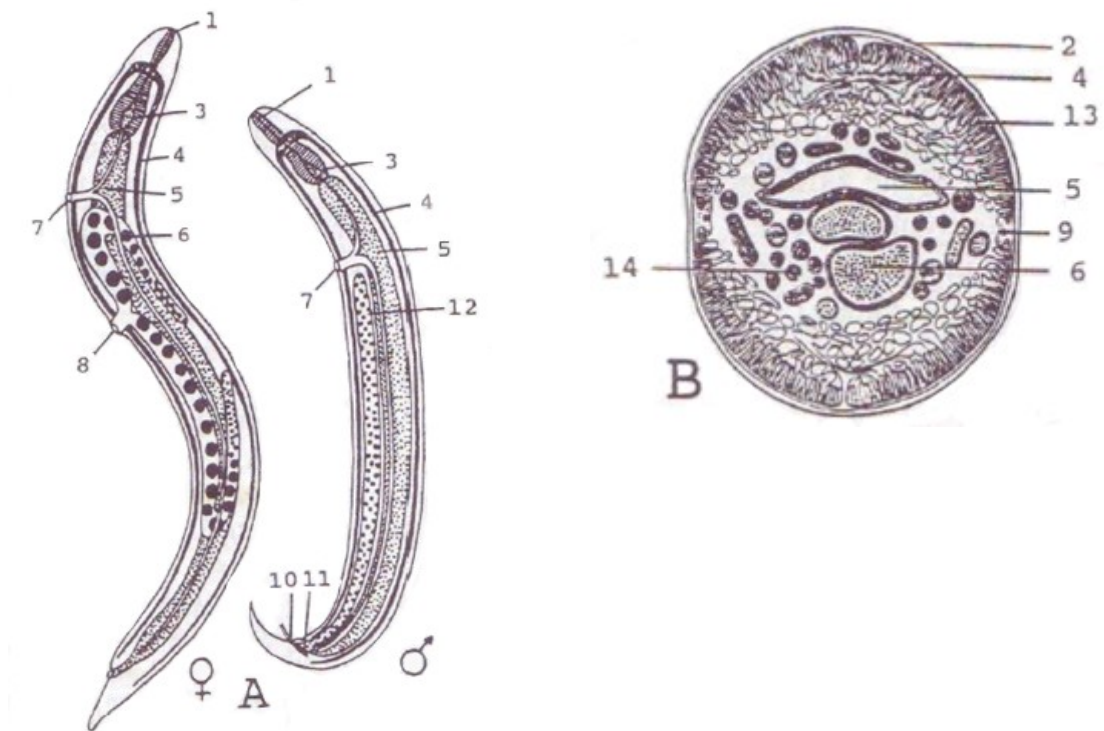
2.1.2. Nematoda

Nematoda (hlístice) jsou jednou z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin živočichů, přičemž dosud bylo popsáno téměř 20 tisíc druhů parazitujících na obratlovcích. Hlístice proto mají značný negativní význam jako endoparazité hospodářských, domácích a volně žijících zvířat i člověka. Nejčastěji se dospělci těchto parazitů nacházejí v trávicím traktu. Mezi další místa lokalizace patří také krevní a lymfatický oběh, nervová soustava, urogenitální trakt, dýchací soustava nebo i kůže (Volf & Horák, 2007). Existuje ale i mnoho druhů, které žijí volně nebo parazitují na bezobratlých či rostlinách. U rostlin často dochází k poškození povrchových buněk kořenů, avšak hlístice mohou pronikat i do podzemních a nadzemních částí rostlin, způsobovat fyziologické poruchy a následné odumírání částí nebo celých rostlin, popř. mohou přenášet i virózy. Saprofágní půdní a vodní druhy se vzhledem ke svým vysokým biomasám významně podílejí na koloběhu látek v ekosystémech, resp. na dekompozičních procesech (Laštůvka, 1996).

Stavba těla

Pro tělo hlístic je charakteristický kruhový průřez a protáhlý, většinou niťovitý tvar. Mohou dosahovat různých rozměrů – od těch mikroskopických až po několik metrů, přičemž častý je pohlavní dimorfismus, kdy samička dorůstá větších rozměrů než sameček (Volf & Horák, 2007). Barva těla hlístic je většinou bělavá, nažloutlá, hnědožlutá, popř. červená, a to u druhů, které se živí krví svých hostitelů (Ryšavý, 1989).

Tělo hlístic se skládá ze tří základních částí – přední, střední a zadní (viz obr. 2). Přední (hlavová) část se vyznačuje velkou pohyblivostí a zajišťuje tak orientaci v prostředí. Nalezneme zde orgány k přijímání potravy (ústa, pysky a jícen) a komplet receptorických orgánů. Střední část těla nese orgány zaživací soustavy (střevo), pohlavní orgány a jejich vývody a osmoticko-regulační aparát. V zadní (kaudální) části pak vyúsťují pohlavní orgány samečků a střevo (Ryšavý, 1989).



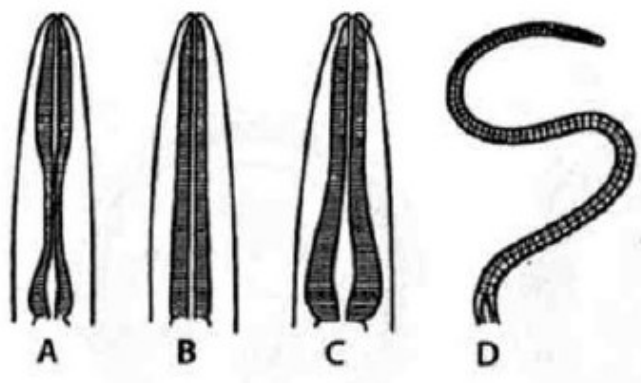
Obr. 2. Stavba těla nematod (A – celková morfologie, B – příčný řez): 1 – ústa, 2 – kutikula, 3 – jícen, 4 – nervové provazce, 5 – střevo, 6 – děloha, 7 – vývod exkrece, 8 – vývod pohlavní soustavy, 9 – exkrece kanál, 10 – řitní otvor, 11 – spikuly, 12 – varlata, 13 – vrstva podélné svaloviny, 14 – vaječník (převzato z Laštůvka, 1996, str. 83).

Na povrchu těla se nachází vícevrstevná kutikula, která se při růstu nedospělých jedinců několikrát svléká (Sedlák, 2005). Kutikula byla dříve považovaná za jednoduchý povrch, ale ukázalo se, že je často rozdělena různě hlubokými zářezy do prstencovitých útvarů – pseudosegmentace, které vytvářejí velmi složité struktury a mohou být dokonce použity pro odlišení morfologicky blízkých druhů (Ryšavý, 1989).

Pod kutikulou je pokožka označovaná jako hypodermis. Svalovina je uložena podélně a většinou je uspořádána do čtyř pásů oddělených hypodermálními lištami. Mezi touto tělní stěnou a trávicím traktem pak nalezneme kompaktní dutinu zvanou pseudocoel, která je vyplněná tekutinou a nahrazuje oběhovou soustavu, která chybí. Může sloužit také jako hydrostatická kostra a být tak oporou pro celé tělo. Trávicí soustava i pohlavní orgány jsou v tělní dutině uloženy volně a přirostlé jsou pouze ve svých vývodech (Sedlák, 2005).

Trávicí soustava je u většiny parazitických hlístic vzhledem ke způsobu jejich života dobře vyvinutá. Zdrojem potravy pro parazitické hlístice může být trávenina z trávicího traktu hostitele

(např. *Ascaris lumbricoides*), krev (např. *H. contortus*, *Strongylus vulgaris*) či jiné tělní tekutiny (např. *Loa loa*), buněčná drť z parazitovaných tkání, popř. obsah rostlinných buněk (např. *Globodera rostochiensis*). Část živin mohou hlístice také přijímat povrchem těla. Ústní dutina může mít různý tvar a velikost, protože je anatomicky přizpůsobena příjmu daného typu potravy. Na jejím počátku mohou být také různé pohyblivé útvary zvané pysky. Za ústní dutinou pak následuje svalovitý hltan, který zajišťuje příjem potravy a u různých nematod se liší (viz obr. 3). Střevo většinou představuje jednoduchá trubice, která u samic ústí samostatným análním otvorem, u samců je vyústění společné s pohlavní soustavou do kloaky (Volf & Horák, 2007).



Obr. 3. Různé typy hltanů u nematod: A – rhabditoidní (rhabditiformní), B – strongyloidní (filariformní), C – oxyuroidní, D – trichuroidní (převzato z Volf & Horák, 2007, str. 202).

Vylučovací soustava je tvořena tzv. protonefridiálními chodbami, které se nacházejí v postranních hypodermálních lištách. Po spojení těchto chodeb na přídi těla vzniká samostatný vylučovací otvor. Kromě protonefridiálních chodeb mohou sloužit k exkreci také kožní žlázy představované velkými párovými žlaznatými buňkami, které rovněž ústí v přední části těla (Sedlák, 2005).

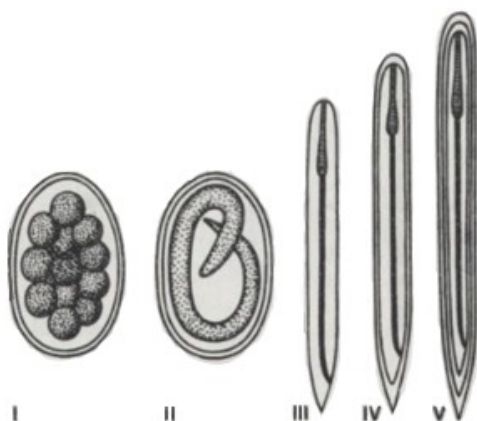
Nervovou soustavu představuje obhltanový prstenec složený z gangliových buněk. Z tohoto prstence vybíhá podélně několik párů nervových provazců, které jsou navzájem propojené a nacházejí se převážně v hypodermálních lištách, odkud inervují svalovinu, anus a kopulační orgány. Smyslové funkce zajišťují chemoreceptory na přídi – amfidy, a na zádi – fazmidy, a dále mechanoreceptory, tzv. smyslové papily (Sedlák, 2005).

Svalová soustava je poměrně jednoduchá a skládá se pouze z podélných svalů. Kromě nich se u hlístic setkáváme ještě se specializovanými svalovými buňkami asociovanými hlavně s trávicím traktem a pohlavní soustavou (Volf & Horák, 2007).

Cévní ani dýchací soustava u hlístic nejsou přítomny. K dýchání dochází prostřednictvím povrchu těla, někdy pomáhá přenosu plynů hemoglobin rozpuštěný v tělní tekutině. Některé druhy hlístic mohou také na různě dlouhou dobu přecházet na anaerobní metabolismus (Laštůvka, 1996).

Nematoda jsou z větší části gonochoristé. Pohlavní orgány jsou trubicovité. U samic je pohlavní vývod samostatný a nachází se ve střední části těla, zatímco samci mají vytvořenou kloaku – společné vyústění pohlavního a trávicího traktu (Sedlák, 2005). Samci mají trubicovité varle přecházející v chámovod, který je tvořen semenným váčkem a vývodným kanálkem. Okolo tohoto vývodu se nacházejí pomocné kopulační orgány – spikuly, jež pomáhají přichycení samečka při kopulaci, a gubernakulum, které usměrňuje pohyb spikul v potřebném směru (Ryšavý, 1989). U některých skupin nematodů mají samci v kaudální části těla útvar zvaný kopulační burza (*bursa copulatrix*) složený obvykle ze tří laloků vyztužených žebry (Volf & Horák, 2007). Samičí pohlavní orgány jsou většinou párovité. Jsou tvořeny dvěma tenkými trubicovitými vaječníky, které přecházejí ve vejcovody a dělohu. Ve střední části těla se dělohy spojují v krátký kanálek – pochvu, která vyúsťuje na povrch na břišní straně těla do samičího pohlavního otvoru – vulvy. Počet děloh u jednotlivých druhů hlístic se může lišit (Ryšavý, 1989).

Vajíčka jsou velmi odolná a mají vícevrstevný obal. Běžná je oviparie (vejcorodost). Vývoj dospělců pak probíhá přes čtyři larvální stádia (L1 – L4), jejichž přeměna je oddělena svlékáním staré a tvorbou nové kutikuly (viz. obr. 4) (Volf & Horák, 2007). Při jejich růstu se pouze zvětšuje velikost buněk. Počet buněk je od začátku determinovaný, což jim prakticky znemožňuje regeneraci (Sedlák, 2005). Larvu L3 nazýváme larvou infekční (invazivní), ta může při příchodu do hostitele vyvolat novou nákazu. L3 buď setrvává ve starých kutikulách, které vytvářejí ochranný obal, nebo z nich vylézá (Ryšavý, 1989).



Obr. 4. Základní schéma životního cyklu geohelmintů: i – vajíčko, II – vajíčko s larvou, III – larva 1. stádia L1, IV – larva 2. stádia L2, V – larva 3. stádia L3 (infekční); pozn. u biohelmintů vývoj larev L1 – L3 probíhá v mezihostiteli (převzato z Ryšavý, 1989 – str. 126, obr. 78).

2.1.3. Řád Strongylida

Strongylida jsou velkou skupinou parazitických nematod trávicího traktu, dýchacího nebo krevního systému. Parazitují na teplokrevných obratlovcích, plazech i obojživelnících. Mezi charakteristické znaky patří mohutná kopulační burza u samců a také hltna filariformního typu. Jedná se o geohelmintry i biohelmintry. Většina zástupců má tkáňovou fázi vývoje v definitivním hostiteli (Volf & Horák, 2007).

2.1.4 Nadčeleď Trichostrongyloidea

Tato nadčeleď je největší v rámci řádu (Volf & Horák, 2007). Její zástupci mají tenké, 0,5-10 cm dlouhé tělo, pro které jsou typické chybějící nebo redukované pysky a ústní kapsula na začátku trávicí soustavy, a u samců, stejně jako v celém řádu, dobře vyvinutá kopulační burza (Laštůvka, 1996; Volf & Horák, 2007). Parazitují především v trávicím traktu, hlavně v žaludku a tenkém střevě, a to zejména u savců (Volf & Horák, 2007). Jedná se o geohelmintry, jejichž vajíčka nebo larvičky se dostávají do vnějšího prostředí s hlenem nebo trusem hostitele (Laštůvka, 1996; Volf & Horák, 2007). Larvy žijí část života ve vnějším prostředí, L3 si ponechávají kutikulu přechodného stádia, k jejímu svlékání dochází až v hostiteli (Volf & Horák, 2007).

2.1.5. Čeleď *Haemonchidae*

Jednou z velmi důležitých čeledí v rámci Trichostrongyloidea jsou *Haemonchidae*, zahrnující rody jako *Haemonchus*, *Marshallagia*, *Ostertagia* nebo *Teladorsagia*, které parazitují zejména v trávicím systému hospodářských zvířat (dobytka, ovce, kozy) (NCBI Taxonomy Browser, cit. 2021-02-13).

2.1.6. Druh *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus neboli vlasovka slezová je jedním z nejvýznamnějších parazitů malých přežvýkavců, a to především ovce a kozy. Při napadení zvířete je lokalizován v jeho slezu, kde sají krev, čímž svého hostitele poškozují. Vzhledem k vysoké patogenitě a rychlému vývoji působí každoročně obrovské ztráty v živočišné produkci po celém světě (Besier et al., 2016b).

2.2. *Haemonchus contortus*

2.2.1. Výskyt a význam

H. contortus je parazit vázaný především na vlhké a teplé oblasti (Waller, 2005). Prevalence hemonchózy u pasoucích se zvířat je proto zvláště vysoká v tropických klimatických pásmech obou hemisfér v oblasti mezi rovnoběžkami 23,5° severní a jižní šířky. V důsledku vysoké úrovně adaptability došlo v průběhu času ke genetickým odchylkám, které poskytly selektivní výhodu konkrétním kmenům, a díky tomu se *H. contortus* navzdory svým původním požadavkům rozšířil i na méně příznivá místa jako jsou severní Evropa nebo Kanada. V současné době se tak vyskytuje téměř ve všech oblastech, kde se chovají malí přežvýkavci bez ohledu na klimatické pásmo (Besier et al., 2016b).

V tropických a subtropických oblastech larvy obvykle přežívají po relativně krátké období (týdny), nicméně díky stálým vysokým teplotám se velká část vajíček vyloučená do prostředí může rychle vyvinout. V porovnání s tím je v chladnějším prostředí rozsah vývoje vajíček omezený nebo se dokonce na nějakou dobu zastaví, ale infekční larvy přežívají mnohem delší dobu (měsíce) (Besier et al., 2016b).

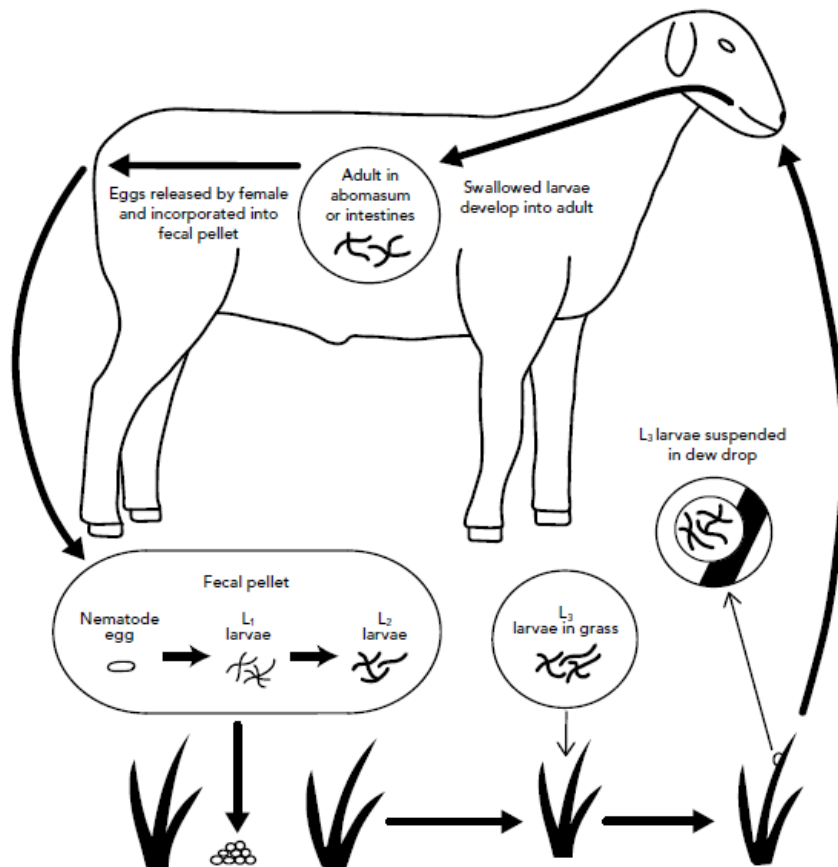
Hemonchóza je v hlavních endemických zónách považována za ekonomicky nejzásadnější onemocnění způsobené parazitickými hlísticemi. To je způsobeno častým výskytem a také vysokou úmrtností u malých přežvýkavců. Ztráty zvířat se velmi liší mezi jednotlivými regiony, v závislosti na ročním období, na podmínkách prostředí a na účinnosti přijatých opatření (Besier et al., 2016b). Ekonomické ztráty jsou způsobeny jednak faktory přímými, jako jsou zpomalení růstu, snížení produkce mléka a vlny, ale také nepřímými ztrátami, kterými jsou vynaložené prostředky na léčbu a prevenci infekce. Jen v Indii byly roční ztráty vyčísleny na 106 milionů amerických dolarů (Arsenopoulos et al., 2021).

2.2.2. Životní cyklus

Životní cyklus začíná kladením oplodněných vajíček ve slezu hostitele. Tato vajíčka jsou následně vyloučena do vnějšího prostředí spolu s výkaly (Machen et al., 1998). Líhnutí vajíček v prostředí obvykle trvá 1-2 dny za vzniku larev 1. stádia (L1). Tyto larvy se živí bakteriemi a následně u nich proběhne svlékání za vzniku L2 a později L3 stádia. Celý proces probíhá ve vnějším prostředí. L3 stádium má na povrchu ochrannou vrstvu tvořenou kutikulou, která jej chrání před nepřízní okolních podmínek, ale rovněž mu brání ve výživě (Roeber et al., 2013). Nejpozději do 48 hodin po pozření hostitelem dochází k rozrušení ochranné vrstvy za vzniku stádia L4 v prostředí žaludku, popř. horní části duodena, a to díky kombinaci několika faktorů, kterými jsou teplota, redoxní potenciál, pH, ale zejména hladina oxidu uhličitého (Roeber et al., 2013; Roberts et al., 2009). Protože kombinace těchto několika podmínek je charakteristická pro různé organismy, je *H. contortus* poměrně specifickým parazitem zejména malých přežvýkavců. Stádium L4 saje krev ze slezu a následně díky tomu dochází k poslednímu svlékání za vzniku dospělého jedince, který je po 15 dnech schopen reprodukce (Roberts et al., 2009). Celý proces od vajíčka po reprodukčně schopného dospělce trvá zhruba 3 týdny. Jediná samička je schopná za den naklást tisíce oplodněných vajíček, což vede k velmi rychlé kontaminaci prostředí a potenciálu nákazy celého stáda (Roeber et al., 2013). Celý životní cyklus je vidět na obr. 5.

Dospělí jedinci parazitují ve slezu, kde se živí krví, což jim umožňují dobře vyvinuté struktury v oblasti ústního otvoru, které jsou schopné prožezat se mukózou slezu. Jinak průhledným parazitům dává krev červenou barvu. U samiček se kolem takto zbarveného střeva točí bíle zbarvené vaječníky s velkým množstvím vajíček (Roberts et al., 2009).

Vlasovky jsou též schopné tzv. hypobiózy, kdy se během zimního nepříznivého období pozřené larvy nevyvíjejí. V tomto období jsou přítomny asymptomaticky v těle hostitele, kde čekají na lepší podmínky. Na jaře pak vlasovky dostávají signál pro další vývoj díky změnám v tělech březích hostitelských samic. V tomto okamžiku již nic nebrání jejich vývoji a jejich počty neustále stoupají jak přímo v hostiteli, tak také na pastvinách, kam jsou vajíčka vylučována, což umožňuje infekci mláďat, která jsou mnohem zranitelnější než dospělí jedinci (Machen et al., 1998).



Obr. 5. Životní cyklus *H. contortus* u ovce: Po naklazení oplodněných vajíček ve slezu hostitele dochází k jejich vyloučení do prostředí společně s výkaly. Vajíčka se následně líhnou v larvy L1 a poté se dále svlékají za vzniku L2 a L3 stádia. Poslední zmiňované stádium je následně pozřeno prostřednictvím potravy novým hostitelem a v jeho organismu nastává přeměna na L4 fázi a poté dospělé, který je schopen dalšího rozmnožování (převzato z Machen et al., 1998, cit. 2020-11-01).

2.2.3. Symptomy a diagnostika

Mezi nejčastější symptomy infekce *H. contortus* patří akutní anémie, edémy, slabost, průjmy až smrt, která je nejčastější u mláďat nebo u březích samic a samic po porodu (Machen et al., 1998). Tyto příznaky jsou způsobeny zejména ztrátou krve, jelikož jediný dospělec *H. contortus* za den spotřebuje mezi 30 a 50 mikrolitry krve. Kromě toho dochází také k působení hemolytických proteinů uvolňovaných parazitem (Roberts et al., 2009). Anémii můžeme pozorovat během 10 až 12 dní od prvotní nákazy (Besier et al., 2016b).

Závažnost onemocnění úzce souvisí s počtem dospělců *H. contortus* v hostitelském organismu, protože existuje silná korelace mezi ztrátou krve a počtem dospělých červů. Výsledné množství

dospělců *H. contortus* závisí na rychlosti příjmu infekčních larev a schopnosti hostitele se s nimi vypořádat. Projevy onemocnění pak závisí na schopnosti hostitelského organismu nahradit ztracenou krev (Besier et al., 2016b). Jedinci, kteří infekci přežijí, obvykle získávají imunitu (Roberts et al., 2009).

V závislosti na intenzitě infekce a reakci hostitele byla hemonchóza kategorizována na tři základní formy – hyperakutní, akutní a chronickou (Besier et al., 2016b).

1. Relativně vzácná **hyperakutní** forma, způsobená masivní ztrátou krve z infekce až 30 000 jedinci *H. contortus*, způsobuje hemoragickou gastritidu spojenou s terminální anémií. K úmrtí dochází náhle bez předzvěstných příznaků nemoci (Besier et al., 2016). Diagnóza je při pitvě zřejmá z důvodu velmi velkého počtu červů různých vývojových stádií, rozsáhlého krvácení na povrchu sliznice, bledosti spojivky a dalších mukózních membrán a edémů způsobených hypoproteinémií (Besier et al., 2016; Arsenopoulos et al., 2021).
2. U **akutní** hemonchózy se vyvíjí významná anémie po relativně delší dobu, ale k úmrtí může dojít během 4 až 6 týdnů od infekce, v závislosti na rychlosti příjmu larev. Při pitvě je tělo bledé s výrazným ascitem a submandibulárním edémem odrážející hypoproteinémií způsobenou infekcí *H. contortus*. Sliznice je často edematózní se známkami krvácení. Histopatologické změny spojené s akutní hemonchózou zahrnují traumatické poškození povrchu sliznice a známky buněčné imunologické reakce (Besier et al., 2016b).
3. Infekce s menší ale dlouho přetrvávající zátěží *H. contortus* jsou označovány jako **chronická** hemonchóza. Tyto infekce mohou často probíhat bez povšimnutí a jsou rozpoznány až v momentě, kdy se zvýší příjem larev nebo kdy hostitel už není schopen tolerovat jejich patogenní účinky (Besier et al., 2016b). Typickými příznaky jsou snížená produkce mléka, masa a vlny a zpomalení růstu jako důsledek malnutrice (Arsenopoulos et al., 2021). Chronická hemonchóza je nejběžnější v prostředích, která jsou pro vývoj volně žijících stádií méně vhodná a během nepříznivých období v obvyklých endemických zónách. Obvykle je doprovázena infekcemi dalšími hlísty. Chronická forma hemonchózy se může také objevit v endemických zónách, kde částečně fungují kontrolní opatření (Besier et al., 2016b).

Pro **diagnostiku** infekce *H. contortus* lze využít poměrně jednoduchý a rychlý test **FAMACHA**, který hodnotí barvu spojivky podle standardizované sady pěti barevných odstínů od normální červeno-růžové až po bílou, která značí terminální anémii. Tento systém umožňuje identifikovat postižená zvířata, která následně mohou být ošetřena individuálně, tj. bez potřeby ošetřovat celé stádo, a zvyšovat tak selekční tlak pro vznik anthelmintické rezistence. Prohlídky zvířat jsou

nejlépe doporučeny v 7-10 denních intervalech, což může představovat nevýhodu ve velkých stádech (Besier et al., 2016a).

Kromě systému FAMACHA se v praxi využívají také **laboratorní postupy**, jejichž výhodou je zjištění subklinické infekce. Vodítkem při podezření na infekci *H. contortus* může být pomocné hematologické vyšetření (typické je snížení hematokritu nebo koncentrace hemoglobinu). Pro potvrzení infekce je nutné provést parazitologické vyšetření vzorků – vajíček z výkalů, larválních stádií z prostředí nebo dospělců nejčastěji získaných *post mortem*. Namísto těchto vyšetření je možné využít také moderní laboratorní metody založené na molekulárních technologiích, zejména pak PCR, které nabývají stále většího významu (Arsenopoulos et al., 2021). Pro zjištění míry kontaminace pastvin vajíčky *H. contortus* se využívá FWEC (faecal worm egg count), který hodnotí počet vajíček helmintů ve výkalech (Besier et al., 2016a).

2.2.4. Prevence infekcí způsobených *H. contortus*

V současné době je na prevenci hemonchóz kladen velký důraz. Ačkoli léčba hemonchóz anthelmintiky představuje jednoduchý, levný a nákladově efektivní způsob kontroly, široká aplikace anthelmintik není v dlouhodobém horizontu udržitelná. Vzhledem k narůstající rezistenci a chybějícím novým léčivům tak narůstá potřeba vývoje alternativních a pomocných metod kontroly helmintóz (Stear et al., 2007).

Management podmínek pastvy

Jak již bylo popsáno výše, vajíčka jsou vylučována z infikovaného jedince pomocí trusu a následně ve vnějším prostředí probíhá přeměna až do L3 stádia, kdy larvy čekají na spasení a poté se ve svém hostiteli přeměňují na dospělého jedince. Rozptýlení larev z trusu je do značné míry závislé na dostatečném množství vody, které umožňuje migraci larev. Kromě horizontálního pohybu po pastvině se larvy mohou pohybovat svisle po trávě a jiných rostlinách, aby zvýšily své šance na spasení. Před nepřízní počasí se mohou larvy chránit svislou migrací opačným směrem, tedy do půdy, která může působit jako útočiště. U volně žijících stádií záleží rychlost vývoje a šance na přežití na počasí, zejména na teplotě a vlhkosti (Stear et al., 2007).

Vzhledem k tomu, že pastviny jsou hlavním místem infekce helminty, existují strategie pro minimalizaci tohoto přenosu:

1. **Snížením počtu zvířat na jednotku plochy** se snižuje také množství trusu na této ploše, což vede ke snížení rizika infekce. Bohužel vzhledem k tomu, že někteří jedinci mohou v trusu vylučovat obrovská množství vajíček, nemusí tento způsob vždy fungovat. Navíc chov ovcí není tak ziskový, aby chovatelé tuto možnost často volili.
2. Další možnou strategií je **střídání různých druhů zvířat na pastvě**. Výhodné je střídání druhů zvířat, které si nejsou blízké, jako například ovce a koně. Jeden druh helminta pak obvykle nenapadá oba tyto druhy. Nevhodné je však třeba střídání ovcí a koz, které jsou druhy blízkými a helminté, včetně *H. contortus*, mohou infikovat jak ovce, tak kozy. Nevýhodou tohoto přístupu je možnost smíšené infekce parazity, kteří nejsou specifictí pouze pro daný druh.
3. Další možností je **ošetření stáda anthelmintikem a jeho následné vypuštění na čistou pastvinu**. Nevýhodou je možný vznik rezistence a šíření těchto rezistentních helmintů na dané pastvině.
4. Další strategií je **rozdělení pastviny na několik sektorů s rotací různých druhů**, kdy se předpokládá, že než se do daného sektoru vrátí původní hostitel, infekční larvy zahynou. Bohužel vzhledem ke schopnosti larev přežít i extrémní podmínky nemusí být toto řešení účinné (Stear et al., 2007).

Biologická prevence

Všechny organismy jsou ovlivňovány různými faktory, mezi které můžeme zařadit třeba vnější podmínky, potravu, ale také faktory jako jsou paraziti, predátoři a konkurenti. Nematoda jsou rozsáhlou skupinou organismů s velkým množstvím predátorů, kteří se tímto stávají kandidáty pro jejich biologickou kontrolu. Několik studií prokázalo schopnost snížení množství infekčních larev na pastvinách pomocí houby *Duddingtonia flagrans*. Její velkou výhodou je, že zřejmě nemá žádné škodlivé účinky na neparazitární hlístice žijící v půdě a v praxi tak nenarušuje žádoucí pochody v prostředí. Použití dravých hub tak představuje slibnou možnost kontroly hlístic. Pro optimální účinky je však třeba každodenní přísun hub v potravě (Stear et al., 2007).

Další metody prevence

Další metody prevence se týkají kontroly parazitických stádií přímo v hostiteli a nejčastěji probíhají prostřednictvím podpory imunitního systému. Vnitřní prostředí hostitele, které hraje velmi důležitou roli v rychlosti vývoje hlístice, je ovlivňováno imunitní reakcí hostitele. U hostitelů, kteří jsou vůči helmintům rezistentní, se snižuje produkce vajíček, jejich životaschopnost a navíc dochází ke zpomalení vývoje pozřených larev (Stear et al., 2007).

1. Výživa hostitele

U několika druhů nematod včetně *H. contortus* bylo prokázáno, že podávání doplňků stravy obsahujících velké množství proteinů před infekcí i v jejím průběhu, může omezit klinické příznaky, nebo jim dokonce předcházet. Další studie rovněž prokázaly zvýšení rezistence hostitele vůči některým druhům nematod podáváním doplňků stravy s ureou, což by mohlo představovat levný zdroj neproteinového dusíku namísto těch dražších proteinových. Kromě toho se ukázalo, že pro podporu rezistence hostitelů vůči hlísticím lze využít doplňky stravy s obsahem některých stopových prvků, jako jsou železo, měď, zinek nebo molybden. Doplňky stravy představují úspěšnou metodu pro prevenci helmintóz. Překážkou jejich většího rozšíření jsou převážně finanční důvody (Stear et al., 2007).

2. Vakcinace

Ovce jsou díky opakovanému vystavení *H. contortus* schopné vyvinout si vůči němu ochrannou imunitu. Z tohoto důvodu je vakcinace velmi studovanou strategií (Stear et al., 2007). Nejúčinnější současné vakcíny se spoléhají na ochranu indukci vysokých hladin cirkulujících protilátek na skryté střevní antigeny *H. contortus*. Úspěch této strategie vyústil v Austrálii v zavedení vakcíny, která je založena právě na výtažcích ze střeva parazita. Extrakce proteinů z gastrointestinálního traktu parazita je bohužel nepraktická, a tak cílem v současnosti vyvíjených vakcín je vytvořit vakcínu rekombinantní, která by byla bezpečná, stabilní a levná. Vývoj rekombinantních vakcín založených na složkách úspěšné nativní vakcíny dosud nebyl dosažen a většina nedávných úspěchů rekombinantních vakcín se zaměřila na antigeny nesouvisející se střevními antigeny (Nisbet et al., 2016).

3. Genetické přístupy

V rámci srovnání různých plemen ovcí z pohledu rezistence vůči *H. contortus* se jasně ukázalo, že některá plemena jsou k této hlístici mnohem rezistentnější než jiná, z čehož plynou následující možnosti ovlivnění hemonchózy na úrovni genetických přístupů:

a. **Výběr vhodného plemene**

Nejjednodušší způsob představuje využití rozdílů mezi plemeny. V praxi to znamená využití plemen odolnějších namísto těch, která jsou k infekci *H. contortus* vnímavá. Vzhledem k tomu, že rezistentní plemena bývají v endemických oblastech výskytu *H. contortus* drobnější než zvířata vnímavá, panovaly obavy ohledně jejich produktivity. Ukázalo se však, že i přes menší velikost mohou být odolnější zvířata produktivnější než jejich větší vnímaví příbuzní (Stear et al., 2007).

b. **Cross-breeding**

Předpokládá se, že v rámci křížení různých rezistentních plemen ovcí by mohla vzniknout plemena vůči *H. contortus* rezistentnější. Ačkoli výzkum tohoto jevu u ovcí není zatím dostatečný, vzhledem k pozitivním výsledkům u dobytka se předpokládají výsledky obdobné (Stear et al., 2007).

c. **Výběr jedinců v rámci plemene**

U některých vysokoprodukčních plemen je chovatelsky nepříznivé nahrazovat tato plemena za jiná. V rámci tohoto přístupu se předpokládá, že výběrem rezistentnějších jedinců v rámci chovu se jejich potomstvo stává rezistentnějším než potomstvo vzniklé náhodným pářením (Stear et al., 2007).

2.2.5. Léčba infekcí *H. contortus*

Léčba hemonchózy je založena především na využívání velmi rozsáhlé skupiny chemicky různorodých léčiv s anthelmintickými účinky, ale své místo si vytvářejí také nové alternativní metody biologického charakteru (Lamka & Ducháček, 2014; Stear et al., 2007). V současnosti je kladen důraz na co nejmenší využívání anthelmintik a naopak zvýšené využití preventivních opatření (Arsenopoulos et al., 2021).

2.3. Anthelmintika

Látky s anthelmintickým účinkem se podle své účinnosti proti jednotlivým třídám červů dělí na antinematoda, antitrematoda a anticestoda. Mnohá anthelmintika mohou mít současně účinky proti více třídám červů nebo i proti původcům zevních parazitóz (tzv. endektocida) (Lamka & Ducháček, 2014). Obecně by ideální anthelmintikum mělo splňovat několik základních charakteristik, a to široký terapeutický index (tj. poměr mezi efektivní a toxickou dávkou), široké spektrum účinku, aktivitu proti dospělým i nedospělým jedincům (nesmí vést k vytvoření imunity u larev), minimální vliv na fyziologické funkce hostitele (např. konverze živin, snížení růstu), snadné přijetí zvířaty, jednoduchost aplikace, ekonomickou nenáročnost, krátkou ochrannou lhůtu a minimální riziko výskytu reziduí v potravinách živočišného původu (Dobšíková et al., 2012).

2.3.1. Mechanismus účinku anthelmintik

Mechanismus účinku antiparazitárních léčiv je založen na výskytu charakteristických rozdílů v základních metabolických pochodech hostitele a parazita, kdy dochází k selektivnímu zásahu (většinou k inhibici) procesů v těle parazita. Mezi ovlivněné struktury patří třeba specifické enzymy přítomné pouze u parazita (např. enzym fumarát reduktáza důležitý pro energetický metabolismus parazita), dále enzymy, které se vyskytují jak u parazita, tak u hostitele, které jsou ovšem nepostradatelné pouze pro parazita, nebo různé biochemické procesy, které u parazita probíhají (viz tab. 1) (Dobšíková et al., 2012).

Tab. 1. Mechanismus účinku nejdůležitějších anthelmintik

Cíl účinku	Skupina	Zástupci
Iontové kanály	Tetrahydropyrimidiny	Pyrantel, morantel
	Imidazothiazoly	Levamisol
	Makrocyclické laktony	Ivermektin, moxidektin
	-----	Piperazin
Mikrotubuly	Benzimidazoly	Tiabendazol, albendazol, mebendazol, flubendazol
Bioenergetické	Salicylanilidy	Klosantel
pochody	Chlorované sulfonamidy	Klorsulon
Neznámé	-----	Prazikvantel
	-----	Triklabendazol

(převzato z Köhler, 2001, str. 337, tab. 1)

Existuje několik základních skupin anthelmintik užívaných pro léčbu infekce *H. contortus*. Komerčně užívané přípravky mohou být monokomponentní, nebo obsahují kombinace různých léčiv. Důvodem pro použití polykomponentních přípravků je zajištění účinnosti proti helmintům rezistentních na jednotlivá anthelmintika a snížení míry selekce při jejím vzniku. Bohužel rutinní používání těchto přípravků vedlo ke vzniku multirezistentních kmenů (Besier et al., 2016a). Cílem chovatelů po celém světě je zpomalení dalšího vývoje anthelmintické rezistence, proto je důležité podávat anthelmintika cíleně, a to zvířatům, která vykazují symptomy infekce. Díky tomu se nejen zpomalí vznik anthelmintické rezistence, ale sníží se i rezidua anthelmintik v mase a mléku a snižuje se cena léčby. Další možností je ošetření celého stáda v co možná nejdelších časových intervalech (Arsenopoulos et al., 2021).

2.3.2. Anthelmintické látky používané pro léčbu hemonchózy

Anthelmintika působící proti *H. contortus* jsou zde rozdělena zejména dle Besier et al., 2016a:

1. Benzimidazoly

Tato skupina je v současnosti nejrozsáhlejší skupinou antinematod (Lamka & Ducháček, 2014). Její historie sahá až do roku 1961, kdy bylo na trh přivedeno první širokospektré anthelmintikum – tiabendazol, který představoval první benzimidazol vůbec (Köhler, 2001). Ostatní látky této skupiny pak vznikly obměnou jeho chemické struktury (viz obr. 6). Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku (Lamka & Ducháček, 2014).

Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových podjednotek, které jsou nezbytné pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů a jejichž narušená tvorba se projeví žádoucím poškozením funkčnosti celé parazitární buňky (viz obr. 7) (Lamka & Ducháček, 2014). Mikrotubuly jsou vysoce dynamické, všudypřítomné buněčné struktury sloužící řadě životně důležitých funkcí včetně mitózy nebo pohyblivosti u všech eukaryot. Tyto nezbytné struktury existují ve stavu dynamické rovnováhy, kde interakce lék-tubulin vede k posunu tohoto ustáleného stavu za následné ztráty mikrotubulů a akumulace volného tubulinu. S ohledem na klíčovou roli mikrotubulů v mnoha buněčných procesech vede nakonec tato jejich destrukce ke smrti organismu (Köhler, 2001). Jedním z důvodů je zřejmě nedostatek energie pro parazita z důvodu inhibice tvorby ATP, což je nejspíš způsobeno ztrátou transmembránového protonového gradientu (Dobšíková et al., 2012; McCracken & Stillwell, 1991).

Princip vysoké selektivní toxicity benzimidazolových antihelmintik není zcela jasný, ale zdá se, že je způsoben mnohem vyšší afinitou k β -tubulinu helmintů ve srovnání se strukturami jejich

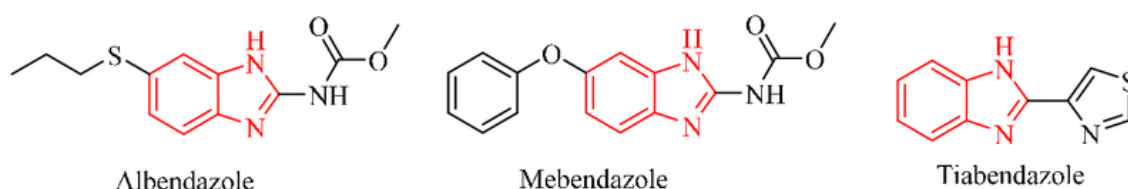
hostitelů (Köhler, 2001). To umožňuje dávkovat benzimidazoly bez závažnějších vedlejších účinků. Důležitou skupinu z benzimidazolů dělá i to, že kromě dospělých stádií působí i proti stádiím vývojovým, někdy dokonce i proti vajíčkům. Výsledná anthelmintická aktivita je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. U polygastrických zvířat jako jsou ovce, skot, aj. lze benzimidazoly podávat i jednorázově. Nevýhodou je teratogenní působení většiny látek, pro které se nemohou podávat březím samicím (Lamka & Ducháček, 2014). Část benzimidazolů je také kontraindikována pro podání laktujícím přežvýkavcům s produkcí určenou pro výživu člověka (Dobšíková et al., 2012). Kvůli dlouhodobému a častému používání je rezistence na benzimidazoly rozšířená prakticky po celém světě už mnoho let. V některých oblastech tyto látky samostatně vůbec nefungují, a proto se musí kombinovat látkami s jiným mechanismem účinku (Besier et al., 2016a).

a. Albendazol

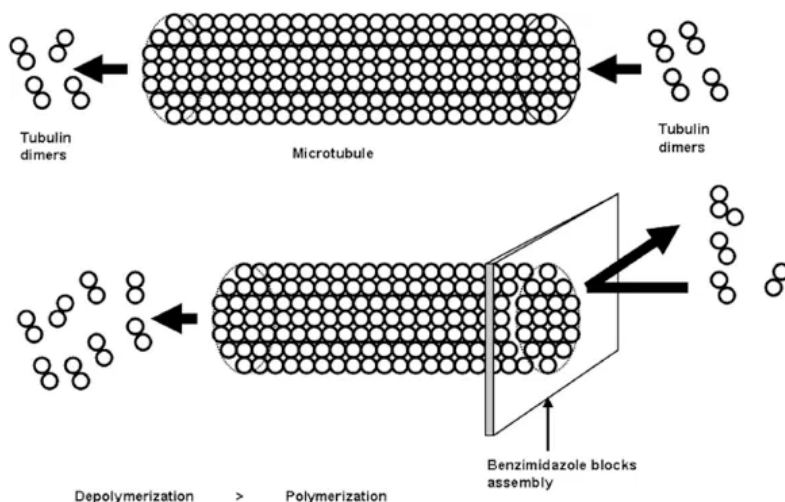
Pro léčbu hemonchózy ovcí a koz využíváme v současné době výhradně albendazol, jež má antinematodní, anticestodní i antitrematodní účinky. Jednotlivá terapeutická dávka je 5,0–10,0 mg/kg živé hmotnosti (Lamka & Ducháček, 2014).

b. Fenbendazol, febantel, flubendazol, mebendazol, oxibendazol, tiabendazol

Tyto látky nejsou u hemonchóz ovcí a koz indikovány (dle tab. 1, str. 65 Lamka & Ducháček, 2014).



Obr. 6. Molekuly některých benzimidazolů (převzato z Can et al., 2017).



Obr. 7. Mechanismus účinku benzimidazolů: Za normálních okolností je depolymerizace a polymerizace mikrotubulů ve stavu dynamické rovnováhy. Benzimidazoly tuto rovnováhu narušují a zamežují polymerizaci mikrotubulů, což vede k jejich destrukci, která má za následek narušení životních funkcí helmintů (převzato z *Veterian Key*, 2017, cit. 2021-01-03).

2. Makrocyclické laktony

Jedná se o léčiva biosyntetického původu s antinematodní a antiiektoparazitární účinností, která se dělí na dvě základní skupiny, a to avermektiny (viz obr. 9) a milbemyciny (Lamka & Ducháček, 2014). Mechanismus účinku je založen na ovlivnění specifických glutamátových receptorů parazita spojených s chloridovými kanály (GluCl kanály) (viz obr. 8), jelikož se tento parazitární typ glutamátového receptoru u savců nevyskytuje. Dalším z možných mechanismů účinku je také podpora uvolňování GABA do synapse. Oba tyto mechanismy vedou v konečném důsledku ke zvýšenému influxu chloridových iontů do neuronu, k jeho následné hyperpolarizaci a sníženému převodu nervových impulsů (tj. k inhibici neurotransmise) a následným navozením totální svalové paralýzy larválního i dospělého stádia parazita, která pak způsobí úhyn a vypuzení parazita z hostitelského organismu (Dobšíková et al., 2012). Paralýza nepostihuje pouze somatické svalstvo, ale týká se i faryngeální svaloviny, což znemožní příjem potravy, nebo svalů dělohy, což zamezí správné funkci rozmnožovací soustavy (Dobšíková et al., 2012, Prichard, 2001). Výsledky experimentů naznačují, že podjednotky typu GluCl α nesou vazebné místo pro ivermektin, zatímco glutamátové vazebné místo je lokalizováno na podjednotce β (Köhler, 2001).

Problémem makrocyclických laktonů je velká zátěž životního prostředí vzhledem k tomu, že se z 98% vylučují stolicí v nezměněné formě. To může způsobovat sekundární otravy zvířat po

pozření kontaminovaného trusu. Většina savců má však naštěstí hematoencefalickou bariéru (HEB) pro tyto látky nepropustnou. Výjimkou jsou některá plemena psů (např. kolie, jezevčík, bígl, australský ovčák), která mohou být nosiči mutovaného MDR1 (multidrug resistance transporter) genu a u kterých k přechodu makrocyclických laktónů přes HEB dochází velmi snadno. Typickými příznaky otravy jsou neurologické obtíže (třes, záchvaty, deprese), zvracení, slinění, slepota, koma až smrt (Dobšíková et al., 2012).

a. Ivermektin

Jedná se o historicky první léčivo avermektinové skupiny. I v současnosti stále patří mezi nejvýznamnější makrocyclické laktony a zároveň i léčiva veterinární medicíny. Výhodou je, že působí proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic i členovců. Jednotlivá terapeutická dávka je 0,2-0,3 mg/kg živé hmotnosti. Častá je kombinace s klorsulonem nebo pyrantelem (Lamka & Ducháček, 2014). Nesmí se však podávat samicím v pokročilé březosti (Dobšíková et al., 2012).

b. Doramektin

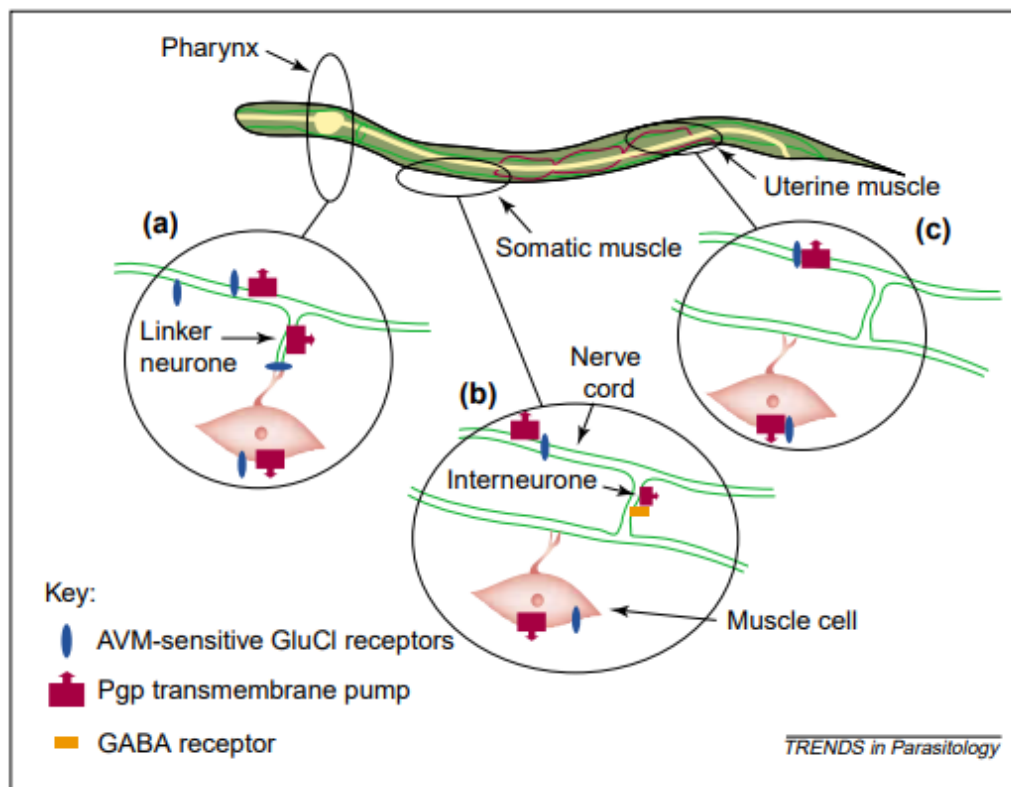
Je také účinný proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic a členovců. Jednotlivá terapeutická dávka je 0,2-0,3 mg/kg živé hmotnosti (Lamka & Ducháček, 2014).

c. Eprinomektin

Je určen hlavně pro skot, kde působí proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic a členovců. Jednotlivá terapeutická dávka je 0,5 mg/kg živé hmotnosti (Lamka & Ducháček, 2014).

d. Abamektin, selamektin, moxidektin, milbemycin

Tito zástupci se u hemonchózy ovcí zpravidla nevyžívají (Dobšíková et al., 2012).

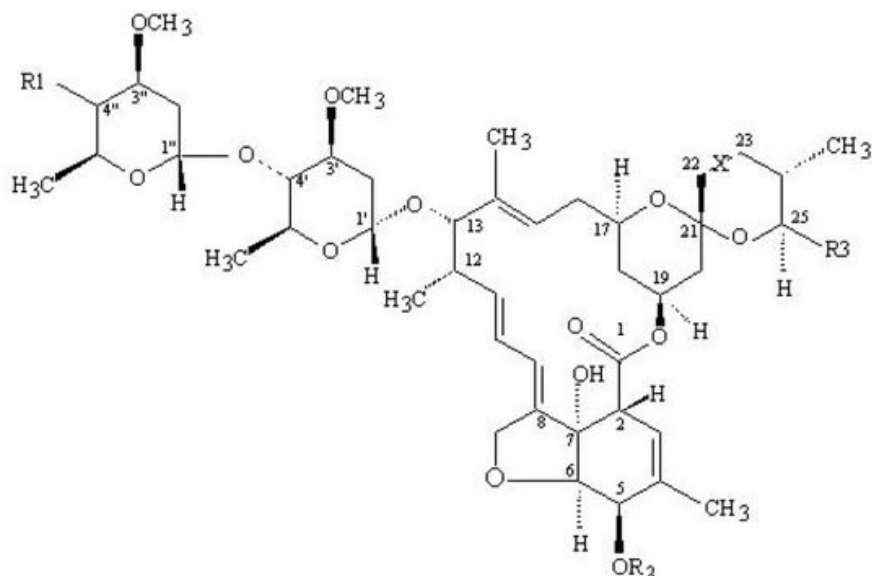


Obr. 8. Předpokládaný mechanismus účinku makrocyclických laktonů

Mezi tyto mechanismy patří možná paralýza farynxu, somatických a děložních nervů.

- a) Ve farynxu jsou faryngeální svalové buňky spojeny s nervovým provazcem pomocí spojovacího neuronu. AVM-senzitivní GluCl receptory, které jsou makrocyclickými laktony ovlivňovány, jsou na tomto neuronu přítomny. P-glykoprotein reguluje koncentraci AVM v membráně buňky.
- b) V somatickém svalu jsou signály z nervového provazce přenášeny pomocí interneuronů. Na interneuronech i svalových buňkách se pravděpodobně nacházejí AVM-senzitivní GluCl receptory, P-gp a AVM-senzitivní GABA receptory.
- c) Na děložních svalových buňkách, popř. na neuronech, které je inervují, se rovněž nacházejí AVM-senzitivní receptory a pravděpodobně také P-gp.

(převzato z Prichard, 2001, str. 452)



Avermectin	R1	R2	R3	C ₂₂ -X-C ₂₈
A _{1a}	OH	CH ₃	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH=CH-
A _{1b}	OH	CH ₃	CHCH ₃ CH ₃	-CH=CH-
Avermectin B _{1a}	OH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH=CH-
Avermectin B _{1b}	OH	H	CHCH ₃ CH ₃	-CH=CH-
A _{2a}	OH	CH ₃	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH ₂ -CHOH-
A _{2b}	OH	CH ₃	CHCH ₃ CH ₃	-CH ₂ -CHOH-
B _{2a}	OH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH ₂ -CHOH-
B _{2b}	OH	H	CHCH ₃ CH ₃	-CH ₂ -CHOH-
DOR	OH	H	C ₆ H ₁₁	-CH=CH-
EMA Benzoate B _{1a}	C ₆ H ₅ COOHCH ₃ NH	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH=CH-
EPR B _{1a}	NHCOCH ₃	H	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH=CH-

Obr. 9. Složitá struktura makrocyclických laktonů (převzato z Danaher et al., 2012).

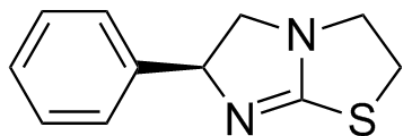
3. Imidazothiazoly

Jedná se o dlouhodobě užívanou skupinu anthelmintik s výhradně antinematodní aktivitou (Lamka & Ducháček, 2014). Mechanismus účinku spočívá v cílené stimulaci acetylcholinových receptorů parazita s následnou svalovou paralýzou. Vyšší dávky pak také vyvolávají interferenci s metabolismem sacharidů u parazita (Dobšíková et al., 2012).

a. Levamisol

Jedná se o levotočivou formu původně terapeuticky užívaného racemátu tetramisolu (viz obr. 10). Levamisol je účinný proti vývojovým i dospělým stádiím nematod, ovocidní účinky však nemá. Jednotlivá terapeutická dávka je 5,0-25,0 mg/kg živé hmotnosti. Pro zlepšení účinku ho můžeme kombinovat s niklosamidem (Lamka

& Ducháček, 2014). Rezistence je v hlavních endemických oblastech už bohužel poměrně vysoká, v méně exponovaných oblastech má stále dobré účinky (Besier et al., 2016a). Problematikou jeho využití v praxi je vysoká toxicita, a to zejména při i.v. podání, kdy může způsobit konvulzi, depresi CNS nebo asfyxii. Nepodává se ani v pokročilé březosti (Dobšíková et al., 2012).



Obr. 10. Molekula levamisolu (převzato z *ChemSrc*, 2021, cit. 2021-03-11).

4. Tetrahydropyrimidiny

Skupina tetrahydropyrimidinů má antinematodní účinky, jejichž účinnost proti *H. contortus* u koz byla prokázána studií (Chartier et al., 1995). Účinkují jako agonisté nikotinových receptorů na nervosvalových ploténkách (depolarizace nervosvalové ploténky), čímž vedou ke spastické paralýze helminta a jeho vypuzení z organismu. Existuje zkřížená rezistence mezi touto skupinou a levamisolem (Dobšíková et al., 2012).

a. Pyrantel

Působí proti helmintům GIT včetně *H. contortus*. Je kontraindikován v březosti, u kachektických zvířat a při onemocnění ledvin.

b. Morantel, oxantel

Tito zástupci se u hemomchózy ovcí a koz neužívají (Dobšíková et al., 2012).

5. Organofosfáty

Tato anthelmintická skupina se již používá pouze v některých zemích. Mechanismus účinku spočívá v inhibici acetylcholinesterázové aktivity. Z tohoto důvodu jsou potenciálně toxické pro savce, což vede k nutnosti opatrnosti při jejich skladování a podávání zvířatům. Bylo popsáno jen málo případů rezistence, avšak nepůsobí tak dobře proti dalším důležitým nematodům a hlavně jejich larvám. Ačkoli není tato skupina všude dostupná, má dobré využití jako úzkospektré anthelmintikum hlavně kvůli rezistenci na ostatní skupiny (Besier et al., 2016a).

a. Naftalofos

b. Trichlorfon

6. Salicylanilidy a substituované fenoly

Tato skupina zahrnuje několik sloučenin, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici energetického metabolismu. Působí jako úzkospektrá anthelmintika hlavně proti helmintům sajícím krev a jsou tak důležitou skupinou v boji proti *H. contortus*. Rezistence je vyšší v endemických oblastech (Besier et al., 2016a).

- a. **Klosantel**
- b. **Rafoxanid**
- c. **Disofenol**
- d. **Nitroxynil**

7. Deriváty aminoacetonitrilu

Jediným zástupcem této skupiny je **monepantel**. Účinkuje proti nikotinovým receptorům a má podobně široké spektrum jako makrocyclické laktony. Ačkoli je k dispozici poměrně krátkou dobu, už byly ohlášeny případy rezistence (Besier et al., 2016a).

8. Spiroindoly

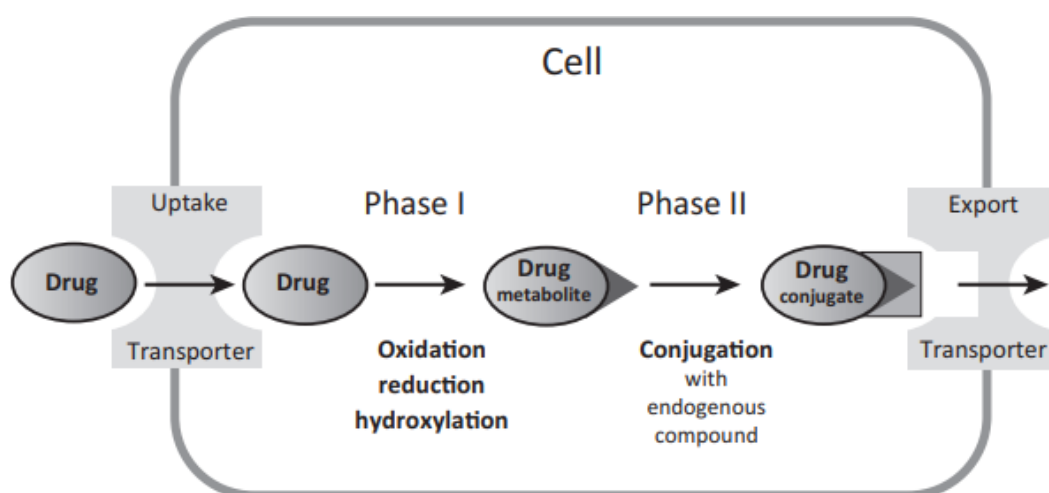
Prvním zástupcem této skupiny je **derquantel**, který působí podobně jako některé další látky jako antagonist nikotinových receptorů. Podává se pouze v kombinaci s abamektinem, protože sám o sobě nevykazuje dostatečné anthelmintické účinky (Besier et al., 2016a).

2.3.3. Přírodní látky s anthelmintickým účinkem

Další možností léčby je kromě anthelmintik využití specifických druhů rostlin, zejména těch, které obsahují třísloviny. Mezi tyto rostlinné druhy můžeme zařadit třeba *Cichorium intybus* a *Lotus corniculatus*. Mechanismus účinku pravděpodobně souvisí s podporou imunity hostitele, snížením životaschopnosti larev nebo přímou toxicitou na dospělá nematoda (Besier et al., 2016a). Ačkoli se neprokázalo, že by rostliny s vysokým obsahem tříslovin vedly k úplné eliminaci parazitů, účinkují pravděpodobně v dlouhodobějším horizontu, kdy snižují množství *H. contortus* v těle hostitele (Mravčáková et al., 2019).

2.4. Metabolismus anthelmintik u *H. contortus*

Anthelmintické molekuly jsou pro *H. contortus* i jeho hostitele látky tělu cizí, tj. nejsou využitelné jako zdroj energie nebo pro syntézu biomolekul, a mohou být pro organismus toxické. Takové látky označujeme termínem **xenobiotika**. Všechny organismy si postupně vyvinuly řadu detoxifikačních systémů, pomocí kterých se mohou působení těchto látek bránit. Tyto systémy jsou reprezentovány pomocí enzymů metabolizujících xenobiotika (XME), které jsou zodpovědné za řadu biochemických reakcí, které můžeme rozdělit na reakce I. a II. fáze metabolismu (viz obr. 11) (Matoušková et al., 2016). Jejich důležitost byla potvrzena studii, při kterých byly použity inhibitory těchto enzymů s následným zvýšením aktivity anthelmintik (Stasiuk et al., 2019). Během **I. fáze metabolismu** dochází především k oxidačním, redukčním a hydrolytickým reakcím, kdy probíhá zabudování a nebo odkrytí určitých funkčních skupin (-OH, NH₂, -SH, -COOH) (Parkinson et al., 2015). Tato fáze je katalyzována zejména cytochromy P450 (CYP) a reduktáz/dehydrogenáz s krátkým řetězcem (SDR) (Laing et al., 2013). Ve **II. fázi metabolismu** je xenobiotikum a nebo produkt vzniklý v předchozí fázi konjugován s endogenními sloučeninami, což je zprostředkováváno hlavně glutathion S-transferázami (GST) a UDP-glukuronyl transferázami (UGT) (Parkinson et al., 2015; Laing et al., 2013). Cílem prvních dvou fází metabolismu je vznik méně lipofilního produktu, který je snáze vyloučen z organismu (Parkinson et al., 2015). Protože tyto produkty již nepřecházejí tak snadno přes membrány pomocí pasivní difúze, je pro jejich přenos nutná přítomnost transportních proteinů. Tento přenos bývá někdy označován jako **III. fáze metabolismu**, která je umožněna především díky ABC transportním proteinům (ABC) (Skálová & Boušová, 2011; Laing et al., 2013).



Obr. 11. Schéma metabolismu xenobiotik: Po vstupu molekuly léčiva do buňky dochází k fázím 1 a 2 metabolismu a následnému vyloučení hydrofilního metabolitu pomocí exportního transportéru (převzato z Matoušková et al., 2016).

Metabolismus anthelmintik se u helmintů a jejich hostitelů velmi liší. Kromě toho existují také rozdíly v metabolismu u různých helmintů. Obecně platí, že hlístice mají jen omezenou schopnost metabolizovat xenobiotika a bylo identifikováno jen málo metabolitů anthelmintik. Kromě toho některé konkrétní druhy helmintů nedokážou dle dosavadních zjištění některá anthelmintika metabolizovat vůbec, např. praziquantel u *Dicrocoelium dendriticum* a *Hymenolepis diminuta* nebo ivermektin u *H. contortus*. Na druhé straně byly popsány biotransformace anthelmintik probíhající u helmintů, které nebyly přítomny u jejich savčích hostitelů (např. methylace flubendazolu a mebendazolu, glukosidace albedazolu a flubendazolu, hydrolýza amidů monepantelu) (Matoušková et al., 2016).

Mezi nejdůležitější **enzymy I. fáze biotransformace** u zvířat i rostlin patří **CYP**. Tyto enzymy metabolizují celou řadu endogenních i exogenních látek, nejčastěji díky **mono-oxygenaci** (zahrnuje hydroxylaci, dealkylaci, epoxidaci, dekarboxylaci, isomerizaci), ale také pomocí peroxidace nebo redukce (Matoušková et al., 2016). Dlouhou dobu se mělo za to, že u helmintů se CYP nevyskytují, nicméně opak je pravdou. U *Caenorhabditis elegans*, nepatogenního helminta, který je často užíván jako modelový organismus, bylo identifikováno celkem 86 CYP a u *H. contortus* to bylo 42 CYP. Oproti tomu u zástupců podkmene *Platyhelminthes* byly většinou nalezeny jen 1 nebo 2 CYP. U *C. elegans* a *H. contortus* jsou některé CYP, ale i další enzymy stejné, což způsobuje vznik stejných nebo velmi podobných metabolitů většiny benzimidazolů u obou druhů parazitů (Stasiuk et al., 2019). Tyto enzymy se však od těch lidských liší, protože ačkoli je třeba ivermektin u lidí metabolizován CYP3A4, ani u *C. elegans*, ani u *H. contortus* nebyl žádný metabolit ivermektinu nalezen. Většina CYP se u *H. contortus* nachází v jeho trávicím ústrojí, které tak představuje hlavní detoxifikační orgán. Bylo zjištěno, že se exprese CYP liší v závislosti na pohlaví, kdy drtivá většina převládala u samečků, ale dochází také ke změnám v expresi jednotlivých izoenzymů v průběhu životního cyklu s největší expresí u jednoho nebo více larválních stádií, zatímco u dospělců a vajíček je exprese většiny izoenzymů potlačena (Laing et al., 2015).

Metabolismus pomocí **redukce** je méně častý než oxidace, ale u ketonů, aldehydů, chinonů, dusíkatých sloučenin, N-oxidů a S-oxidů může představovat hlavní metabolickou cestu. U helmintů se vyskytuje poměrně velký počet genů pro aldo-ketoreduktázy (AKR) a SDR, což podtrhuje význam reduktáz v metabolismu xenobiotik u helmintů (Matoušková et al., 2016). SDR se jak u *C. elegans*, tak u *H. contortus* vyskytuje na 70 druhů (Stasiuk et al., 2019).

Důležitou nadrodinou multifunkčních enzymů, které hrají nezbytnou roli během **II. fáze biotransformace**, představují **GST**. Jejich hlavní úlohou je konjugace molekul s tripeptidem glutathionem (Matoušková et al., 2016). Zatímco druhy GST se u *C. elegans* a *H. contortus* počítají v desítkách, u podkmene *Platyhelminthes* nebyly nalezeny vůbec (Stasiuk et al., 2019).

Další důležitou skupinou enzymů, které se účastní II. fáze biotransformace jsou **UGT**. Převládajícími reakcemi katalyzovanými UGT jsou glukuronidace a glukosylace. Ačkoli byly UGT u helmintů studovány málo, jejich důležitost byla potvrzena několika studiemi (Matoušková et al., 2016). Stejně jako u většiny enzymů je množství UGT u *H. contortus* menší než u *C. elegans*, i tak bylo identifikováno na 30 druhů (Stasiuk et al., 2019).

Membránové effluxní transportéry se dělí na pět rodin, z nichž nejdůležitější je rodina označovaná jako **ABC transportéry**, což jsou aktivní effluxní transportéry působící proti gradientu transportované látky (Skálová & Boušová et al., 2011). Působí efflux jak lipofilních látek, které se dostaly do buňky, tak i jejich hydrofilních metabolitů, a to ve všech buňkách všech organismů. Nejznámějším ABC je **P-glykoprotein (P-gp)**, jehož přítomnost byla dokázána u mnoha helmintů (Cvilink et al., 2009). ABC se vyskytují i u nematod včetně *H. contortus*, kde bylo popsáno téměř 50 různých druhů (Stasiuk et al., 2019).

2.5. Rezistence

Rezistence na anthelmintika je definována jako ztráta senzitivity vůči těmto látkám, a to v populacích helmintů, u kterých v minulosti docházelo ke kladné terapeutické odpovědi. Tato změna v odpovědi na léčbu, bohužel, nyní představuje zásadní problém pro efektivní kontrolu helmintózy. Při získávání rezistence dochází k tomu, že citliví červi jsou selektivně odstraňováni z geneticky heterogenní populace, což v konečném důsledku vede k nárůstu jedinců, kteří jsou rezistentní na dané léčivo. Vznik rezistence na anthelmintika byl kromě jiných faktorů způsoben zejména jejich nadbytečným užíváním a nevhodným dávkováním (Köhler, 2001).

Velkým problémem začíná být tzv. multirezistence, kterou můžeme charakterizovat jako rezistenci na tři a více skupin anthelmintik. Tyto multirezistentní kmeny mohou v budoucnosti pro terapii hemonchózy představovat velký problém. K multirezistenci může docházet díky vzniku rezistence na jednotlivé typy anthelmintik odděleně, ale jsou popsány i případy možných interakcí, kdy například po opakovaném podávání ivermektinu došlo ke snížení účinků benzimidazolů (Arsenopoulos et al., 2021).

Základní dělení mechanismů rezistence je na farmakodynamické a farmakokinetické. **Farmakodynamické mechanismy** jsou založeny na změně struktury nebo počtu makromolekul (např. receptorů nebo proteinů), na které se dané léčivo váže nebo přes které působí. Vlivem těchto mechanismů však často dochází i k rezistenci na strukturálně příbuzná léčiva, protože většinou ovlivňují ty stejné pozměněné struktury. **Farmakokinetické mechanismy** jsou založené na snížení koncentrace toxické látky v buňkách. Mezi takové mechanismy řadíme zejména zvýšenou aktivitu enzymů metabolizujících léčiva (transportní proteiny a biotransformační enzymy). Tyto farmakokinetické mechanismy ve výsledku způsobují omezení vstupu, zrychlení deaktivace nebo zrychlení eliminace daného léčiva (Skálová, 2017).

Dále můžeme mechanismy rezistence rozdělit na specifické a nespecifické. **Specifické mechanismy** zahrnují všechny farmakodynamické a část farmakokinetických mechanismů. Jedná se o změny mířené přímo vůči dané látce, popř. látkám příbuzným. Oproti tomu **nespecifické mechanismy** zajišťují efflux jakýchkoli xenobiotik nezávisle na jejich struktuře a jsou zprostředkovány transmembránovými ABC transportéry, konkrétně P-gp a MRP (multidrug resistance-associated proteins) (Riou et al., 2003).

H. contortus má skvělou schopnost vytvořit si rezistenci na anthelmintika, což mu umožnilo vytvořit si rezistenci na většinu skupin léčiv během zhruba 10 let od uvedení na trh. Rezistence je z tohoto důvodu v současnosti přítomna na všechna důležitá anthelmintika, včetně dlouho užívaných benzimidazolů, imidazothiazolů nebo makrocyclických laktonů, ale také nedávno zavedených léčiv, jakým je například monepantel, což ohrožuje udržitelnost chovu ovcí a koz na celém světě (Kotze & Prichard, 2016).

2.5.1. Mechanismus rezistence u některých léčiv

H. contortus je široce studován výzkumníky, kteří se snaží pochopit mechanismy, které tento parazit využívá při vzniku anthelmintické rezistence. Tyto studie ukazují specifické molekulární mechanismy rezistence na všechny základní skupiny léčiv – benzimidazoly, imidazothiazoly, deriváty acetaminonitrilů a makrocyclické laktony (Kotze & Prichard, 2016). Je však třeba mít napaměti, že mechanismy rezistence jsou často zkoumány na laboratorních kmenech a tyto poznatky nemusí zcela korespondovat se situací reálných kmenů (Arsenopoulos et al., 2021).

Přehled různých faktorů, které mohou ovlivňovat účinek anthelmintika a které následně vedou k poškození parazita (druhý sloupec) nebo anthelmintické rezistenci (třetí sloupec), je uveden v tabulce 2.

Tab. 2. Schematické znázornění různých faktorů, které by mohly ovlivnit působení anthelmintika

	Předpoklad pro účinek	Možnost rezistence
Schopnost léčiva dostat se do buňky a působit v ní	Pasivní difúze Aktivní uptake	Efflux z buňky
Cíl a účinek	Správné zacílení na místo účinku	Ztráta místa účinku, snížení účinku, kompetice o receptor
Účinek na buňku	Poškození buňky a její smrt	Zrychlená schopnost opravy poškozené buňky
Metabolismus	Metabolismus neprobíhá Aktivace z prekursoru	Vznik neaktivního metabolitu

(převzato z Kotze & Prichard, 2016)

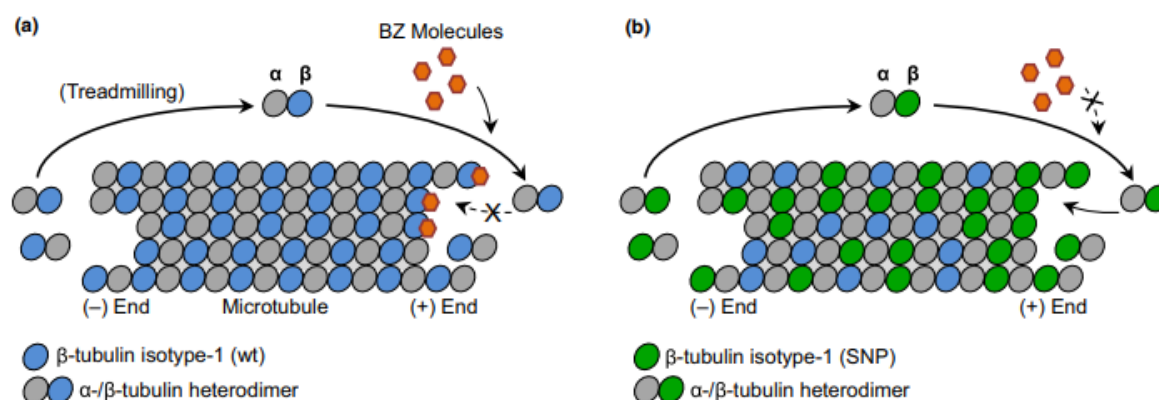
Benzimidazoly

Mechanismus rezistence byl u benzimidazolů intenzivně studován s poměrně velkým úspěchem. U rezistentních červů je typická ztráta vysoce afinitních vazebných míst pro benzimidazoly na podjednotce mikrotubulového proteinu (viz obr. 12). Další studie prokázaly, že benzimidazolová rezistence je rovněž spojena se selekcí specifických alel jednoho nebo obou izotypů β -tubulinu (Köhler, 2001). Na základě pozdějších studií bylo zjištěno, že na počátku rezistence stojí bodová mutace izotypu 1 β -tubulinu, kdy dochází k tzv. SNP (single nucleotide polymorphism) (viz tab. 3). Konkrétně se nejčastěji jedná o záměnu fenylalaninu za tyrosin na pozici 200 v genu β -tubulinu (F200Y). Mezi další, méně obvyklé SNP, patří bodová mutace na pozici 167 (F167Y) a 198 (E198A) (Köhler, 2001; Kotze & Prichard, 2016). Další studie ukázaly, že u *H. contortus* rezistentních na benzimidazoly může rovněž docházet buď k úplné, nebo alespoň částečné ztrátě alel izotypu 2 β -tubulinu (Kotze & Prichard, 2016). Musíme ovšem počítat s tím, že do hry mohou vstupovat i některé další mechanismy, o kterých zatím nevíme (Köhler, 2001).

Tab. 3. SNP na izotypu 1 genu pro β -tubulin u rezistentních *H. contortus*

Číslo kodonu	Původní aminokyselina	Nová aminokyselina
167	Phe	Tyr
198	Glu	Ala
200	Phe	Tyr

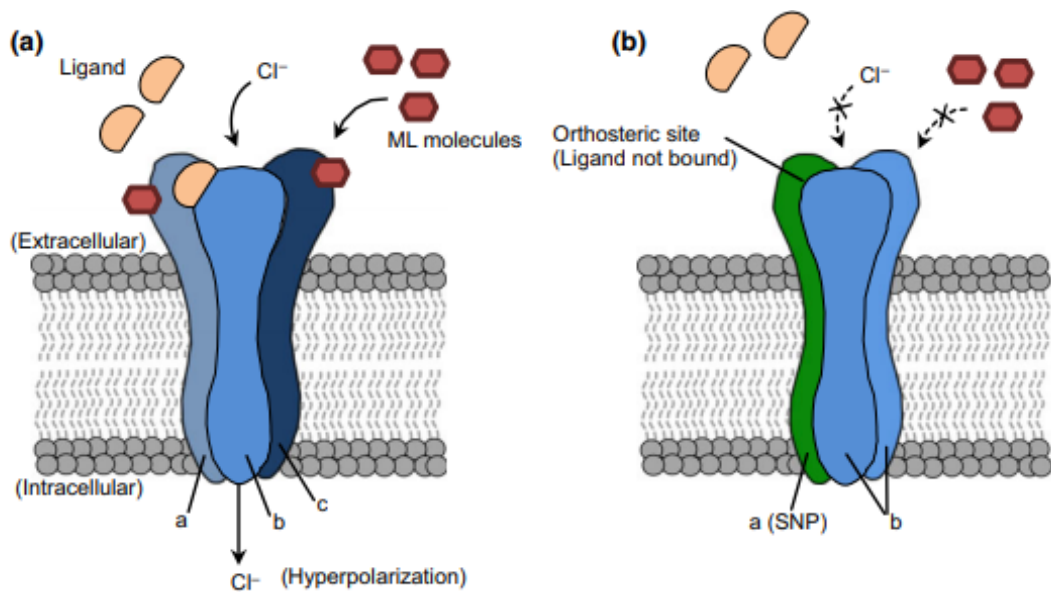
(Převzato z Furtado et al., 2016)



Obr. 12. Předpokládaný mechanismus rezistence na benzimidazoly: U citlivých jedinců dochází vazbou benzimidazolů na β -podjednotku tubulinu k zastavení polymerizace mikrotubulů, což poškozuje dynamickou rovnováhu. U rezistentních jedinců však SNP způsobují změny izotypu 1 β -tubulinu, brání tak vazbě benzimidazolů na své vazebné místo a zamezují jejich účinku (převzato z Whittaker et al., 2017,).

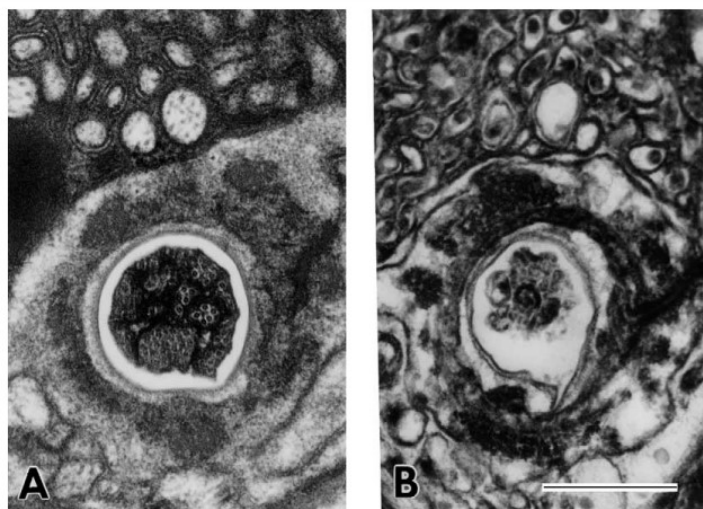
Makrocyclické laktony

Rezistence na makrocyclické laktony byla dlouhou dobu hluboce studována s nepřesvědčivými výsledky. Dle Blackhall et al. 1998 bylo zjištěno, že pravděpodobně dochází ke zvýšené expresi alely genu pro α -podjednotku glutamátového chloridového kanálu (GluCl). Další studie pak zjistily, že může docházet také k mutacím na genu pro GluCl, což ale nebylo potvrzeno ve vzorcích z terénu (viz obr. 13). Další kroky studií pak vedly ke zjištění, že roli může hrát také efflux makrocyclických laktonů z buňky pomocí P-gp (Kotze & Prichard, 2016). To bylo potvrzeno zjištěním, že inhibitory P-gp mohou zvýšit senzitivitu *H. contortus* k makrocyclickým laktonům (Arsenopoulos et al., 2021). Ačkoli všechny tyto mechanismy byly podrobně studovány, nemůžeme s jistotou říci, že skutečně způsobují rezistenci *H. contortus* na makrocyclické laktony (Kotze & Prichard, 2016).



Obr. 13. Předpokládaný mechanismus rezistence na makrocyclické laktony: U citlivých jedinců *H. contortus* dochází k alosterické aktivaci GluCl díky molekule makrocyclického laktonu, což vede k influxu Cl⁻ a následné hyperpolarizaci neuromuskulárního systému. Díky strukturální změně GluCl u rezistentních jedinců je však schopnost vazby snížena a k influxu Cl⁻ nedochází, to brání účinku makrocyclických laktonů na parazitární buňku (převzato z Whittaker et al., 2017).

V poměrně nedávné studii prováděné Urdaneta-Marquez et al., 2014 byl však objeven další možný mechanismus rezistence. Bylo zjištěno, že dochází k anatomickým změnám a funkci amfid – váčkovitých chemoreceptorů nacházejících se v přední části těla *H. contortus* sloužících jako senzorké orgány (viz obr. 14) (Kotze & Prichard, 2016).



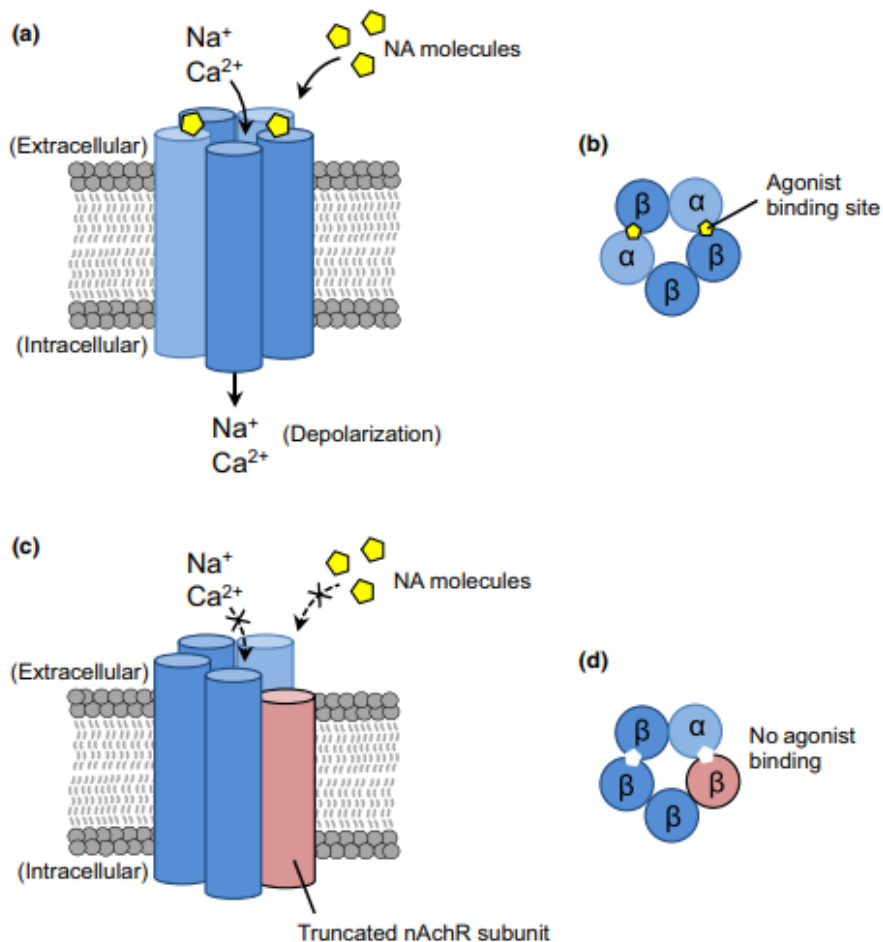
Obr. 14. Změny v příčném řezu amfid u ivermektin-rezistentního kmenu *H. contortus* (obr. B) oproti ivermektin-senzitivnímu kmenu (obr. A) (převzato Freeman et al., 2003).

Imidazothiazoly

Dle studií prováděných Sangsterem je mechanismus rezistence na levamisol a další imidazothiazoly způsobená změnami místa působení těchto látek v buňce. K tomu dochází hned několika způsoby. Jednak bylo zjištěno zkrácení genů podjednotky nikotinového acetylcholinového receptoru (nAChR), dále jejich snížená transkripce, rovněž snížená transkripce genů pro pomocné proteiny na nAChR (viz obr. 15) (Kotze & Prichard, 2016). To dokládá, že *H. contortus* je schopen vytvořit si různé molekulární mechanismy, kterými se brání působení imidazothiazolů. Detekce anthelmintické rezistence molekulárními metodami je z tohoto důvodu složitá (Arsenopoulos et al., 2021).

Deriváty aminoacetonitrilu

Studie zabývající se rezistencí *H. contortus* byly prováděny již před uvedením těchto látek na trh. Dle Kaminsky et al., 2008 bylo zjištěno, že mutantní linie vznikly již během několika generací. Konkrétně došlo ke změnám na dvou podjednotkách genů pro nAChR (viz obr. 15). Tyto změny vedly k mis-splicingu, inzercím a bodovým mutacím, které následně způsobovaly předčasnou terminaci translace proteinu. Tyto studie však probíhaly na in vitro modelech a nebylo jisté, zda tyto změny budou patrné i u skutečných vzorků (Kotze & Prichard, 2016). Novější studie ovšem naznačují, že opravdu k některým těmto mutacím u reálných vzorků dochází a rezistence na monepantel je již poměrně rozšířena (Arsenopoulos et al., 2021).



Obr. 15. Předpokládaný mechanismus rezistence na nikotinové agonisty (levamisol, monepantel, pyrantel): Agonisté nikotinových receptorů se vážou na specifické místo mezi podjednotkami α a β nAChR, což vede k influxu kationtů do buňky a následné depolarizaci neuromuskulárního systému. U rezistentních kmenů dochází ke zkrácení jedné β podjednotky a mizí tak vazebné místo pro nikotinové agonisty, což je zřejmě jeden z mechanismů rezistence na tyto látky (převzato z Whittaker et al., 2017).

Klosantel

Protože je klosantel úzkospektrým anthelmintikem působícím jen na krev-sající parazity jako *H. contortus* a *Fasciola hepatica*, bylo mu věnováno mnohem méně pozornosti než širokospektrým anthelmintikům jako jsou benzimidazoly. I u této látky se však vyskytuje rezistence. Na základě studií provedených Rothwellem a Sangsterem (1997) bylo zjištěno, že u klosantel-rezistentního kmene *H. contortus* dochází k menší akumulaci klosantelu v těle parazita. Autoři se domnívali, že by to mohlo být způsobeno několika mechanismy, nicméně skutečný důvod dosud zůstává neznámý (Kotze & Prichard, 2016).

2.5.2. Enzymy metabolizující xenobiotika a rezistence

Přítomnost a aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika (XME) hraje důležitou roli při vzniku rezistence na anthelmintika. Bylo dokázáno, že i nízké dávky anthelmintik vedou u helmintů k aktivaci obranných mechanismů a snížení citlivosti vůči těmto látkám (Cvilink et al., 2009).

Indukce mnoha XME I. i II. fáze metabolismu v důsledku expozice xenobiotikům byla popsána např. u *C. elegans* (Stasiuk et al., 2019). Tento jev je patrný i u *H. contortus*, jehož rezistentní kmeny vykazují vyšší tvorbu metabolitů flubendazolu než ty citlivé (Laing et al., 2015). Nicméně up-regulace enzymů je u *C. elegans* na mnohem vyšší úrovni a tento parazit tak vykazuje větší úspěšnost např. v metabolismu benzimidazolů (Stasiuk et al., 2019).

Vzniku rezistence tak může napomáhat **zvýšená exprese různých XME**. Míra vlivu jednotlivých typů enzymů je pravděpodobně rozdílná. Např. zvýšená exprese CYP jako důvod rezistence na ivermektin dle studie Kellerová et al. 2019 nebyla potvrzena, nicméně není vyloučeno, že CYP hraje roli v rezistenci na jiná anthelmintika (Kellerová et al., 2019). Oproti tomu několik studií prokázalo zapojení ABC v rezistenci hlístic na makrocyclické laktony, zejména na ivermektin, zatímco vliv ABC na rezistenci *H. contortus* vůči flubendazolu nebyl pozorován. Ačkoli není známa souvislost mezi expresí GST, jejich aktivitou a rezistencí na léčiva, upregulace GST vedla ke zvýšení rezistence na vysychání larev *H. contortus*. A nakonec důležitost UGT v rezistenci na anthelmintika byla naznačena několika studiemi, např. bylo prokázáno, že rezistentní dospělci *H. contortus* produkovali mnohem větší množství konjugátů albendazolu a flubendazolu s glukózou než citliví jedinci (Matoušková et al., 2016).

Vliv exprese XME na rezistenci u *H. contortus*, ale i dalších druhů helmintů, není zatím dobře prozkoumanou oblastí a je třeba ji dále studovat, protože nám může pomoci pochopit mechanismy vzniku rezistence na užívaná anthelmintika.

2.5.3. Diagnostika rezistence

Stále se zvyšující výskyt rezistence vedl k nutnosti vývoje vhodných diagnostických nástrojů. Mezi základní podmínky vhodných diagnostických metod můžeme zařadit jejich spolehlivost, snadné použití, reprodukovatelnost výsledků a samozřejmě také cenu. Diagnostické nástroje můžeme rozdělit na dva základní typy, a to *in vivo* testy, během kterých jsou parazité uvnitř těla hostitele, a *in vitro* testy, které probíhají na různých životních stádiích parazitů mimo hostitelovo tělo (Taylor et al., 2002).

Nejpoužívanější metodou diagnostiky rezistence je v současnosti **in vivo** test **FECRT**, který porovnává počet vajíček parazita ve stolici hostitele před léčbou anthelmintiky a po ní (konkrétně by vzorky měly být sbírány po 10-14 dnech od podání anthelmintické látky). Výhodou FECRT je to, že může být použit pro všechny skupiny anthelmintik (Taylor et al., 2002). Tento test má ale i své limity, které snižují vhodost jeho širokého použití. Mezi tyto limity patří náklady na jeho provedení, nedostatečná přesnost, odlišnosti v obsahu vajíček v jednotlivých vzorcích a nízká senzitivita testu (Kotze & Prichard, 2016).

Alternativy *in vivo* testu byly hledány po mnoho let. Tyto testy jsou na rozdíl od FECRT mnohem levnější, relativně rychlé a nezatěžují hostitelský organismus (Kotze & Prichard, 2016).

Jednou z nejdůležitějších **in vitro** metod je **test líhnutí vajíček** (EHT), který využívá pro svůj princip líhnutí vajíček parazita v přítomnosti anthelmintika, nejčastěji tiabendazolu. Pokud je populace *H. contortus* citlivá, obvykle nepřežije dávku tiabendazolu vyšší než 0,1 µg/ml (Taylor et al., 2002). Ukázalo se také, že podíl vajíček, který se při této koncentraci vylíhl, lze přibližně srovnat s počtem rezistentních jedinců v populaci. Výhodou této metody je neinvazivnost vůči hostiteli, rychlost, cena a hlavně vhodnost pro použití u *H. contortus* (Kotze & Prichard, 2016). Nevýhodou je obtížnost získávání nevyvinutých vajíček a také skutečnost, že nelze použít jakékoli anthelmintikum – je nezbytné, aby anthelmintikum ovlivňovalo raná stádia helmintů a aby bylo rozpustné ve vodě – v tomto ohledu se jako nejlepší volba ukázal právě tiabendazol (Taylor et al., 2002).

Další *in vitro* metodou diagnostiky rezistence je **test vývoje larev** (LDT), při kterém se měří účinek anthelmintik na vývoji larev *H. contortus* z L1 do L3 infekční fáze. Výhodou této metody je rychlost, cena, spolehlivost a také to, že na rozdíl od EHT nemusí být použita nevyvinutá vajíčka. Navíc lze využít pro celou řadu anthelmintik (Taylor et al., 2002). Nevýhodou je, že ne vždy korelují data o citlivosti larev s citlivostí dospělců – byly popsány případy, kdy dospělí jedinci vykazovali vysokou míru rezistence, zatímco larvální stádia se v rámci LDT ukazovala jako citlivá (Kotze & Prichard, 2016).

Další, spíše experimentální metodou, je **test motility larev** (LMT), který se zabývá pohyblivostí larev parazitických červů včetně *H. contortus* po podání anthelmintika. Hlavní nevýhodou je skutečnost, že ačkoli existuje několik způsobů provedení tohoto testu, dosud nebyl zaveden standardizovaný postup. Z tohoto důvodu se LMT v praxi nepoužívá tak široce jako metody předchozí (Kotze & Prichard, 2016).

Nadějnou metodou diagnostiky rezistence se staly **molekulární metody**. K této naději vedla znalost molekulární podstaty anthelmintické rezistence *H. contortus* u některých anthelmintik.

Vzhledem k různým stupňům znalosti rezistence u jednotlivých chemických skupin látek je však tento úkol poměrně náročný. Nejlépe lze provést u benzimidazolů, jelikož jsou mechanismy rezistence na tyto látky dobře prostudované. Ačkoli tato metoda nedokáže určit stupeň rezistence, dovede dobře rozlišovat mezi rezistentními a citlivými izoláty, což by z ní mohlo udělat rutinní diagnostický nástroj pro detekci rezistence. U ostatních skupin léčiv nedochází k tak rychlému vývoji molekulární diagnostiky, jak bychom si přáli, za což mohou hlavně neznalosti konkrétní povahy mechanismů rezistence (Kotze & Prichard, 2016).

2.6. Vývoj nových léčiv

Vývoj nových léčiv je zdoluhavý proces, při kterém se do klinické praxe dostávají nové molekuly. Tento proces zahrnuje všechny nezbytné kroky od identifikace nové molekuly přes preklinické a klinické zkoušky až po uvedení léčiva na trh a jeho následné postmarketingové sledování (Preziosi, 2007). Celý proces vyžaduje značné investice času a finančních prostředků a může trvat až 15 let, aby se nové látky dostaly z laboratoře až na trh. Ačkoli se odhaduje, že v současné době je třeba na vývoj jednoho léčiva investovat zhruba 3 miliardy amerických dolarů (a tyto sumy budou neustále růst), úspěšný vstup na trh zaznamená méně než 10% nových látek (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020).

Existuje několik cest, kterými se můžeme vydat při hledání nového léčiva. Nejjednodušší cestou je hledání tzv. „**me too drugs**“, kdy se díky menší změně struktury původní léčivé látky získávají látky příbuzné se stejným mechanismem účinku (Preziosi, 2007). Výhodou těchto látek je, že mohou mít menší nežádoucí účinky, interakce, vyšší specifitu účinku, lepší farmakokinetické vlastnosti a samozřejmě také výrazně nižší cenu vývoje a rychlejší cestu na trh. Příkladem skupin, kde najdeme velké množství „me too drugs“, jsou třeba statiny, ACEi, peniciliny a cefalosporiny, beta blokátory nebo SSRI (Aronson & Green, 2020). Nevýhodou naopak je, že vlastní mechanismus účinku zůstává stejný, což třeba u anthelmintické skupiny benzimidazolů znamená, že rezistentní kmeny nejsou citlivé vůči žádnému léčivu z této skupiny.

Některá „me too“ léčiva přináší tak zásadní změnu oproti původní molekule, že o nich již nemluvíme jako o „me too drugs“, ale jejich vývoj označujeme pojmem **inovativní zlepšení** (Preziosi, 2007). Týká se to například betablokátorů, u kterých byly v průběhu času z neselektivních léčiv vyvinuty látky kardioselektivní, které významně zvyšují důležitost této skupiny (Aronson & Green, 2020).

Poslední, nejtěžší cestou vývoje nových léčiv, je tzv. **inovativní výzkum**. Jádrem inovativního výzkumu je najít léčivo, které má nejenom jiné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale především jiný mechanismus účinku oproti molekulám, které se pro léčbu dané nemoci běžně využívají (Preziosi, 2007). Tyto látky, nazývané jako vůdčí molekuly, často představují průlom v dosavadní léčbě konkrétních nemocí. Pro vývoj těchto léčiv mohou vědci využívat různé zdroje – např. látky přírodního původu, chemickou syntézu nebo biotechnologické metody (Petrova, 2014). Tento proces je finančně i časově nejnáročnější ze všech možností. Z tohoto důvodu se při inovativním výzkumu objevuje nový přístup, tzv. „**drug repurposing**“ (**DR**), při kterém se hledají další účinky starších molekul a jejich možné využití pro nový účel. Tento přístup je založen na principu polyfarmakologie, což je schopnost látky ovlivňovat více cílových struktur. V rámci DR lze kromě molekul užívaných v praxi využít i látky, které se již účastnily klinického hodnocení a nedošly až na trh ve své původně zamýšlené indikaci (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020).

2.6.1. Drug repurposing

Ve Spojených státech amerických představuje v současné době DR přibližně 30% všech nově schválených léčiv a do roku 2004 bylo 84% všech léčiv užívaných v USA používáno pro více než jednu indikaci (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020).

DR v sobě skrývá několik výhod, a sice zkracuje dobu nutnou pro vývoj nového léčiva o 5-7 let, protože už je k dispozici jeho bezpečnostní profil, dávkovací schéma a farmakokinetická data (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020). Rovněž dochází ke zvýšení pravděpodobnosti, že se léčivo dostane až na trh, a to zhruba o 150%. Dochází také ke snížení finanční náročnosti výzkumu až o 80% (Jourdan et al., 2020). Výhodou také je, že i potenciální léčiva, která neprošla dál než do klinických testů, nemusí být zcela opuštěna, ale mohou být využita pro jiný účel. Nasbíraná data tak mohou být využita nadále. Pro příklad lze uvést třeba farmaceutickou společnost Pfizer, která při hledání léčiva na vysoký krevní tlak a ischemickou chorobu srdeční našla molekulu sildenafilu. Poté, co se prokázaly její účinky na erektilní dysfunkci, se zájem výzkumníků přesunul právě na tuto oblast a pod obchodním názvem Viagra® se sildenafil stal jedním z nejúspěšnějších léčiv v historii (Petrova, 2014).

Existuje však také několik nevýhod DR. Navzdory slibným výsledkům v akademickém výzkumu se farmaceutickým firmám tento proces nemusí vyplatit, a to zejména pokud již vypršel patent původní molekuly a je k dispozici řada generik. V tomto případě totiž nemůže být zaručeno výhradní užívání látky od výrobce, který na možnost DR pro novou indikaci upozornil (Jourdan et al., 2020). Může také dojít k případu, kdy se molekula už v praxi nepoužívá a přivést ji zpátky

na trh by znamenalo vynaložení velkých nákladů, které by se nemusely vrátit zpět. Pro podporu DR by proto bylo potřeba zvýhodnit firmy, které se rozhodnou do procesu investovat. Mezi další nevýhody můžeme zařadit skutečnost, že ačkoli *in silico* modely umožňují vědcům předvídat nová potenciální použití léčiv, tyto modely nemusí odpovídat reálným podmínkám a je nutné ověřit je na *in vivo* a *in vitro* modelech. Je proto nutná správná optimalizace kritérií, aby nedocházelo k zavedení na falešnou stopu a zbytečnému zvýšení nákladů a zpoždění/zastavení celého procesu. Může také dojít k selhání DR kvůli nesprávnému předpokladu, že pro novou indikaci bude účinná stejná cesta podání a stejné dávkování jako pro indikaci původní (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020).

Hlavní nevýhodou DR pro antimikrobiální nebo antiparazitární použití je, že tyto indikace obvykle vyžadují dávkování na úrovních přesahujících úroveň dosaženou během studií toxicity prováděných k registraci a je tedy nutné opakovat toxicitní studie pro vyšší dávky (Zajíčková et al., 2020).

Postup při drug repurposing

V minulosti nebyly tyto látky objevovány systematickým výzkumem, ale náhodně. Jako příklad lze uvést třeba repurposing kyseliny acetylsalicylové pro její antiagregační účinky nebo výše zmíněný sildenafil (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020; Jourdan et al., 2020).

V současnosti je však trendem systematický přístup. Ten spočívá nejprve v identifikaci potenciální sloučeniny (sloučenin) pro určitou indikaci, následuje preklinické hodnocení k objasnění biologických mechanismů jejího působení a nakonec se provádí klinické studie ke zjištění účinnosti a bezpečnosti. K objasnění nových mechanismů nebo molekulárních interakcí jsou zapotřebí rozsáhlé znalosti o zkoumaném onemocnění a charakteristikách sloučeniny, včetně fyzikálně-chemických, farmakokinetických, farmakodynamických a toxikologických profilů. Pro tyto účely bylo vytvořeno několik speciálních databází, pracujících na základě různých kritérií. Díky možnostem bioinformatiky činí předpokládaný čas potřebný pro objevení hledané molekuly pouhé dva roky. Proces DR vyžaduje systematický přístup a spojuje vědecká data z mnoha oborů, jako jsou *in silico* modely, syntetická chemie, *in vitro* a *in vivo* zkoušky, systémové farmakologické přístupy a klinické studie (Juárez-López & Schcolnik-Cabrera, 2020).

Příklady drug repurposing

Jak již bylo řečeno výše, pro DR lze využít jak molekuly běžně využívané v klinické praxi, tak i ty, které již byly z praxe vyřazeny nebo se do ní nikdy nedostaly. Příkladem prvního případu je například duloxetin, léčivo dříve schválené pouze k léčbě deprese a úzkostných stavů, dnes FDA schválené také na inkontinenci stresového původu, fibromyalgii a chronickou muskuloskeletární bolest (Li & Jones, 2012). Léčivem, které bylo vyřazeno z praxe a znovu se vrátilo, je třeba nechvalně známý thalidomid – léčivo původně užívané proti těhotenské nevolnosti bylo zakázáno poté, co se prokázaly jeho teratogenní účinky. V současnosti je thalidomid využíván jako tzv. sirotčí léčivo pro léčbu lepry, ale zaznamenal také druhý DR pro léčbu mnohočetného myelomu (Jourdan et al., 2020). Oproti tomu zidovudin se v první zamýšlené indikaci na trh nikdy nedostal, díky DR však dostal novou šanci. Původně byl vyvíjený pro léčbu onkologických onemocnění, kde nevykazoval dostatečné účinky, a dnes se využívá jako léčivo proti HIV (Broder, 2010).

Drug repurposing u anthelmintik

Vzhledem k velké finanční náročnosti vývoje nových léčiv je vývoj anthelmintik tak trochu odsunut na vedlejší kolej a helmintózy tak tvoří největší skupinu tzv. opomíjených tropických nemocí. DR představuje pro hledání anthelminticky účinných látek ideální cestu. Systematickým výzkumem byly nalezeny desítky potencionálních anthelmintik, a to zejména ze skupiny antimalarik a protinádorových léčiv. Většina těchto látek bohužel zatím nebyla podrobena klinickým zkouškám a na své možné uplatnění teprve čekají. Poměrně daleko je ve výzkumu oxantel pamoát. Toto potencionální léčivo bylo objeveno již v 70. letech minulého století, ale nebylo v praxi používáno (Panic et al., 2014). Oxantel pamoát se jeví jako nadějná látka pro kombinaci s albendazolem při léčbě onemocnění způsobeným *Trichuris trichiura*, kde bylo potvrzeno zvýšení účinku oproti samotnému albendazolu (Speich et al., 2014). Dalším příkladem DR u anthelmintik jsou antimalarika ze skupiny artemisininů, která jsou potenciálními léčivy onemocnění způsobených různými helminty, např. *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp., ale i *H. contortus* (Lam et al., 2018). Zajímavým léčivem v rámci DR by mohl být tamoxifen – léčivo běžně užívané pro léčbu nádorů prsu, které vykazuje účinek vůči *S. mansoni* (Panic et al., 2014; Oliveira et al., 2019).

Na základě studie provedené Weeks et al. 2018 bylo zjištěno, že antidepressiva sertralin, paroxetin a chlorpromazin jsou potenciálně vhodná pro DR jako anthelminticky účinné látky. Studie probíhala zejména na modelovém organismu – helmintu *C. elegans*. Ukázalo se, že

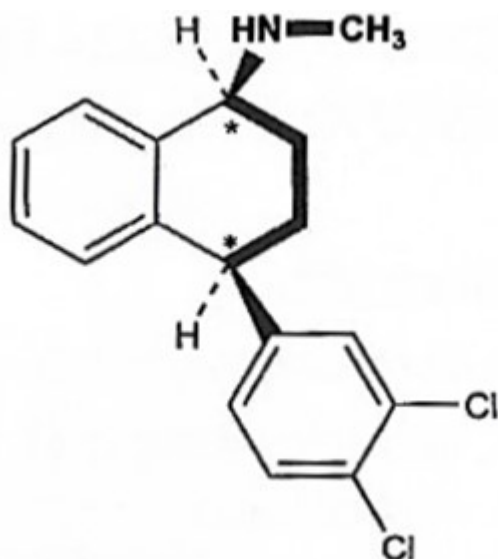
působením těchto látek dochází u *C. elegans* k usmrcení všech stádií od vajíček přes vyvíjející se larvy, až po dospělé jedince. Překvapivá byla i obrovská rychlost těchto dějů, která činila jen několik minut po expozici. Sertralin, paroxetin a chlorpromazin byly také testovány na dalších helmitech, kdy došlo ke snížení motility dospělců *Trichuris muris*, zabránění líhnutí a vývoje *Ancylostoma caninum* a usmrcení *S. mansoni*. Tito helminté jsou si navzájem poměrně vzdáleni, a tak výzkum vedl k naději, že výše uvedené látky budou moci být používány jako další metoda boje proti helmintům a zpomalí vznik anthelmintické rezistence ostatních používaných látek (Weeks et al., 2018).

2.7. Sertralin

Sertralin je selektivní inhibitor reuptaku serotoninu (SSRI). Mezi další látky řadící se k této skupině patří citalopram, escitalopram, fluoxetin, fluvoxamin nebo paroxetin. SSRI se používají u lidí hlavně pro svou antidepresivní aktivitu. Nacházejí však využití také v terapii úzkostných chorob (obsedantně-kompulzivní poruchy, generalizovaná úzkostná porucha, panická porucha, posttraumatická stresová porucha a sociální fobie). SSRI selektivně inhibují pouze zpětné vychytávání serotoninu, minimálně ovlivňují receptory v centrální nervové soustavě a nemají proto nežádoucí účinky charakteristické pro starší antidepresiva (Doležal, 2013).

Inhibicí aktivního transportního mechanismu pro zpětné vychytávání serotoninu zvyšuje sertralin koncentraci serotoninu v synaptických štěrbinách a prodlužuje tak jeho aktivitu na postsynaptickém receptoru. Inhibice zpětného vychytávání vede ke sníženému obratu serotoninu prostřednictvím mechanismu negativní zpětné vazby. Předpokládá se, že tyto základní farmakologické účinky způsobují antidepresivní aktivitu sertralinu (Murdoch & McTavish, 1992).

Chemicky se jedná o derivát naftylaminu a s ostatními SSRI jsou navzájem strukturně poměrně heterogenní. Typický je pro ně aminoalkylový postranní řetězec, často spojený se zbytkem molekuly atomem kyslíku. U paroxetinu a sertralinu je postranní řetězec součástí alicyklického útvaru. Sertralin neobsahuje atom kyslíku. S výjimkou fluvoxaminu jsou SSRI opticky aktivní sloučeniny. Sertralin se používá ve formě *cis*-izomeru s konfigurací 1*S*,4*S* (viz obr. 16). V praxi se využívá jako sertralin hydrochlorid (Doležal et al., 2013).



Obr. 16. Molekula sertralinu: Lékopisný sertralin hydrochlorid chemicky: (1S,4S)-4-(3,4-dichlorfenyl)-N-methyl-1,2,3,4-tetrahydronaftalen-1-amin-hydrochlorid (převzato z Doležal et al., 2013, str. 77).

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo studium možného použití sertralinu v léčbě hemonchózy, nemoci malých přežvýkavců způsobené gastrointestinální parazitickou hlísticí vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*).

V rámci práce byl hodnocen:

- Vliv sertralinu na hladinu ATP u *H. contortus*
- Metabolismus sertralinu u *H. contortus*
- Hepatotoxicita sertralinu u ovce domácí (*Ovis aries*) – hostitele *H. contortus*

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

H. contortus

- **Izolace**
 - Agar, Sigma
 - NaCl, Penta
- **Medium na *H. contortus***
 - RPMI-1640 (R8758), Sigma
 - Glukóza, Penta
 - Penicilin-Streptomycin (Pen-Strep), Sigma
 - Amfotericin B, Thermo Fisher Scientific
 - HEPES = (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina), Roth
- **ATP assay**
 - Ethanol (96%), Penta
 - EDTA (Ethylen-diamin tetraoctová kyselina) (Triplex III), Sigma
 - Tris = Tris(hydroxymethyl)aminophen, Merck
 - HCl (35%), Penta
 - ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche
 - Luciferasa
 - ATP standard

Hepatocyty

- **Eurocollins**
 - KH_2PO_4 , Lachner
 - K_2HPO_4 , Penta
 - KCl, Penta
 - NaHCO_3 , Penta
 - Glukóza, Penta

- **Roztoky na izolaci hepatocytů**
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Penta
 - KH_2PO_4 , Lachner
 - NaCl, Penta
 - KCl, Penta
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma
 - NaHCO_3 , Penta
 - CaCl_2 , Sigma
 - EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N',N'-tetracetic acid), Sigma
 - Kolagenasa, Gibco
 - Hovězí sérový albumin, Sigma
 - NaOH, Lachner
 - HCl (35%), Penta
- **Roztok kolagenu**
 - Kolagen, Roche
 - Kyselina octová, Sigma
- **Medium na hepatocyty (ISOM)**
 - Williams E medium prášek, Sigma
 - NaHCO_3 , Penta
 - Ham's Nutrient Mixture F12 (HAM F12), Sigma
 - Penicilin, Sigma
 - Streptomycin, Sigma
 - FBS (Fetal Bovine Serum), Gibco
- **MTT test**
 - MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Penta
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Penta
 - HCl (35%), Penta
 - Isopropanol, Lachner
 - Ivermektin, Sigma
 - Albendazol, Sigma
- **Další chemikálie**
 - Trypanová modř, Sigma
 - Pneumoxid

Extrakce sertralinu ze vzorků

- (±)-Sertraline-D3 hydrochloride roztok (D3-SRT), Sigma
- Ethanol HPLC, Penta
- Ethylacetát HPLC, Penta

UHPLC – MS

- Kyselina mravenčí HPLC-MS, Fluka
- Acetonitril 100% HPLC-MS, Fisher Chemical

BCA assay

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific
- NaOH, Lachner

Další použité chemikálie

- Sertralin hydrochlorid (SRT), Sigma
- „Phosphate buffered saline“ (PBS) tablety, Sigma
- Suchý led
- Redestilovaná voda
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Lachner

4.1.2. Spotřební materiál

- Nesterilní 96-jamkové destičky černé, Costar® 3915 Black Flatbottom
- Nesterilní 96-jamkové destičky Grainer, CELLSTAR® 96 well plates
- Sterilní 96-jamkové destičky, TPP® Tissue culture test plate, 96 wells, 92696
- Sterilní 24-jamkové destičky, TPP® tissue culture plates, 24 wells, 92024
- Sterilní Petriho misky pro tkáňové kultury, TPP® 22,1 cm², 93060
- Jednorázové pipetovací špičky, Eppendorf
- Mikrozukmavky, Eppendorf
- 50 ml centrifugační zukmavka se šroubovacím uzávěrem, P-lab
- 2ml mikrozukmavky se šroubovaním uzávěrem, SSi Bio
- Vialky, Eppendorf
- Zirkonové kuličky SiliBeads, Sili

- Filtry LUT Syringe Filter PTFE, 4mm, 0,22µm, PL70A-102
- Injekční stříkačky trojdílné – Luer Slip, sterilní, bezezbytkové, Medilab
- Inerty, Agilent, 9301-1387
- Parafilm
- Gázy
- Sítko na filtrování hepatocytů
- Škrabka na buňky
- Buničina
- Igelitové sáčky
- Alobal

4.2. Pomůcky a přístroje

- Laboratorní nádobí
- Analytické váhy Scaltec SBC 22, Scaltec
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf Nexera, Shimadzu
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000
- Hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus Orbitrap
- Hmotnostní spektrometr Shimadzu LC-MS 8030
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf
- Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Fischer Scientific
- Koncentrátor Eppendorf Concentrator Plus, Eppendorf
- Třepačka Multi Reax, Heidolph
- Thermomixer Comfort, Eppendorf
- Tecan Infinite M200, Spark Control Tecan v. 2.2, Tecan
- Laminární box Aura vertical S. D. 4, Bioair
- Kuličkový homogenizátor FastPrep-24 5G, MP Biomedicals
- Pipety Eppendorf Research, Eppendorf
- Automatické pipety Eppendorf Xplorer, Eppendorf
- Multikanálové automatické pipety Eppendorf Xplorer, Eppendorf
- Vortex IKA MS2 mini shaker, Gemini
- Mikroskop, NIB-100 Inverted Biological Microscope, Novel Optics

- CO₂ inkubátor, Binder
- Autokláv, Binder
- pH metr, SI Analytics
- Elektromagnetická míchačka + míchadlo
- Lednice
- Mrazicí box (-80°C a -20°C)
- Chladicí box
- Ultrazvuková lázeň
- Bürkerova komůrka
- Centrifugační kyvety
- Büchnerova nálevka
- Pinzety
- Skalpel
- Nůžky
- Stopky
- Nádoba na led
- Hadičky pro perfuzi jater

4.3. Metody

4.3.1. Příprava pufrů, médií a roztoků

Zásobní roztoky HCl a NaOH

a. 5M HCl

5M roztok HCl vznikl doplněním 44 ml 35% HCl do 100 ml redestilovanou vodou. Následným ředěním tohoto roztoku byly získány roztoky HCl o požadované koncentraci pro jednotlivé experimenty.

b. 5M NaOH

5M roztok NaOH vznikl rozpuštěním 20g hydroxidu sodného v redestilované vodě a doplněním na objem 100 ml. Následným ředěním tohoto roztoku byly získány roztoky HCl o požadované koncentraci pro jednotlivé experimenty.

H. contortus

a. Příprava agaru

Agar byl připraven rozpuštěním 45 g práškového agaru ve 3 litrech vody za současného zahřívání a následného zchlazení.

b. Medium na *H. contortus*

Pro přípravu kultivačního média na *H. contortus* byl využit komerčně dostupný Sigma RPMI-1640 (R8758), tak aby obsahoval 0.8% glukózy, 0.25 µg/ml amfotericin B, 10 U/ml penicilin, 10 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES (dle Kotze & McClure, 2001).

K 500 ml média bylo přidáno:

- 3 g glukózy (1 g je již v médiu)
- 0,5 ml amfotericinu B
- 5 ml Pen-Strep
- 5 ml HEPES

c. PBS

Rozpuštěním jedné tablety PBS v 200ml redestilované vody vznikl 0,01 M fosfátový pufr, pH 7,4.

Hepatocyty

a. Eurocollins (roztok na transport a promytí tkání – jater)

- Složení:
 - KH_2PO_4 2,05 g/l
 - K_2HPO_4 47,40 g/l
 - KCl 1,12 g/l
 - NaHCO_3 0,84 g/l
 - glukosa 35,00 g/l

Všechny složky byly naváženy, rozpuštěny v malém množství redestilované vody, slity a doplněny v odměrné baňce na objem 1 litru. Pak byl roztok rozdělen do lahvíček z umělé hmoty (po 50 – 400 ml) a zmrazen.

b. Rostoku kolagenu 10 mg/ 25 ml

Pomocí dvou sterilních pinzet bylo naváženo 10 mg kolagenu do sterilní mikrozkuřavky Eppendorf. V laminárním boxu byl navážený kolagen přemístěn do sterilní umělohmotné

nádobky a bylo k němu připipetováno 25 ml sterilní 0,1% kyseliny octové. Nádobka byla uzavřena, opatřena parafilmem a ponechána ve vodní lázni při teplotě 37°C do rozpuštění kolagenu za občasného protřepání. Připravený roztok byl přeplněn do jiné sterilní nádoby, aby nebylo kontaminováno víčko. Do doby použití byl roztok uchováván v lednici.

c. Fosfátový pufr

Pro přípravu fosfátového pufru bylo rozpuštěno 2,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,4g KH_2PO_4 v redestilované vodě a výsledný objem doplněn na 200 ml. Pufr byl poté rozplněn po 20 ml do lahvíček a zmrazen při -20°C.

d. Roztok solí

Roztok solí byl připraven rozpuštěním 160g NaCl, 8g KCl a 4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v redestilované vodě a doplněním na objem 2 litrů. Tento roztok byl rozplněn po 200ml do plastových lahví a zmrazen při -20°C.

e. 1M roztok NaHCO_3

Tento roztok byl připraven rozpuštěním 16,8g NaHCO_3 v redestilované vodě a doplněním na objem 200 ml. Roztok byl poté rozplněn po 31,2 ml do plastových lahví a uchováván při teplotě -20°C.

f. Roztoky na izolaci hepatocytů

Nejprve byly připraveny 2 litry **zásobního roztoku (ZR)** smícháním 1780 ml redestilované vody, 200 ml roztoku solí a 20 ml fosfátového pufru. Tento roztok byl následně využit na přípravu roztoků A, B_k, B_v a C. Nejprve byl připraven **pomocný roztok X** smísením 1200 ml ZR a 31,2 ml 1M NaHCO_3 a následným probubláním pneumoxidem ve vodní lázni při teplotě 37°C po dobu 7 minut a následné úpravě pH na 7,4 (díky 1M HCl nebo 1M NaOH). Roztok X byl poté využit pro přípravu roztoků A a B. **Roztok B**, který je využit pro přípravu roztoků B_v a B_k, vznikl rozpuštěním 1 ml CaCl_2 v 500 ml pomocného roztoku X.

1. Roztok A

Pro přípravu roztoku A bylo rozpuštěno 0,1 g EGTA v 700 ml pomocného roztoku X. Roztok byl přelit do 1 l odsávací baňky a uchováván ve vodní lázni při teplotě 37°C.

2. Roztok B_k s obsahem vápníku a kolagenasy

Pro přípravu bylo odměřeno 30ml roztoku B do 50ml zkumavky, která byla umístěna do vodní lázně při teplotě 37°C. Těsně před promýváním jater tímto roztokem bylo přidáno 30 mg kolagenasy.

3. **Roztok B_v** s obsahem vápníku a **albuminu** (bez kolagenasy)

Roztok B_v vznikl smísením 200 ml roztoku B s 2 g albuminu.

4. **Roztok C** s obsahem vápníku

Pro přípravu roztoku C bylo použito 800 ml ZR, ke kterému bylo přidáno 1,6 ml CaCl₂.

Následně bylo upraveno pH na 7,4 pomocí 0,1M HCl nebo 0,1M NaOH.

g. PEN/STREP

Pro přípravu tohoto roztoku bylo rozpuštěno 63 mg penicilinu a 105 mg streptomycinu v 10 ml redestilované vody.

h. Živné médium ISOM

Příprava toho média probíhala v laminárním boxu. Médium vzniklo smísením roztoku A a B v poměru 1:1. Pro přípravu **roztoku A** bylo rozpuštěno 10,93 g Williams prášku a 2,2 g NaHCO₃ v redestilované vodě, poté bylo přidáno 10,5 ml roztoku PEN/STREP a objem byl doplněn na 1 l. Pro přípravu **roztoku B** bylo rozpuštěno 10,64 g HAM F12 a 1,2 g NaHCO₃ v redestilované vodě a objem též doplněn na 1 l. Připravený ISOM byl poté probubláván 7 min pneumoxidem a následně bylo upraveno pH na 7,2 pomocí 1M HCl, nebo 1M NaOH. Výsledný roztok byl přefiltrován přes bakteriální filtr.

i. Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4

- 1000 ml 0,1 M Na₂HPO₄·12 H₂O, tj. 35,8 g / 1000 ml
- 250 ml 0,1 M NaH₂PO₄·2 H₂O, tj. 3,9 g / 250 ml

Jednotlivé složky byly připraveny do odměrných baněk a potom slévány za stálého míchání (na míchačce) a kontroly pH (pH-metr) do požadované hodnoty pH.

j. Roztok MTT

Roztok MTT byl připraven rozpuštěním 3 mg MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4. Pro důkladné rozpuštění byl roztok vložen na 10 minut do ultrazvukové lázně.

k. Lyzační roztok - 0,08 M HCl v isopropanolu

Roztok byl připraven smísením 2 ml 4 M HCl s 98 ml isopropanolu.

Stanovení ATP

a. Tris/EDTA pufr (100 mM EDTA / 2 mM Tris HCl pufr pH 7,8)

Pro přípravu 1 litru tohoto pufru bylo rozpuštěno 12 g Tris a 0,74 g EDTA v 600 ml redestilované vody, pomocí 6 M HCl bylo upraveno pH a objem byl doplněn na 1 litr redestilovanou vodou.

b. SONOP (Sonification solution) - Ethanol (70% v/v) s obsahem 2mM EDTA, pH 10,9

Pro přípravu 1 litru roztoku se 0,744 g EDTA rozpustí ve 200 ml redestilované vody, pH se upraví na hodnotu 10,9 pomocí 5 M NaOH, přidá se 60 ml redestilované vody a nakonec 740 ml 96% ethanolu.

c. Ředění ATP standardu

Obsah lahvičky s ATP standardem byl rozpuštěn přidáním 990 μl Tris/EDTA pufru na koncentraci $1,65 \times 10^{-4}$ M. Kalibrační křivka byla poté připravena pomocí dalšího ředění vzniklých roztoků přidávkem Tris/EDTA pufru dle tab. 4.

Tab. 4. Kalibrační křivka pro stanovení ATP

Roztok	Množství [roztoku]	Tris/EDTA pufr	Koncentrace (M)
A	10 μl ATP standardu	990 μl	$1,65 \times 10^{-4}$
1	10 μl [A]	990 μl	$1,65 \times 10^{-6}$
2	200 μl [1]	800 μl	$3,30 \times 10^{-7}$
3	100 μl [1]	900 μl	$1,65 \times 10^{-7}$
4	200 μl [3]	800 μl	$3,30 \times 10^{-8}$
5	100 μl [3]	900 μl	$1,65 \times 10^{-8}$
6	200 μl [5]	800 μl	$3,30 \times 10^{-9}$
7	100 μl [5]	900 μl	$1,65 \times 10^{-9}$

d. Ředění Luciferázy

Obsah lahvičky 1 byl rozpuštěn opatrným přidáním 10 ml redestilované vody a inkubován po dobu 5 minut bez třepání. Správného rozpuštění bylo docíleno pomocí opatrného otáčení lahvičky.

Stanovení koncentrace proteinů

a. Pracovní roztok C pro stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA

Pracovní roztok C byl připraven smísením roztoků A a B v poměru 50:1 za vzniku zeleného roztoku.

- **Roztok A:** NaHCO₃, Na₂CO₃, vínán sodno-draselný, BCA v 0,1M NaOH – čirý roztok
- **Roztok B:** 4% CuSO₄ · 6 H₂O – modrý roztok

b. Příprava kalibrační křivky

Pro vytvoření kalibrační křivky byl využit hovězí serový albumin (BSA, Pierce™) o koncentraci 0,2%, který byl naředěn 2M NaOH dvakrát za vzniku 0,1% roztok v 1M NaOH. Vzorky na kalibrační křivku pak byly připraveny smísením 0,1% roztoku BSA s 1M NaOH podle tab. 5.

Pro stanovení bílkoviny u vzorků pro měření ATP bylo do roztoků 0,1% BSA v 1M NaOH a 1M NaOH rozpuštěn navíc zbytek po odpaření Tris/EDTA pufru tak, aby složení kalibrační křivky odpovídalo složení ve vzorcích.

Tab. 5. Příprava vzorků pro sestavení kalibrační křivky

	Koncentrace	0,1% roztok BSA	1M NaOH
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	200 µg/ml	20 µl	80 µl
3	400 µg/ml	40 µl	60 µl
4	600 µg/ml	60 µl	40 µl
5	800 µg/ml	80 µl	20 µl
6	1000 µg/ml	100 µl	0 µl

4.3.2. Experimenty s *H. contortus*

Biologický materiál

Pro tento experiment byly použity tři kmeny *H. contortus*.

- 1) ISE = inbred susceptible Edinburgh (MHco3) – citlivý k běžně užívaným anthelmintikům
- 2) IRE = inbred resistant Edinburgh (MHco5) – rezistentní vůči benzimidazolům a ivermektinu
- 3) WR = White River (MHco4) – rezistentní na ivermektin, benzimidazoly, ivermektin a levamisol klosantel a rafoxanid

Kmeny ISE a IRE byly speciálně vyšlechtěny pro vědecké účely, kde se využívají jako kmeny citlivé a rezistentní. Tyto inbrední kmeny vznikly křížením kmene SE (benzimidazol-citlivého kmene z Edinburghu) a kmene RE4 (benzimidazol-rezistentního kmene získaného z kmene SE) během 15 generací (Roos et al. 2004).

Kmen WR oproti tomu nebyl vytvořen uměle a pochází z oblasti jižní Afriky (Le Jambre et al. 1994).

Izolace dospělců *H. contortus*

Zdravá jehňata (3-4 měsíce stará) byla perorálně infikována 5000 larvami třetího stádia *H. contortus* (L3). Čtyři týdny po infekci byla jehňata poražena v souladu s platnou legislativou. Slezy ovcí byly vyjmuty, umístěny do plastového sáčku, uloženy do vody o teplotě 37°C a transportovány do laboratoře. Dospělci *H. contortus* byli ze slezu jehňat získáni *post mortem* pomocí agarové metody, při které se obsah slezu zamíchal do agaru o teplotě okolo 37°C a následně se přemístil na gázu. Po ztuhnutí agaru se gáza pověsila do nádoby s fyziologickým roztokem, kde během inkubace došlo k migraci *H. contortus* z agaru na dno nádoby. Obsah nádoby se slil a byli tak získáni dospělci *H. contortus*. Izolování jedinci pak byli ručně rozděleni podle pohlaví za pomoci mikroskopu a použiti pro následující experimenty.

Inkubace dospělců se sertralinem

Dospělci *H. contortus* rozřídění podle pohlaví byli naneseni na 24 jamkovou destičku. Pro **stanovení metabolitů sertralinu** bylo do jedné jamky s 1,2ml média umístěno 15 samečků nebo 10 samiček. **Pro stanovení vlivu sertralinu na životnost dospělců** bylo do jedné jamky s 900 μ l média umístěno 8 samečků a 4 samičky. Následně probíhala inkubace po dobu 24 hodin (pro stanovení metabolitů sertralinu) nebo 48 hodin (pro stanovení vlivu sertralinu na životnost dospělců) při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Pro stanovení metabolitů bylo médium odpipetováno do zkumavek a červi byli třikrát opláchnuti pomocí PBS, osušeni a přemístěni do 2ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem. Tyto vzorky byly uchovány při teplotě -20°C do extrakce. Červi určení pro stanovení množství ATP byli po promytí rozseparováni po jedné samičce a dvou samečcích a uloženi do 2ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem s 50 μ l SONOPu a následně byli šokově zmrazeny na suchém ledu a uchovány při -80°C do měření.

Stanovení množství ATP v dospělcích

Tato metoda umožňuje kvantifikaci životaschopných buněk na základě přítomnosti ATP, který je nezbytný pro správnou funkci všech živých buněk. Poškození buněk vede k rychlému poklesu cytoplazmatického ATP. Luciferáza katalyzuje rozklad ATP na AMP a PPi za současné emise světelného záření měřeného při 562 nm. (BMG LABTECH, n.d., cit. 2021-01-10).

Vlastní provedení

Vzorek bylo třeba během zpracování uchovávat při nízké teplotě (vychlazená centrifuga, uchovávání na ledu), protože při nesplnění této podmínky by mohlo dojít k rozkladu ATP díky přítomným enzymům. Ke vzorkům byla přidána odměrka zirkonových kuliček a 450 μ l Tris/EDTA pufru a následně byla provedena homogenizace za pomoci kuličkového homogenizéru FastPrep24 (20 s, 9m/s). Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut (13 200 rpm, 4°C). Pro vlastní měření ATP ve vzorku pomocí luciferázové metody bylo využito 5 μ l supernatantu ze vzorků a 45 μ l Tris/EDTA pufru, které byly naneseny na černou 96-jamkovou destičku určenou pro tento účel. Na destičku bylo též duplicitně naneseno 50 μ l roztoků pro sestavení kalibrační křivky připravené podle rozpisu. Luciferáza byla opatrně rozpuštěna v 10 ml redestilované vody a do každé jamky destičky bylo multikanálovou pipetou co nejrychleji napipetováno 50 μ l tohoto roztoku, aby se zajistily stejné podmínky pro měření. Destička byla vložena do luminometru a následně byly vyhodnoceny výsledky.

4.3.3. Experimenty s hepatocyty

Izolace jater

Játra byla získána společně s izolací dospělců *H. contortus*. Po porážce zvířete byla játra vyjmuta, propláchnuta vychlazeným roztokem EuroColins, uložena na led do chladícího boxu a transportována do laboratoře.

Příprava destičky pro inkubaci

Pro inkubaci hepatocytů byly využity 96-jamkové destičky potažené kolagenem. Potahování destiček kolagenem bylo prováděno v laminárním boxu pro zajištění sterilního prostředí. Nejprve byl naředěn zásobní roztok kolagenu (4 g/l) v poměru 1:9 sterilní 0,1% kyselinou octovou. Přepipetováním tohoto roztoku pomocí multikanálové pipety z jedné jamky do druhé bylo zajištěno potažení jamek. Destičky se nechaly v laminárním boxu oschnout.

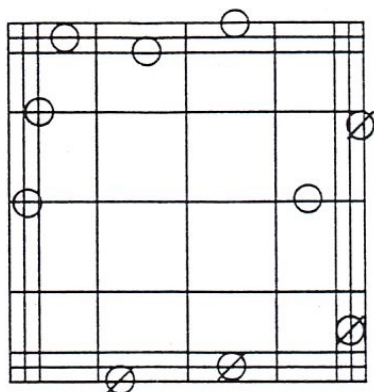
Izolace a inkubace hepatocytů

Malý kus jater byl přenesen do Büchnerovy nálevky umístěné nad odpadní nádobou, kde byla prováděna perfuze jater postupnou a opakovanou kanylací všech jaterních cév pomocí perfuzního roztoku A (roztok bez vápníku vzdušněný pneumoxidem) zahřátého na teplotu 37°C po dobu 5-10 minut až do odkrvení jater. Následně byla játra promývána roztokem B_k (roztok s kolagenasou a vápníkem) zahřátým na 37°C po dobu 5-7 minut do dostatečného natrávení jaterní tkáně pomocí kolagenasy. Játra byla přemístěna do skleněné misky umístěné v ledové lázni, bylo přidáno médium B_v (roztok s vápníkem a albuminem, bez kolagenasy) a pomocí prstů byly hepatocyty vymyty z jater do média. Suspenze hepatocytů a zbytků jaterní tkáně byla zfiltrována přes nylonové sítko a filtrát byl nalit do vychlazených centrifugačních kyvet o objemu 50 ml. Suspenze byla zcentrifugována za chlazení (4°C) při 40 g po dobu 5 minut (centrifuga Eppendorf). Supernatant byl slit a byla provedena resuspendace ve vychlazeném roztoku C (s vápníkem). Promývání roztokem C bylo opakováno celkem třikrát. Po posledním stočení byly hepatocyty přeneseny do laminárního boxu, kde byl supernatant slit a peleta byla resuspendována zpětným pipetováním ve vychlazeném sterilním živném médiu ISOM (bez inulinu, bez FBS) a opět centrifugována. Supernatant byl poté opět slit a peleta byla resuspendována v živném médiu ISOM (bez inulinu, bez FBS). Pro stanovení životaschopnosti buněk bylo použito barvení trypanovou modří a jejich koncentrace byla spočítána v Bürkerově komůrce (viz obr. 21). K suspenzi bylo poté přidáno FBS a byla zředěna živným médiem na koncentraci 0,8-1,10⁶ všech hepatocytů/ml. Výsledná koncentrace FBS byla 10%. Pro

experimenty byly použity pouze suspenze s životností více jak 75%. Tato konečná suspenze byla za neustálého míchání nanášena pomocí multikanálové pipety na kolagenem potaženou mikrotitrační destičku s plochým dnem (50 μ l/jamku). Hepatocyty byly poté preinkubovány při 37°C v atmosféře 5% CO₂ po dobu 4 hod aby došlo k jejich uchycení na destičku. Po preinkubaci bylo do každé jamky přidáno 50 μ l čerstvého média s obsahem sertralinu nebo ivermektinu nebo albendazolu o různých koncentracích. Do dvou sloupců mikrotitrační destičky nebyl roztok sertralinu nanášen. První sloupec představoval kontrolní vzorky, kdy bylo k hepatocytům napipetováno médium s obsahem rozpouštědla (DMSO, který byl využit pro přípravu zásobních roztoků). Koncentrace DMSO v kontrolních vzorcích byla 0,1%. Druhý sloupec představoval negativní kontrolu, kdy bylo k hepatocytům napipetováno médium s obsahem 10% DMSO pro zajištění usmrcení všech buněk. Hepatocyty poté byly inkubovány v CO₂ inkubátoru při 37°C a 5% CO₂ po dobu 24 hodin.

Stanovení počtu hepatocytů v suspenzi

Suspenze hepatocytů získaná v předchozím kroku byla naředěna 1:1 trypanovou modří (30 μ l buněčné suspenze + 30 μ l trypanové modří) a důkladně promíchána. Tato naředěná suspenze byla nanášena do každé poloviny Bürkerovy komůrky. Pod mikroskopem byly spočteny buňky ležící uvnitř deseti malých čtverců komůrky včetně těch buněk, které se dotýkaly horního a levého rozhraní jednotlivých čtverců. Buňky na dolním a pravém rozhraní se nepočítaly (viz obr. 17).



Obr. 17. Čtverec Bürkerovy komůrky, délka strany 1 mm. Počítají se buňky uvnitř malého čtverce a na horním a levém mezihraní (O), buňky na dolním a pravém mezihraní (Ø) se nepočítají.

Koncentrace buněk v naředěné suspenzi pak byla vypočtena dle vzorce:

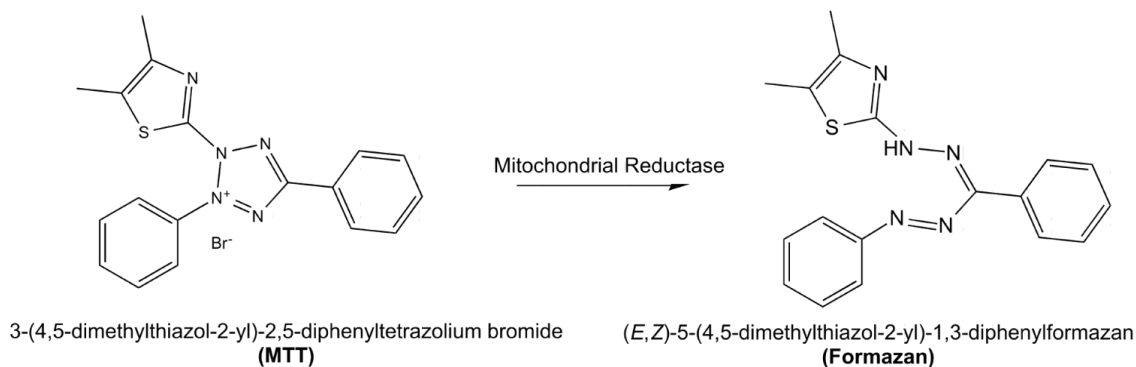
$$C = \bar{x} \cdot 2 \cdot 16 \cdot 10^4$$

Kde C je počet buněk v 1 ml neředěné suspenze, \bar{x} je průměrný počet buněk v 1 malém čtverci, 2 je zředění, 16 je přepočítání na velký čtverec (tj. 0,1 μ l) a 10^4 je přepočítání na 1 ml.

Test cytotoxicity MTT

Princip metody

Mitochondriální dehydrogenasy živých buněk přeměňují žlutý, ve vodě rozpustný substrát MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) na fialový, ve vodě nerozpustný produkt formazan (viz obr. 18). Množství přítomného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk a je zjištěno měřením absorbance.



Obr. 18. Princip MTT metody: Pomocí mitochondriálních reduktáz živých buněk dochází k přeměně MTT na formazan, jeho množství se stanoví pomocí absorbance (převzato z Grant, 2014, cit. 2021-03-13).

Provedení testu

Po skončení inkubace byl proveden vlastní MTT test. Roztok MTT předehřátý na 37°C byl pipetován k hepatocytům v médiu na mikrotitrační destičce (25 μ l/jamku) včetně kontrolních vzorků. Hepatocyty byly inkubovány spolu s MTT roztokem v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂ po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubace bylo médium opatrně odpipetováno a bylo přidáno 50 μ l lyzačního roztoku (0,08 M HCl-isopropanol) do každé jamky. Destičky byly inkubovány v thermomixeru po dobu 30min (700 RPM, 37°C) do úplné lýzy buněk. Následně byla změřena absorbance na přístroji Tecan při 570 nm a 690 nm. Životnost hepatocytů inkubovaných se sertralinem, ivermektinem a albendazolem byla vyjádřena jako % absorbance, kdy absorbance kontroly představovala 100%.

4.3.4. Extrakce sertralinu a jeho metabolitů ze vzorku

Ke vzorkům dospělců *H. contortus* byla přidána jedna odměrka zirkonových kuliček. Vzorky byly doplněny redestilovanou vodou na objem 1 ml a následně byly homogenizovány pomocí kuličkového homogenizéru FastPrep24 (30 s, 6 m/s, 1 cyklus). Mezi jednotlivými cykly byly vzorky dány na led. Po homogenizaci bylo 900 µl vzorku přeneseno do 5ml mikrozkušavky. Ke vzorku bylo přidáno 3,4 µl interního standardu (D3-SRT) a 1,8 µl ethanolu a byl promíchán na třepačce. Poté se přidaly 3 ml ethylacetátu. Zkušavky se zalepily parafilmem a třepaly se 1 hodinu na třepačce. Následně byly centrifugovány (centrifuga Eppendorf, 3000 rpm). Ze zkušavek bylo pomocí pipety opatrně odebráno 2,7 ml supernatantu a doplněno 2,7 ml nového ethylacetátu s opětovným třepáním po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby bylo znovu opatrně odebráno 2,7 ml supernatantu, který byl přidán k předchozímu supernatantu. Odebraný supernatant (celkem 5,4 ml) byl přenesen do vialky a odpařen do sucha při teplotě 30 °C a uchován při 4°C. Těsně před měřením byly vzorky rozpuštěny ve 100 µl 30% acetonitrilu a přefiltrovány.

4.3.5. Analýza metabolitů sertralinu

Identifikace metabolitů sertralinu

Pro identifikaci metabolitů byla nejprve použita metoda UHPLC-HRMS (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením „Ultra High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry“).

Parametry metody

Kapalinový chromatograf: Dionex Ultimate 3000 UHPLC

MS detektor: Q Exactive Plus Orbitrap

Kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1x150mm, 1.8 µm, Agilent, Santa Clara, California, USA)

Teplota kolony: 40 °C

Průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min

Nástřik: 2 µl

Čas analýzy: 22,5 min

Rozlišení pro sběr hmotnostních spekter: 140 000 (rozsah hmot 105-1000 m/z)

Rozlišení pro fragmentaci: 70 000 (rozsah hmot 60-700 m/z , kolizní energie 30)

Retenční časy: Sertralin (SRT): 12,1

Deuterovaný sertralin (D3-SRT): 12,1

Hydroxylovaný sertralin (SRT-OH): 10,4 a 11,8

Složení mobilní fáze:

- A: redestilovaná voda s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí
- B: 100% acetonitril s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí

Gradient mobilní fáze dle následující tabulky:

Tab. 6. Gradient mobilní fáze při UHPLC-HRMS

Čas (min)	A %	B %
1	95	5
15	0	100
17	0	100
21.5	95	5
22.5	95	5

Nastavení MS detektoru

Typ iontového zdroje: ESI (ionizace elektrosprejem) – pozitivní mód

Parametry iontového zdroje:

- Napětí: 3,5 kV
- Teplota kapiláry: 262,5°C
- Průtok rozprašovacího plynu: 2,5 (arb. unit)
- Průtok sušícího plynu: 12,5 (arb. unit)

Semikvantifikace a potvrzení identifikovaných metabolitů

Po identifikaci metabolitů pomocí přesné hmoty a stanovení MRM (multiple reaction monitoring) přechodů byly další vzorky změřeny metodou UHPLC-MS. Během tohoto měření byl potvrzen výsledek předchozího měření a kvantifikováno množství metabolitu u jednotlivých kmenů.

Parametry metody:

Kapalinový chromatograf: Shimadzu Nexera

MS detektor: Shimadzu LC-MS 8030

Kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1x150 mm, 1.8 µm, Agilent, Santa Clara, California, USA)

Teplota kolony: 40 °C

Průtok mobilní fáze: 0,4 ml/min

Nástřik: 2 µl

Čas analýzy: 7,5 min

Retenční časy:

- Sertralin (SRT): 2,6
- Deuterovaný sertralin (D3-SRT): 2,6
- Hydroxylovaný sertralin (SRT-OH): 1,9 a 2,1

Složení mobilní fáze:

- A: redestilovaná voda s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí
- B: 100% acetonitril s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí

Gradient mobilní fáze dle následující tabulky:

Tab. 7. Gradient mobilní fáze při UHPLC-MS

ČAS (MIN)	A %	B %
0	70	30
3	35	65
3.30	0	100
5	0	100
6.30	70	30
7.50	70	30

Nastavení MS detektoru

Typ iontového zdroje: ESI (ionizace elektrosprejem) – pozitivní mód

Parametry iontového zdroje:

- Napětí: 4,5 kV
- Teplota kapiláry: 250°C
- Průtok rozprašovacího plynu: 2,5 (arb. unit)
- Průtok sušícího plynu: 13 (arb. unit)

Tab. 8. Nastavení MRM přechodů pro jednotlivé analyty

SRT		2,2 – 3,0 min			
Prekursor <i>m/z</i>	Produkt <i>m/z</i>	Dwell time (msec)	Q1 Pro bias (V)	CE	Q3 Pro bias (V)
305,80	158,85	40,0	-11,0	-25,0	-30,0
305,80	274,90	40,0	-11,0	-13,0	-19,0
305,80	129,00	40,0	-16,0	-27,0	-27,0

D3-SRT		2,2 – 3,0 min			
Prekursor <i>m/z</i>	Produkt <i>m/z</i>	Dwell time (msec)	Q1 Pro bias (V)	CE	Q3 Pro bias (V)
309,30	274,90	40,0	-12,0	-14,0	-30,0
309,30	158,85	40,0	-11,0	-28,0	-28,0
309,30	129,00	40,0	-13,0	-28,0	-25,0

SRT-OH		1,0 – 2,5 min	
Prekurzor <i>m/z</i>	Produkt <i>m/z</i>	Dwell time (msec)	CE
322,00	238,00	134,0	-23,0
322,00	273,00	134,0	-23,0

4.3.6. Stanovení bílkoviny pomocí BCA assay

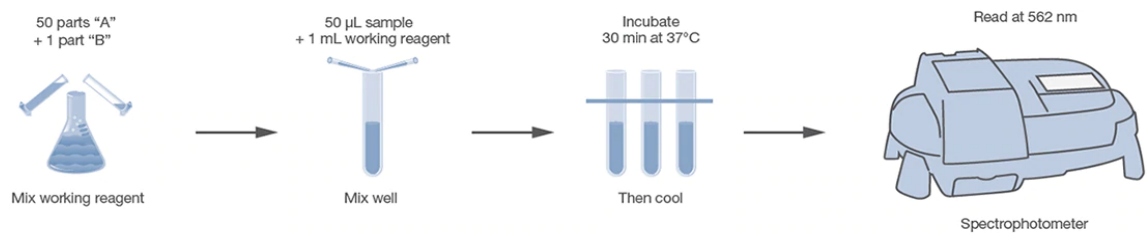
BCA Protein Assay je populární metoda pro kolorimetrickou detekci a kvantifikaci celkového proteinu. Principem jsou dvě po sobě následující reakce, kdy nejprve dochází k redukci Cu^{2+} na Cu^+ proteinem v alkalickém prostředí (biuretová reakce), kterou následuje vysoce citlivá a selektivní kolorimetrická detekce měďnatého kationtu (Cu^+) kyselinou bicinchoninovou (BCA). (*Thermo Fisher Scientific*, n.d., cit. 2021-01-10)

Vlastní provedení

Zbytky vzorků, které byly použity pro extrakci sertralinu a jeho metabolitů, byly odpařeny do sucha při teplotě 45°C v koncentrátoru. Následně bylo přidáno 100 μl 5M NaOH a vzorek se inkuboval v přístroji Thermomixer při teplotě 37°C a rychlosti třepání 800 rpm po dobu 30 minut tak, aby se bílkovina rozpustila. Poté byl vzorek zvortexován a inkubován dalších 30 minut. Následně bylo přidáno 900 μl vody a vzorek byl buď zmrazen (-20°C), nebo byl ihned použit pro měření bílkoviny.

Na 96-jamkovou GAMA destičku byla napipetována 4 paralelní měření jednotlivých koncentrací kalibrační křivky. Jednalo se o 10 μl bílkoviny ze zkumavek 1-6 s obsahem bílkovin 0-1000 μg a 200 μl pracovního roztoku C. Při výpočtu byl použit průměr těchto 4 měření. U vzorků bylo napipetováno 10 μl vzorku bílkoviny a 200 μl pracovního roztoku C. Vzorky byly pipetovány v duplikátech a při výpočtu byl použit průměr těchto 2 měření. Pro přidání pracovního roztoku C byla použita multikanálová pipeta.

Následně probíhala inkubace v přístroji Thermomixer při teplotě 37°C a rychlosti třepání 300 rpm po dobu 30 minut a poté byla u vzorků změřena absorbance pomocí přístroje při 562 nm (Tecan). Celý postup je znázorněn na obr. 19. Výsledky byly vyhodnoceny na základě porovnání koncentrace bílkovin ve vzorku proti kalibrační křivce.



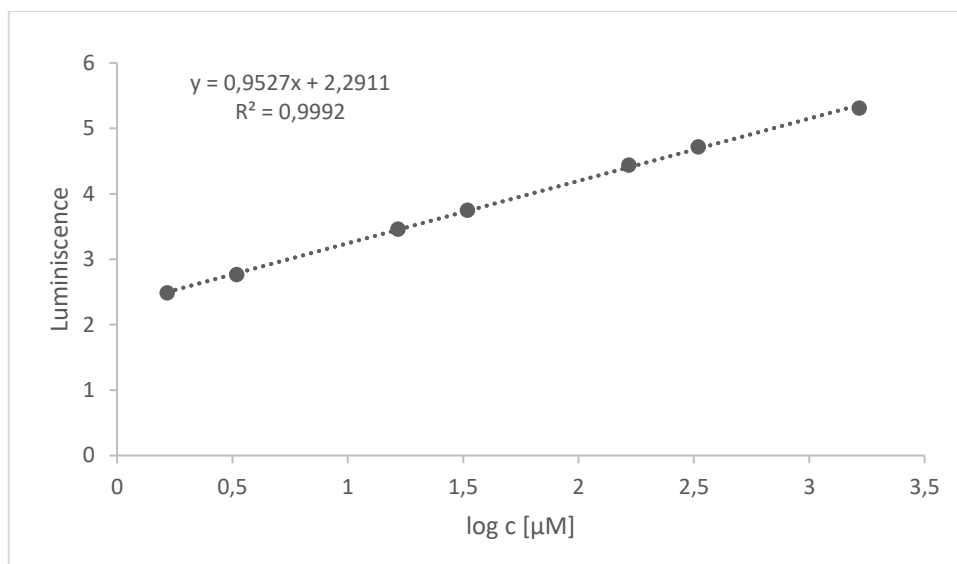
Obr. 19. Schéma provedení BCA assay: Nejprve se smísí roztoky A a B za vzniku pracovního roztoku C, dále se tento pracovní roztok napipetuje ke vzorkům a inkubuje se při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Následně se měří absorbance pomocí spektrofotometru při 562 nm. Pozn.: vzorky byly naneseny na mikrotitrační destičku (převzato z *Thermo Fisher Scientific*, n.d., cit. 2021-01-10).

5. Výsledky

5.1. Vliv sertralinu na hladinu ATP u *H. contortus*

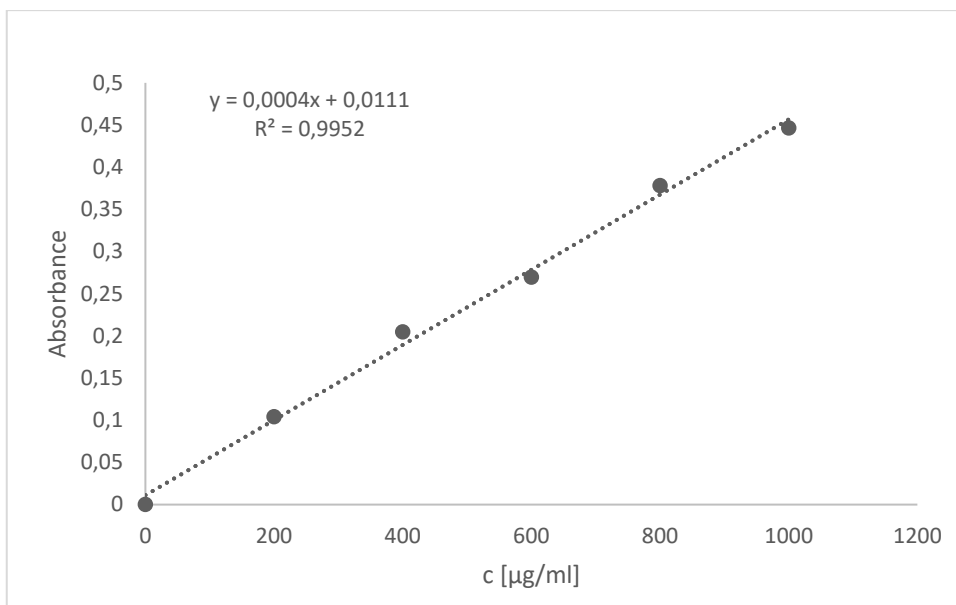
Pro zjištění vlivu sertralinu na viabilitu dospělců *H. contortus* byla využita metoda stanovení množství ATP. Tato metoda umožňuje kvantifikaci životaschopných buněk/organismů na základě přítomnosti ATP, který je nezbytný pro správnou funkci všech živých buněk. Naopak poškození buněk či smrt organismu vede k rychlému poklesu cytoplazmatického ATP (BMG LABTECH, n.d., cit. 2021-01-10).

Koncentrace ATP u jednotlivých vzorků byla zjištěna z kalibrační křivky (viz obr. 20) .



Obr. 20. Kalibrační křivka pro stanovení ATP u kmene ISE – samice.

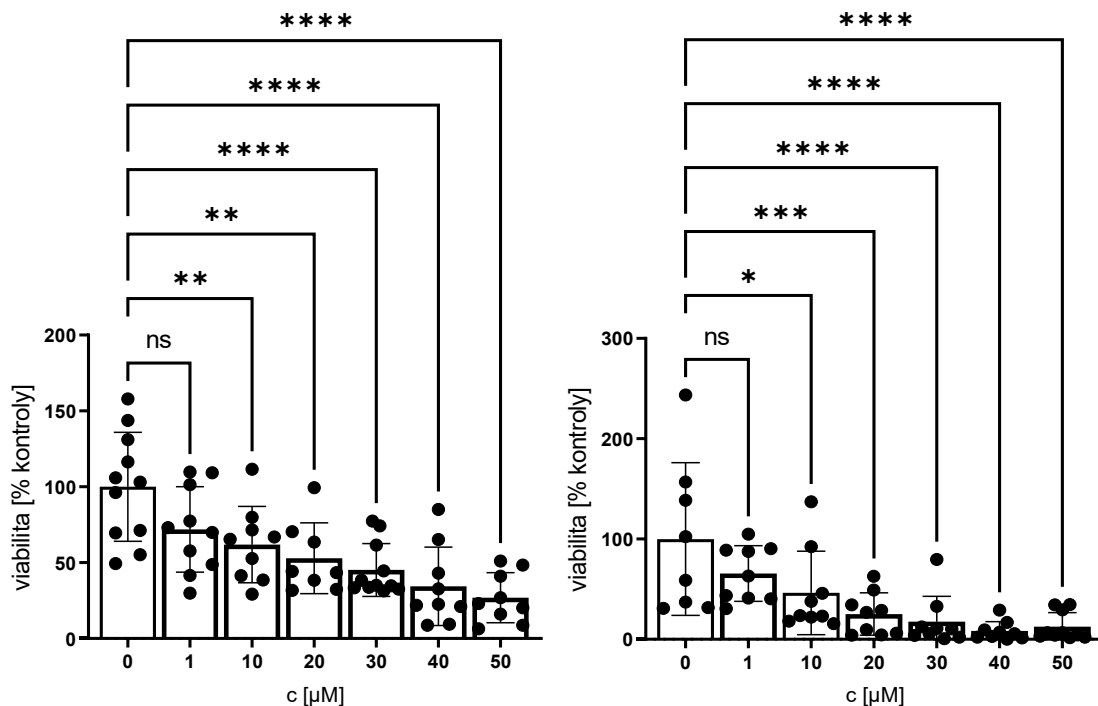
Poté byla koncentrace ATP normalizována na μg celkového proteinu, aby se vyloučily rozdíly ve velikosti obou pohlaví, ale také u jednotlivých červů navzájem. Množství přítomného proteinu bylo zjištěno pomocí BCA stanovení. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla po odpaření rozpouštědla a následné úpravě (viz výše) zjištěna z kalibrační křivky (viz obr. 21) .



Obr. 21. Kalibrační křivka pro stanovení BCA u kmene ISE – samice.

Výsledná viabilita dospělců *H. contortus*, jejíž výpočet vychází ze stanovené hladiny ATP, je vyjádřená v procentech, kde 100% představuje absorbance kontrolních vzorků, ve kterých se nacházeli červi, kteří nebyli se sertralinem inkubováni. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka. Každý bod reprezentuje hodnotu ATP v 1 samici nebo ve 2 samcích. Data byla získána ze dvou nezávislých experimentů a byla podrobena statistické analýze „One-way ANOVA“ a „Dunnett's multiple comparisons test“ v programu GraphPad Prism (9.1.0).

Z výsledků uvedených na obr. 22 je patrné, že ani u samic ani u samců kmene ISE inkubovaných se sertralinem v koncentraci 1 μ M nebyl zjištěn signifikantní pokles v hladině ATP oproti kontrolním vzorkům. Vyšší koncentrace sertralinu však signifikantně ATP u *H. contortus* snižovaly. Viabilita červů se se zvyšující koncentrací sertralinu postupně snižovala, přičemž u samců byl pokles patrnější než u samic. Mezi jednotlivými vzorky je však patrná značná variabilita.

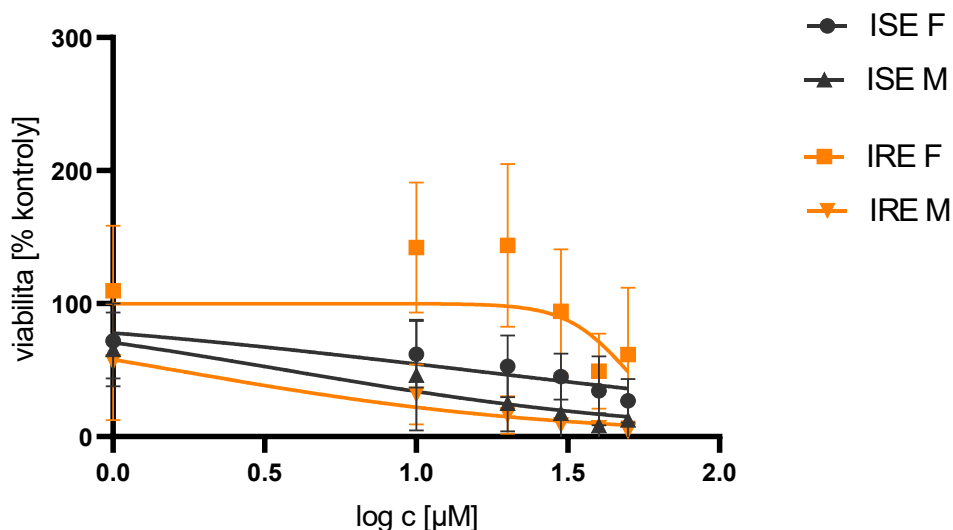


Obr. 22. Viabilita dospělčů *H. contortus* inkubovaných se sertralinem u kmene ISE – samice (vlevo) a ISE – samci (vpravo).

Na obr. 23 můžeme vidět srovnání viability po inkubaci s různými koncentracemi sertralinu u samic a samců kmenů ISE a IRE. Průměrné hodnoty naznačují, že samice kmene IRE mají vyšší viabilitu, než je tomu u kmene ISE. Vzhledem ke značným odchylkám však tento rozdíl mezi jednotlivými kmeny nelze hodnotit jako signifikantní. U obou kmenů je však patrný rozdíl mezi viabilitou u samců a samic, kdy u samců byly naměřeny nižší hodnoty ATP, což je zřejmě spojeno s vyšší citlivostí vůči sertralinu. Tento jev je vidět i v tab. 9, kde jsou srovnány hodnoty IC 50 u samic a samců obou kmenů.

Tab. 9. Srovnání IC 50 (mikromolární) u samců (M) a samic (F) kmenů ISE a IRE

	ISE F	ISE M	IRE F	IRE M
IC 50 (průměr)	14,79	3,716	49,4	1,596
IC 50 (rozmezí)	7,190 - 26,48	1,434 - 7,319	39,55 - 91,91	0,6995 - 2,880



Obr. 23. Srovnání závislosti viability samců (M) a samic (F) kmenů ISE a IRE *H. contortus* na koncentraci sertralinu.

5.2. Metabolismus sertralinu u *H. contortus*

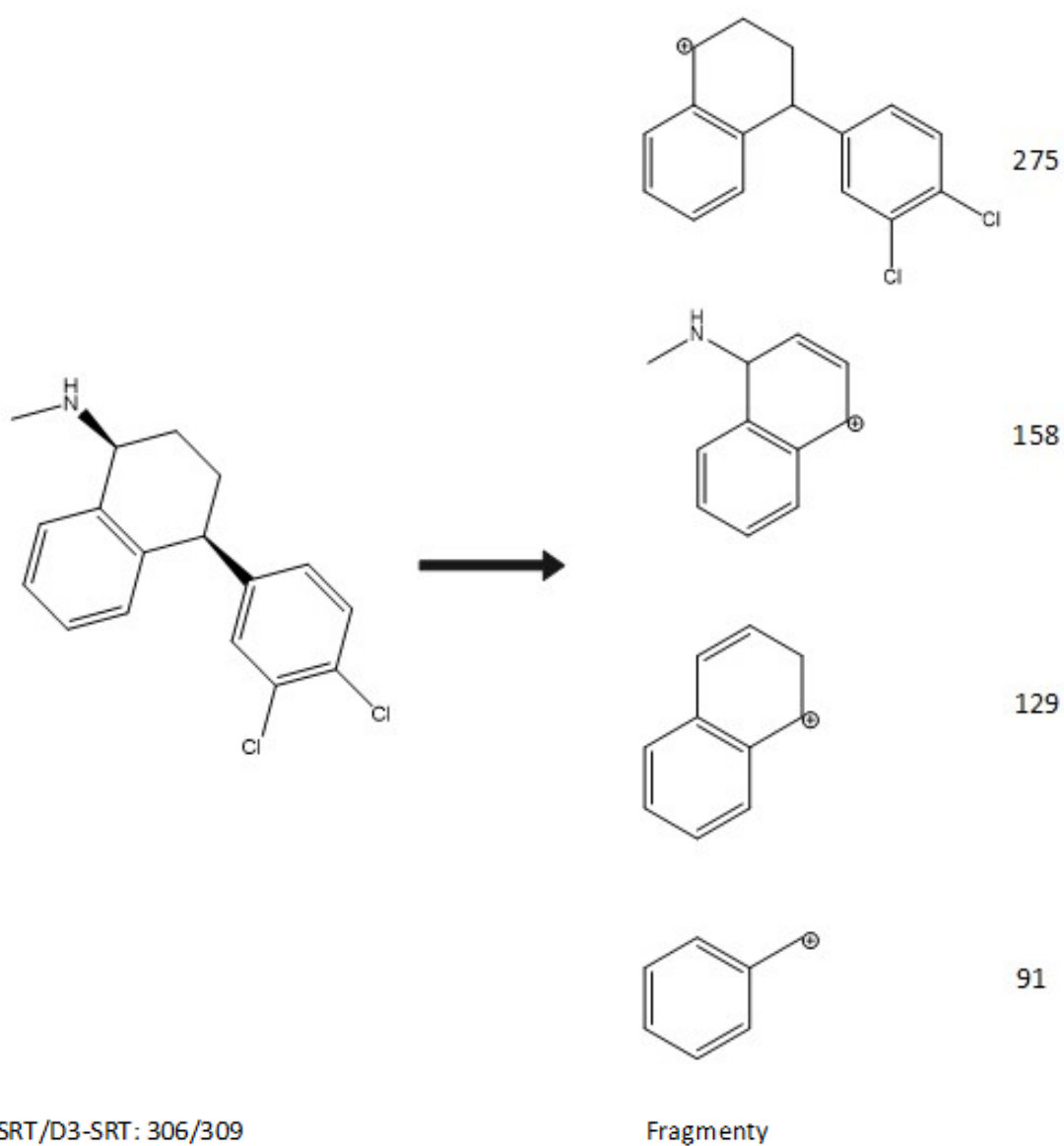
Pro zjištění osudu sertralinu v organismu *H. contortus* byla provedena inkubace *H. contortus* se sertralinem a následná analýza pomocí LC-MS, která umožnila identifikovat vzniklé metabolity. Následně bylo provedeno srovnání množství metabolitů u jednotlivých kmenů a pohlaví.

Identifikace metabolitů sertralinu

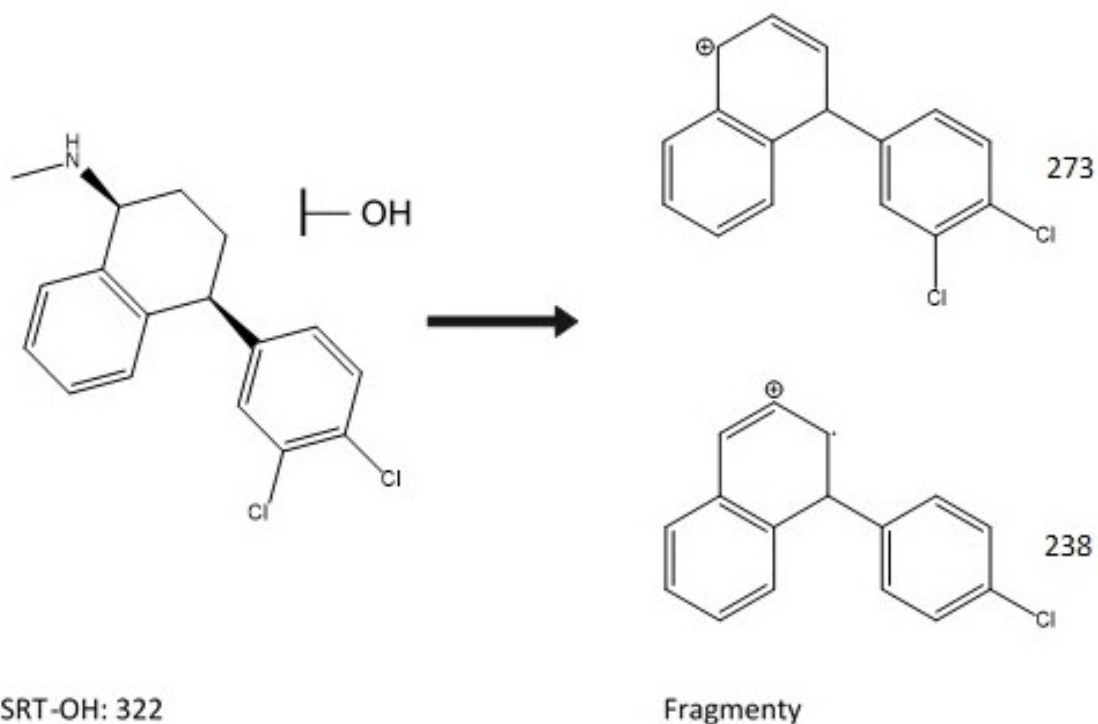
Metabolity byly identifikovány na základě přesné hmoty, fragmentačních spekter (viz tab. 10) a porovnáním vzorků inkubovaných s léčivem se slepým biologickým a slepým chemickým vzorkem. Pro stanovení přesné hmoty byla použita metoda UHPLC-HRMS. U vzorků inkubovaných s léčivem byla zaznamenána hmota m/z 322,0768. Tuto hmotu jsme na základě vzniklých fragmentů (viz obr. 24,25), které odpovídají fragmentům sertralinu (SRT), identifikovali jako hydroxylovaný sertralin (SRT-OH). Tato hmota byla zaznamenána ve dvou retenčních časech (RT) 10,44 a 11,77, z čehož lze usuzovat, že vznikají dva hydroxylované metabolity s OH skupinou navázanou na různém místě.

Tab. 10. Přesné hmoty a jejich fragmenty pro sertralin, deuteriem značený sertralin (D3-SRT) a hydroxylovaný sertralin (SRT-OH)

	RT	Hmota [M+H] ⁺ <i>m/z</i>	Fragmenty <i>m/z</i>
Sertralin	12,12	306,0810	275,0387; 158,9762; 129,0700; 91,0548
D3-SRT	12,09	309,0991	275,0394; 158,9766
SRT-OH	10,44	322,0768	273,0237; 238,0541
	11,77	322,0765	273,0231

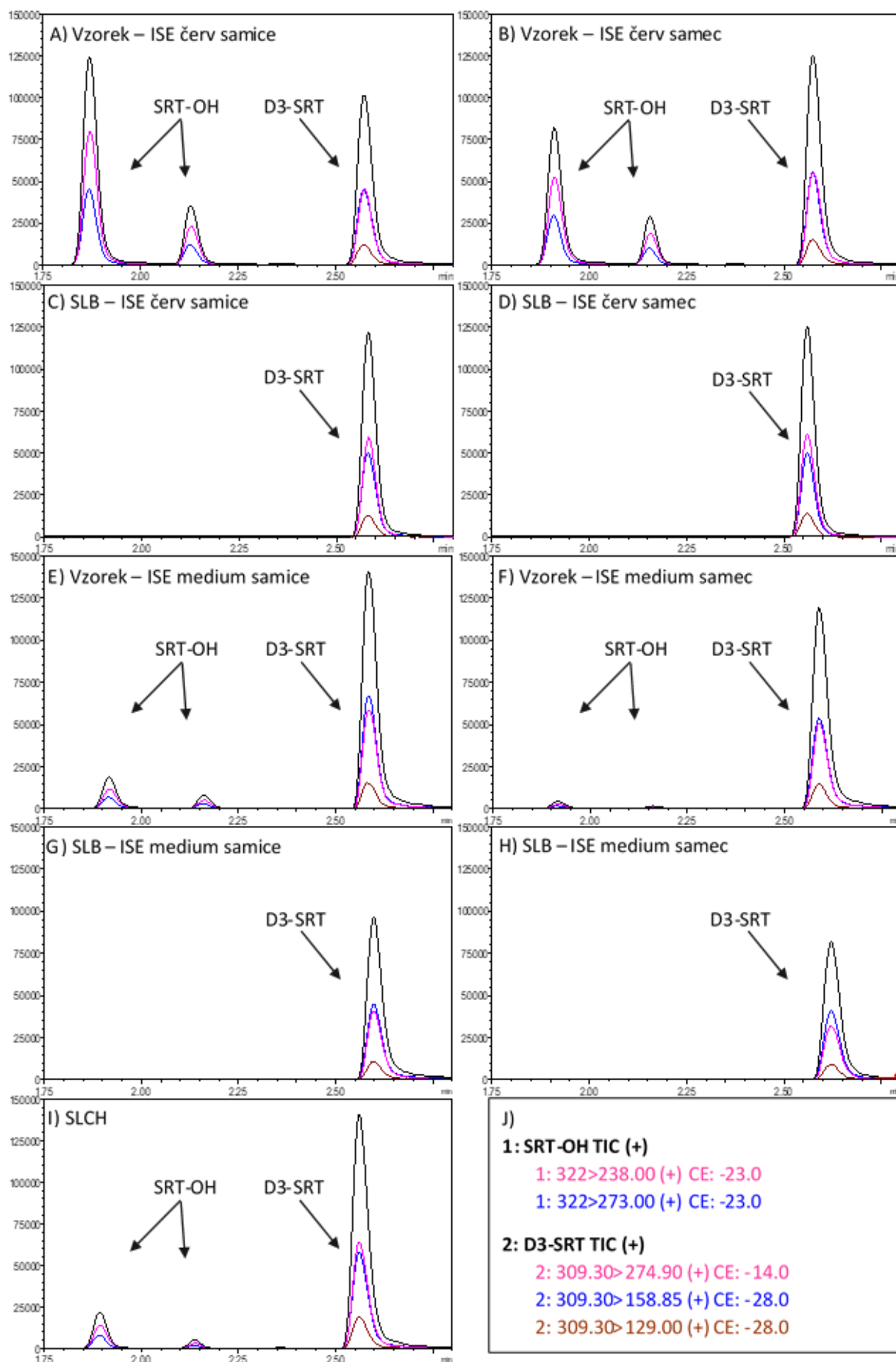


Obr. 24. Struktury odpovídající jednotlivým hmotám *m/z* sertralinu.



Obr. 25. Struktury odpovídající jednotlivým hmotám m/z hydroxylovaného sertralínu.

Po identifikaci metabolitů a stanovení MRM přechodů byly vzorky znovu měřeny metodou UHPLC-MS s použitím trojitého quadropólu jako hmotnostního analyzátoru. Reprezentativní chromatogramy vzorků z červů inkubovaných s léčivem, slepých chemických a slepých biologických vzorků jsou ukázány níže (viz obr. 26). Na chromatogramech je zobrazen časový úsek od 1,75 do 3,00 min, na kterém jsou zaznamenány vzniklé hydroxylované metabolity SRT-OH ve dvou retenčních časech 1,9 a 2,1 min. SRT-OH nebyl nalezen ve slepých biologických vzorcích. Ve slepém chemickém vzorku byl sice nalezen, ale v mnohem menším množství než ve vzorcích červů *H. contortus*. Množství SRT-OH nalezené v médiu odpovídá množství ve slepém chemickém vzorku.



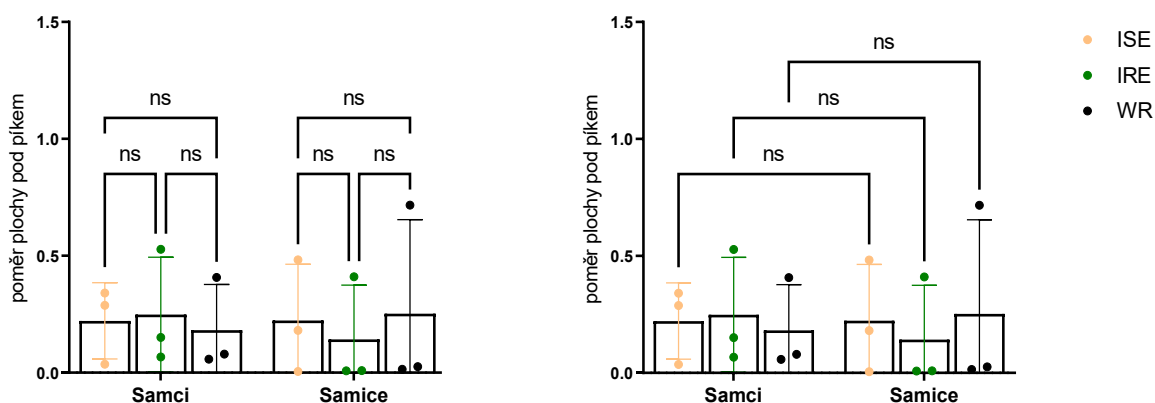
Obr. 26. Porovnání chromatogramů vzorků inkubovaných se sertralinem se slepými biologickými (SLB) a slepým chemickým vzorkem (SLCH). Na chromatogramech vidíme hydroxylované metabolity sertralinu (SRT-OH) a vnitřního standardu (D3-SRT) ve vzorcích samic (A) a samců *H. contortus* (B) kmene ISE inkubovaných se sertralinem. Tyto chromatogramy jsou porovnány se slepými biologickými vzorky samic (C) a samců (D) červů kmene ISE. Dále na chromatogramech vidíme SRT-OH a D3-SRT v médiu u samic (E) a samců (F) v porovnání se slepými biologickými vzorky média samic (G) a samců (H). SRT-OH pozorujeme také ve slepém chemickém vzorku (I). Jednotlivé barevné křivky odpovídají jednotlivým MRM přechodům (J).

Semikvantifikace vzniklého metabolitu

Pro porovnání množství vzniklého metabolitu byly použity poměry ploch pod píkem vzniklého metabolitu SRT-OH v čase 1,9 a vnitřního standardu (IS). Jako vnitřní standard byl použit deuteriem značený sertralin (D3-SRT). Poměry ploch pod píkem SRT-OH/D3-SRT ve vzorcích *H. contortus* v čase 1,9 byly porovnány mezi jednotlivými kmeny a v závislosti na pohlaví. Hodnoty byly získány měřením ze tří nezávislých experimentů. Výsledek jednotlivého experimentu byl získán průměrem ze tří paralelních vzorků.

Na základě porovnání poměrů ploch pod píkem bylo zjištěno, že rozdíly mezi jednotlivými kmeny a mezi samci a samicemi nebyly signifikantně významné (viz obr. 27).

Statistická analýza: two-way ANOVA a Tukey's multiple comparisons test v programu GraphPad Prism (9.1.0).



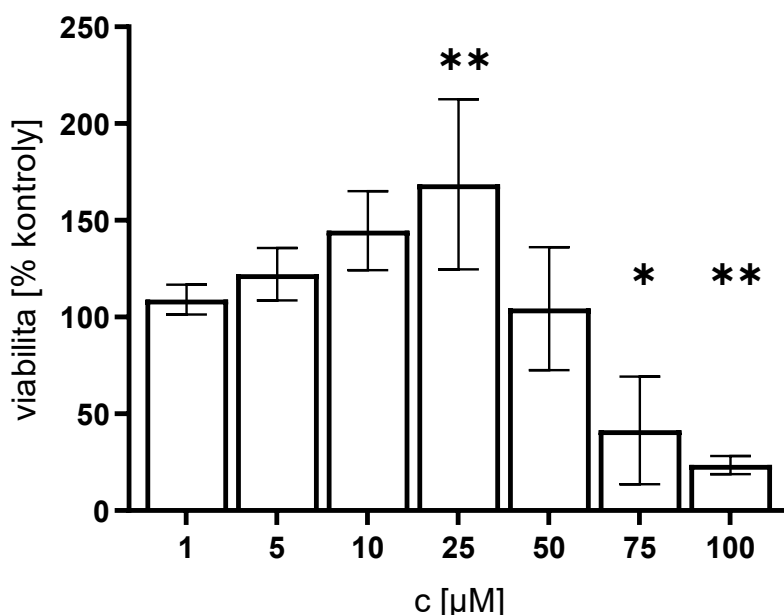
Obr. 27. Poměr plochy pod píkem SRT-OH/D3-SRT v homogenátu samců a samic různých kmenů *H. contortus*. Vlevo porovnání mezi kmeny, vpravo porovnání mezi samci a samicemi.

5.3. Vliv sertralinu, albendazolu a ivermektinu na ovčí hepatocyty

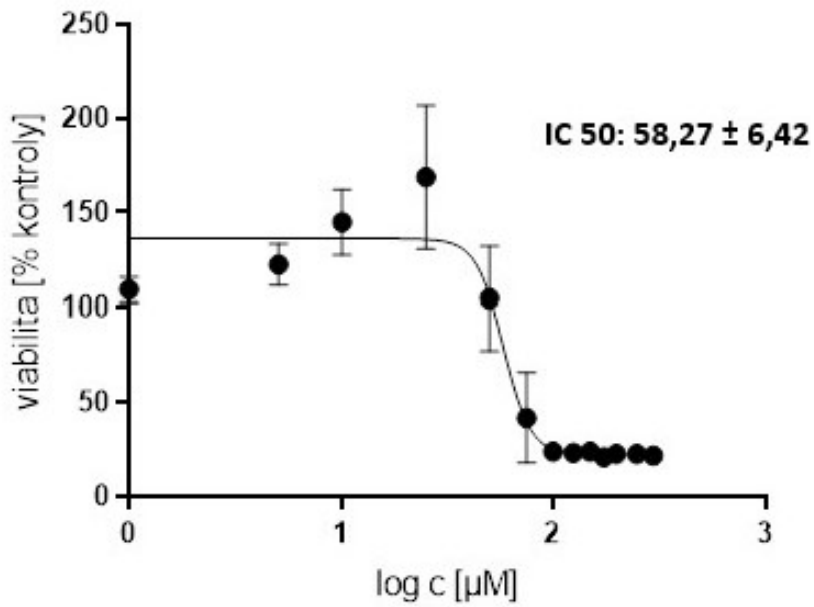
V rámci studie byly hodnoceny potenciální toxické účinky sertralinu na izolované ovčí hepatocyty ve srovnání s běžně užívanými anthelmintickými léčivy albendazolem a ivermektinem. Hepatotoxické účinky léčiv byly testovány metodou MTT (viz výše).

Výsledky jednotlivých měření jsou zobrazeny v následujících grafech (obr. 28-32). Životnost hepatocytů je vyjádřena v procentech, kde 100% představuje absorbance kontrolních hepatocytů inkubovaných v médiu bez léčiva (pouze s obsahem 0,1% DMSO). Data, která jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka, byla získána ze třech nezávislých experimentů. Výsledek jednotlivého experimentu pro každou koncentraci byl získán průměrem ze šesti paralelních jamek pro každou koncentraci. Data byla podrobena statistické analýze pomocí „One-way ANOVA“ a „Dunnett's multiple comparisons test“ v programu GraphPad Prism (9.1.0).

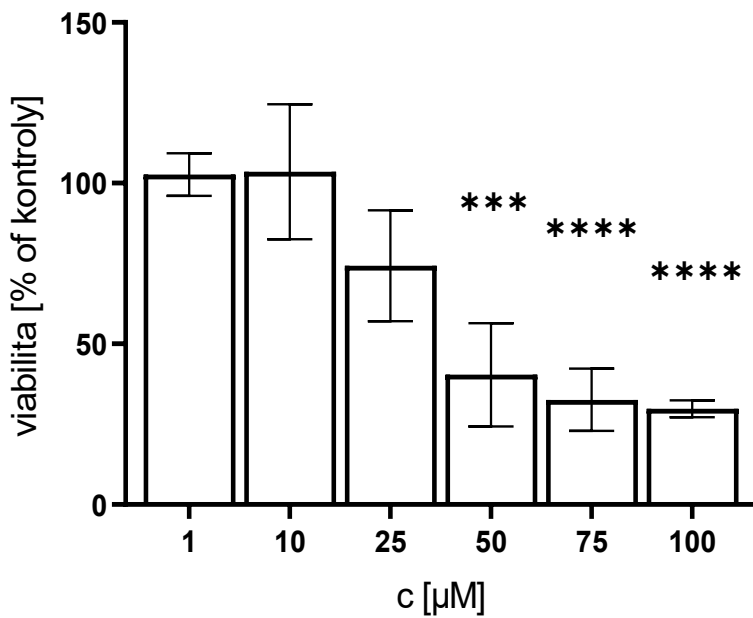
Z výsledků je patrné, že toxicitu na ovčí hepatocyty vykazuje sertralin až při koncentraci 75 μ M. Oproti tomu ivermektin začíná vykazovat jisté hepatotoxické účinky již při koncentraci 25 μ M. Albendazol byl při všech měřených koncentracích pro jaterní buňky vyhodnocen jako netoxický.



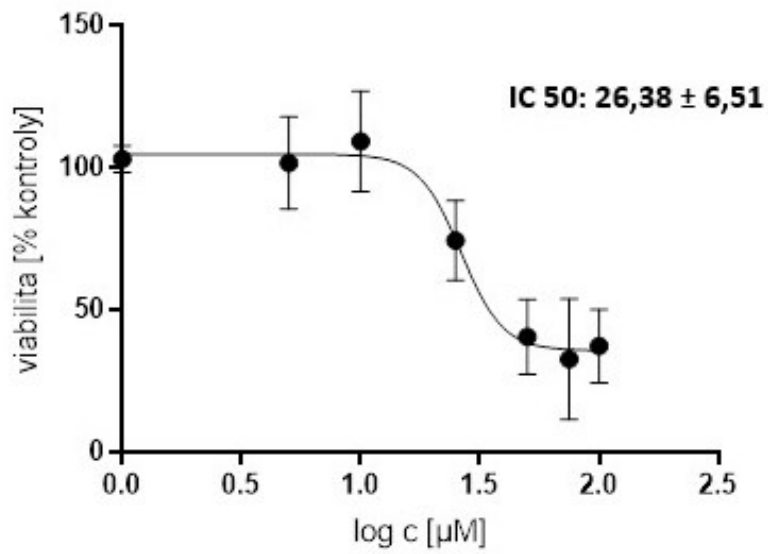
Obr. 28. Závislost životnosti ovčích hepatocytů na koncentraci sertralinu.



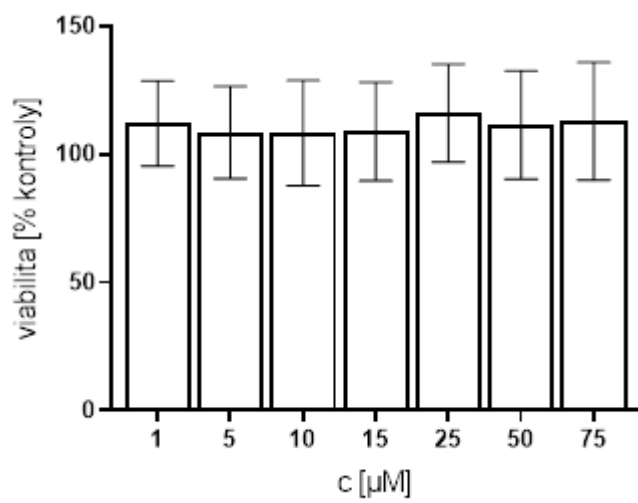
Obr. 29. Stanovení IC 50 sertralínu v ovčích hepatocytech.



Obr. 30. Závislost životnosti ovčích hepatocytů na koncentraci ivermektinu.



Obr. 31. Stanovení IC 50 ivermektinu v ovčích hepatocytech.



Obr. 32. Závislost životnosti ovčích hepatocytů na koncentraci albendazolu.

6. Diskuze

Kontrola helmintóz je jedním z velmi důležitých úkolů humánní i veterinární medicíny. V minulosti se pro kontrolu helmintóz využívala omezená paleta anthelminticky účinných léčiv, jejichž široká aplikace vedla ke vzniku anthelmintické rezistence, která výrazně snižuje naši schopnost ovlivňovat helmintózy v takovém měřítku, jako tomu bylo dříve. Vzhledem k nízké dostupnosti vhodných vakcín a narůstající rezistenci na používaná léčiva je vývoj nových anthelmintik klíčový pro dlouhodobou udržitelnost chovu hospodářských zvířat. Navzdory těmto okolnostem byla od roku 2000 zavedena do veterinární praxe pouze tři nová anthelmintika (monepantel, derquantel a emodepsid). V oblasti humánní medicíny nebyla od začátku 21. století zavedena ani jedna nová anthelmintická látka (Nixon et al., 2020). Ačkoli je na cestě k novým léčivům mnoho překážek, a oblast anthelmintik není výjimkou, je nezbytné zaměřit výzkum na léčiva s novým mechanismem účinku a současně také zavádět do praxe preventivní metody, které sníží riziko vzniku rezistence na tyto nové látky (Zajíčková et al., 2020).

Naše práce vycházela z nových zjištění publikovaných ve studii Weeks et al., 2018, která zkoumala možnosti využití již existujících léčiv pro anthelmintické účely. V této studii byly identifikovány tři potenciální anthelminticky účinné látky – sertralin, chlorpromazin a paroxetin, u kterých byl *in vitro* potvrzen účinek na *Caenorhabditis elegans*, *Trichuris muris*, *Ancylostoma caninum* a *Schistosoma mansoni*. Účinek u rezistentních kmenů *C. elegans* naznačuje, že mechanismus účinku těchto látek je odlišný od dosud zavedených anthelmintik. Pokud by léčiva byla dostatečně účinná *in vivo* a dostala se do klinické praxe, mohla by vzhledem k novému mechanismu účinku představovat velmi cenná léčiva. Jejich výhodou je také to, že díky rutinnímu užívání u lidí o nich máme k dispozici mnoho informací (Weeks et al., 2018).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala možným vlivem sertralinu na dospělce *H. contortus*. Účinnost proti tomuto parazitu nebyla studií Weeks et al., 2018 zkoumána, avšak účinek sertalinu na jiné helminty byl nadějným předpokladem možného účinku i vůči tomuto častému parazitu hospodářských zvířat.

Pro zjištění vlivu sertralinu na dospělce *H. contortus* byla využita metoda stanovení množství ATP (adenosintrifosfát). Kvantifikace životaschopných buněk/organismů je velmi důležitá, a to zejména pokud se zkoumá účinek látek regulujících růst a také cytotoxických látek. Nukleotid ATP hraje důležitou roli při výměně energie v biologických systémech. Slouží jako hlavní bezprostřední dárce energie a je přítomen ve všech metabolicky aktivních buňkách. ATP se používá jako nástroj funkční integrity živých buněk, protože všechny buňky vyžadují, aby ATP

zůstal přítomen a vykonával svou specializovanou funkci. Většina ATP se nachází v živých buňkách a spojuje katabolické a anabolické procesy. Poranění buněk nebo vyčerpání kyslíku/substrátu vede k rychlému poklesu cytoplazmatického ATP. Měření ATP je proto zásadní pro studium živých procesů. Pro stanovení ATP bylo použito mnoho metod, ale nejspěšnější technikou je bioluminiscenční metoda kvůli své citlivosti a širokému dynamickému rozsahu. Bioluminiscence ATP je používána pro stanovení hladin ATP v řadě různých typů buněk (*BMG LABTECH*, n.d., cit. 2021-01-10).

Koncentrace ATP byla normalizována na množství celkového proteinu, aby se vyloučily rozdíly ve velikosti obou pohlaví, ale také u jednotlivých červů navzájem. Množství přítomného proteinu bylo zjištěno pomocí BCA stanovení, což je populární metoda pro kolorimetrickou detekci a kvantifikaci celkového proteinu. Stanovení bílkovin pomocí Pierce BCA metody kombinuje známou redukci Cu^{2+} na Cu^+ proteinem v alkalickém prostředí (také známá jako biuretová reakce) s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí měďnatého kationtu (Cu^+) kyselinou bicinchoninovou (BCA). Jednotlivé aminokyseliny a dipeptidy nejsou biuretovou reakcí ovlivněny, ale tripeptidy a větší polypeptidy nebo proteiny budou reagovat za vzniku světle modrého až fialového komplexu, který absorbuje světlo při 540 nm. Jednou z hlavních výhod testu BCA je, že vytváří lineární křivku, která umožňuje přesné stanovení neznámých koncentrací proteinu a poskytuje vyšší dynamický rozsah než jiné standardní testy. Další výhodou je to, že je jen velmi málo ovlivněna rozdíly ve složení bílkovin. Proteiny se liší svým složením a strukturou a při některých testech vedou rozdíly proteinů v aminokyselinové sekvenci, izoelektrickém bodě (pI), sekundární struktuře a postranních řetězcích nebo protetických skupinách k variacím v kolorimetrické odezvě. BCA stanovení umožňuje vysokou přesnost při určování koncentrace bílkovin pro neznámé vzorky (*Thermo Fisher Scientific*, n.d., cit. 2021-01-10).

Při nejnižších koncentracích sertralinu nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi jedinci inkubovanými se sertralinem a jedinci, kteří představovali kontrolní vzorky. Vyšší koncentrace sertralinu však způsobovaly signifikantní pokles ATP. Viabilita se se zvyšující koncentrací sertralinu postupně snižovala, přičemž u samců byl pokles patrnější než u samic. Mezi jednotlivými vzorky byly však patrné značné rozdíly, a to především při nižších koncentracích. Je to patrně způsobeno vysokou interindividuílní variabilitou v odpovědi na stresové stavy, kdy někteří jedinci mohou pravděpodobně na stres reagovat mechanismy, které poté vedou ke zvýšení hladiny ATP. Pro stabilizaci těchto pochodů, a tím pádem i snížení vlivu na výsledné koncentrace ATP, byli červi inkubováni na rozdíl od hepatocytů delší dobu (48 hodin).

Průměrná hodnota IC 50 naznačuje, že samice kmene IRE jsou vůči sertralinu méně citlivé, než je tomu u kmene ISE. Naopak samci z kmene IRE byli více citliví než samci z kmene ISE. Vzhledem ke značným směrodatným odchylkám není tento rozdíl mezi jednotlivými kmeny signifikantní. U obou kmenů je však patrný rozdíl mezi viabilitou u samců a samic inkubovaných se sertralinem, kdy u samců docházelo vlivem sertralinu k výraznějšímu poklesu ATP, což naznačuje vyšší citlivost samců vůči sertralinu.

Při studiu metabolismu sertralinu u *H. contortus* pomocí LC-MS byly nalezeny dva hydroxylované metabolity sertralinu (SRT-OH) s retenčními časy 10,4 a 11,8. Semikvantifikací vzniklých metabolitů a následným porovnáním metabolismu u samic a samců bylo zjištěno, že rozdíly v metabolismu nebyly signifikantní, a to u žádného ze zkoumaných kmenů. Toto zjištění se liší od výsledků studie Stuchlíková et al., 2018, kde samičky byly v metabolismu xenobiotik, konkrétně pak některých benzimidazolových anthelmintik (albendazolu, rikobendazolu a flubendazolu), mnohem aktivnější a vytvářely i metabolity, které nebyly u samců zaznamenány.

Většina sertralinu pak nebyla vůbec metabolizována a zůstala v nezměněné formě. V již zmíněné studii Stuchlíková et al., 2018, bylo rovněž zaznamenáno velké množství nezemetabolizovaného léčiva. U rikobendazolu tento podíl průměrně dosahoval hodnot přes 80%, u běžněji užívaného albendazolu byly hodnoty nižší (Stuchlíková et al., 2018). Další často používané léčivo – ivermektin – naopak *H. contortus* na rozdíl od svého hostitele není schopen metabolizovat vůbec (Vokrál et al., 2013).

Pro možné budoucí použití sertralinu v klinické praxi je pak pozitivní zprávou, že rozdíly v jeho metabolismu mezi jednotlivými kmeny nejsou signifikantní. Pokud by *in vivo* citlivost skutečně odpovídala tomuto *in vitro* hodnocení, mohl by být sertralin využit i u rezistentních IRE a WR kmenů.

Vzhledem k tomu, že jsou i na poměrně nedávno zavedený monepantel popsány poměrně četné rezistence, bylo by vhodné u jakékoli nově zaváděné anthelmintické látky rovněž aplikovat od počátku jejího podávání preventivní opatření proti vzniku rezistence. (Mederos et al., 2014)

Hlavní nevýhodou při hledání látek s antimikrobiální nebo antiparazitární účinností v rámci již užívaných léčiv (DR) je skutečnost, že tyto indikace většinou vyžadují mnohem vyšší dávkování, než které bylo zkoumáno během toxicitních studií a tyto studie je proto nutné zopakovat pro vyšší dávky (Zajíčková et al., 2020).

Každé antiparazitární léčivo, které má být užíváno ať už u člověka nebo u zvířete, musí vykazovat dostatečný účinek proti přítomným parazitům, ale současně nesmí výrazně škodit jejich hostiteli. Jedním z cílů této práce proto bylo zjistit toxické účinky sertralinu na hepatocyty ovcí, které jsou typickým hostitelem *H. contortus*. Vzhledem ke své nezastupitelné funkci při odbourávání xenobiotik představují jaterní buňky jeden z hlavních cílů systémové toxicity léčiv, a proto jsou patrně nejrozšířenějším *in vitro* modelem pro studium toxicity různých látek (Vinken & Hengstler, 2018).

Hepatotoxické účinky léčiv byly testovány metodou MTT, jejíž principem je přeměna MTT pomocí enzymů živých buněk na fialový formazan, jehož množství je přímo úměrné počtu živých buněk a zjišťuje se měřením absorbance (viz výše) (Grant, 2014). MTT je metoda, jejíž hlavní výhodou je jednoduchost, rychlost provedení a reprodukovatelnost výsledků. Naopak nevýhodou je skutečnost, že účinky léčiv mohou vést ke změnám v mitochondriální aktivitě, což může ovlivnit výsledky (Winikoff et al., 2005).

Sertralin v naší studii vykazoval hepatotoxické účinky až při koncentraci 75 μM . Těchto koncentrací by ale v játrech ovce neměl vzhledem k naměřeným hodnotám toxicity vůči *H. contortus* dosahovat. Můžeme tedy říct, že v dávkách postačujících pro jeho antiparazitární účinky, by měl být vůči jaterním buňkám bezpečný. Při koncentracích nižších než 75 μM byly dokonce patrné určité hepatoprotektivní účinky, kdy zjištěná viabilita hepatocytů byla i o několik desítek procent vyšší než u kontrolních vzorků.

Ani u lidí sertralin v drtivé většině případů nevykazuje hepatotoxické účinky. Případy poškození jater při užívání sertralinu u lidí byly popsány, ale jsou velmi vzácné (Tabak et al., 2009).

Hepatotoxicita sertralinu byla také porovnávána s běžně používanými anthelmintickými léčivy ivermektinem a albendazolem. U ivermektinu byla zjištěna hepatotoxicita již při koncentracích vyšších než 25 μM . Této koncentrace ale není u zvířat ani u lidí v běžných terapeutických dávkách zdaleka dosaženo. Při běžně užívaných dávkách 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ činí plazmatická koncentrace u ovcí po s.c. podání průměrně pouhých 26 ng/ml (tj. 30 nM), po perorálním podání je ještě nižší (González Canga et al., 2009). U člověka pak byla při dávce 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o. naměřena plazmatická koncentrace 53 ng/ml (tj. 61 nM) (Baraka et al., 1996). U lidí jsou případy závažné hepatotoxicity po podání ivermektinu ojedinělé, mírné zvýšení jaterních enzymů se však může vyskytnout. (Veit et al., 2006).

Albendazol se v tomto srovnání ukázal k hepatocytům jako zcela bezpečný ve všech měřených koncentracích. To odpovídá i studii provedené Ceballos et al., 2013, kdy nebyla u ovcí pozorována hepatotoxicita ani při jeho dlouhodobějším podávání.

Ačkoli by podle našeho zjištění neměl sertralin negativně ovlivňovat hepatocyty, vzhledem k jeho účinku u lidí je třeba objasnit jeho potenciální neurologické nežádoucí účinky. Tento účinek však musí být zhodnocen *in vivo* (Zajíčková et al., 2020).

7. Závěry

V rámci studia možného použití sertralinu v léčbě hemonchózy, nemoci malých přežvýkavců způsobené gastrointestinální parazitickou hlísticí vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*), bylo zjištěno, že:

- Sertralin v mikromolárních koncentracích signifiktně snižuje viabilitu (hladinu ATP) dospělců *H. contortus*. Se zvyšující se koncentrací sertralinu se viabilita dospělců postupně snižovala. Samci jsou výrazně citlivější vůči sertralinu než samice.
- Dospělci *H. contortus* metabolizují sertralin hydroxylací. Mezi citlivým a rezistentním kmenem *H. contortus* nebyly zjištěny kvalitativní ani kvantitativní rozdíly v metabolismu sertralinu. Většina parentního léčiva zůstala nemetabolizována.
- Sertralin v koncentraci nižší než 75 μM nevykazuje toxicitu vůči hepatocytům ovce domácí (*Ovis aries*) – hostitele *H. contortus*.

Seznam použitých zkratk

ABC	ATP binding cassette (ATP vázající kazeta)
AKR	aldo-keto reduktázy
AMP	adenosinemonophosphate (adenosinmonofosfát)
AVM	Avermektiny
ATP	adenosinetriphosphate (adenosin trifosfát)
BCA	bicinchonic acid (bicinchonová kyselina)
CYP	cytochrom P450
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
D3-SRT	deuterovaný sertralin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
EHT	egg hatch test (test líhnutí vajíček)
ESI	electrospray ionization (izonizace elektrosprejem)
F	samice (<i>H. contortus</i>)
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
FECRT	faecal egg count reduction test (test redukce počtu vajíček ve stolici)
FWEC	faecal worm egg count (počet vajíček ve stolici)
GABA	gama-amino-butyric acid (gamaaminomáselná kyselina)
GluCl	glutamátové receptory spojené s chloridovými kanály
GST	glutathion S-transferáza
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IRE	inbred resistant Edinburgh kmen <i>H. contortus</i> (kmen <i>H. contortus</i> rezistentní na benzimidazoly)
ISE	inbred susceptible Edinburgh kmen <i>H. contortus</i> (kmen <i>H. contortus</i> citlivý na anthelmintika)
ISOM	Směs médií (1:1) Ham F12 a William's E
LDT	larval development test (test vývoje larev)
LMT	larval motility test (test pohyblivosti larev)
M	samec (<i>H. contortus</i>)

MDR1	multidrug resistance transporter (transportér pro mnohočetnou lékovou rezistenci)
MRM	multiple reaction monitoring (monitorování více reakcí)
MRP	multidrug resistance-associated proteins (protein spojený s rezistencí na více léčiv)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyyl tetrazolium bromid
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
Pen/Strep	penicilin/streptomycin
P-gp	P-glykoprotein
Ppi	inorganic pyrophosphate (anorganický pyrofosfát)
RE4	resistant Edinburgh (benzimidazol rezistentní kmen získaný z kmene SE)
SDR	short-chain dehydrogenases/reductases (reduktázy/dehydrogenázy s krátkým řetězcem)
SE	sensitive Edinburgh (benzimidazol citlivý kmen <i>H. contortus</i> z Edinburghu)
SLB	slepý biologický vzorek
SLCH	slepý chemický vzorek
SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
SONOP	sonication solution (sonikační roztok)
SRT	Sertralin
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu)
TIC	total ion current (celkový iontový proud)
Tris-EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina s tris(hydroxymethyl)aminomethanem
UGT	UDP-glukuronyl transferáza
UHPLC-HRMS	Ultra High Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem)
UHPLC-MS	Ultra High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem)
WR	White river (multirezistentní kmen <i>H. contortus</i>)
XME	xenobiotic metabolizing enzyme (xenobiotika metabolizující enzym)

Zdroje

- Aronson, J. K., & Green, A. R. (2020). Me-too pharmaceutical products: History, definitions, examples, and relevance to drug shortages and essential medicines lists. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *86*(11), 2114–2122. <https://doi.org/10.1111/bcp.14327>
- Arsenopoulos, K. V., Fthenakis, G. C., Katsarou, E. I., & Papadopoulos, E. (2021). Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. *Animals*, *11*(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ani11020363>
- Baraka, O. Z., Mahmoud, B. M., Marschke, C. K., Geary, T. G., Homeida, M. M. A., & Williams, J. F. (1996). Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *50*(5), 407–410. <https://doi.org/10.1007/s002280050131>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016a). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, *93*, 181–238. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016b). The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, *93*, 95–143. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>
- BMG LABTECH. (n.d.). [Cit. 2021-01-10]. <https://www.bmglabtech.com/the-use-of-an-atp-bioluminescence-assay-to-quantify-cell-cytotoxicity/>
- Broder, S. (2010). The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Research*, *85*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.002>
- Can, N., Çevik, U. A., Sağlık, B. N., Özkay, Y., Atlı, Ö., Baysal, M., Özkay, Ü. D., & Can, Ö. D. (2017). Pharmacological and Toxicological Screening of Novel Benzimidazole-Morpholine Derivatives as Dual-Acting Inhibitors. *Molecules*, *22*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081374>
- Ceballos, L., Virkel, G., Elissondo, C., Canton, C., Canevari, J., Murno, G., Denegri, G., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2013). A pharmacology-based comparison of the activity of albendazole and flubendazole against *Echinococcus granulosus* metacestode in sheep. *Acta Tropica*, *127*(3), 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.05.004>

- Chartier, C., Pors, I., & Benoit, C. (1995). *Efficacy of pyrantel tartrate against experimental infections with Haemonchus contortus, Teladorsagia circumcincta and Trichostrongylus colubriformis in goats.*
- ChemSrc. (2021). [Cit. 2021-03-11]. https://www.chemsrc.com/en/cas/16595-80-5_960926.html
- Cvilink, V., Lamka, J., & Skálová, L. (2009). Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), 8–26.
<https://doi.org/10.1080/03602530802602880>
- Danaher, M., Radeck, W., Kolar, L., Keegan, J., & Cerkvénik-Flajs, V. (2012). Recent Developments in the Analysis of Avermectin and Milbemycin Residues in Food Safety and the Environment. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6).
<https://doi.org/10.2174/138920112800399068>
- Dobšíková, R., Šíroková, Z., & Blahová, J. (2012). *Farmakologie v produkci potravin pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-617-9.
- Doležal, M. (2013). *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2382-5.
- Freeman, A. S., Nghiem, C., Li, J., Ashton, F. T., Guerrero, J., Shoop, W. L., & Schad, G. A. (2003). Amphidial structure of ivermectin-resistant and susceptible laboratory and field strains of *Haemonchus contortus*. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 110).
- Furtado, L. F. V., de Paiva Bello, A. C. P., & Rabelo, É. M. L. (2016). Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. In *Acta Tropica* (Vol. 162, pp. 95–102). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021>
- González Canga, A., Sahagún Prieto, A. M., José Díez Liébana, M., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Veterinary Journal*, 179(1), 25–37.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.011>
- Grant, R. (2014). *Wikipedia - MTT Assay*. [Cit. 2021-03-13].
https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay
- Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C., & Dallemagne, P. (2020). Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(9), 1145–1151.

<https://doi.org/10.1111/jphp.13273>

- Juárez-López, D., & Schcolnik-Cabrera, A. (2020). Drug Repurposing: Considerations to Surpass While Re-directing Old Compounds for New Treatments. In *Archives of Medical Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.021>
- Kellerová, P., Matoušková, P., Lamka, J., Vokřál, I., Szotáková, B., Zajíčková, M., Pasák, M., & Skálová, L. (2019). Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in *Haemonchus contortus* female and male adults. *Veterinary Parasitology*, 273(July), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.07.006>
- Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 31, Issue 4, pp. 336–345). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00131-X)
- Kořínková, K. (2006). *Obecná parazitologie: význam a biologie parazitů*. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta. ISBN 80–7044-798–2.
- Kotze, A. C., & McClure, S. J. (2001). *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro. *International Journal for Parasitology*, 31(14), 1563–1571. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00303-4)
- Kotze, A. C., & Prichard, R. K. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. *Advances in Parasitology*, 93, 397–428. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>
- 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*. *International Journal for Parasitology*, 45(4), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.12.001>
- Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I. J., Beech, R. N., Redman, E., Holroyd, N., Bartley, D. J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M., Jackson, F., Johnston, S. L., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A. A., ... Cotton, J. A. (2013). The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r88>
- Lam, N. S., Long, X., Su, X. zhuan, & Lu, F. (2018). Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis. *Pharmacological Research*, 133(April), 77–100. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.025>

- Lamka, J., & Ducháček, L. (2014). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2790-8.
- Laštůvka, Z. (1996). *Zoologie pro zemědělce a lesníky*. Brno: Konvoj. ISBN 80-85615-50-9.
- Li, Y. Y., & Jones, S. J. M. (2012). Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Medicine*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/gm326>
- Machen, R., Craddock, F., Craig, T., & Fuchs, T. (1998). A *Haemonchus contortus* Management Plan for Sheep and Goats in Texas. *Texas Agrilife Extension*. <http://abga.org/wp-content/uploads/2016/01/Parasites-haemonchus-contortus.pdf>
- Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., & Skálová, L. (2016). The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, 32(6), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>
- McCracken, R. O., & Stillwell, W. H. (1991). A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 21(1), 99–104. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90125-Q](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90125-Q)
- Mederos, A. E., Ramos, Z., & Banchemo, G. E. (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0598-z>
- Mravčáková, D., Váradyová, Z., Kopčáková, A., Čobanová, K., Grešáková, L., Kišidayová, S., Babják, M., Dolinská, M. U., Dvorožňáková, E., Vadlejch, J., Cieslak, A., Ślusarczyk, S., & Várady, M. (2019). *Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep*. 2, 1–13.
- Murdoch, D., & McTavish, D. (1992). Sertraline. *Drugs*, 44(4). <https://doi.org/10.2165/00003495-199244040-00007>
- NCBI Taxonomy Browser. (n.d.). [Cit. 2021-02-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Nisbet, A. J., Meeusen, E. N., González, J. F., & Piedrafita, D. M. (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Advances in Parasitology*, 93, 353–396. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.011>
- Nixon, S. A., Welz, C., Woods, D. J., Costa-Junior, L., Zamanian, M., & Martin, R. J. (2020). Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new

- anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14(July), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.07.001>
- Oliveira, R. N., Corrêa, S. A. P., Vieira, K. M., Mendes, T., Allegretti, S. M., & Miguel, D. C. (2019). Correction to: In vitro schistosomicidal activity of tamoxifen and its effectiveness in a murine model of schistosomiasis at a single dose (*Parasitology Research*, (2019), 10.1007/s00436-019-06259-0). *Parasitology Research*, 1625–1631. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06290-1>
- Panic, G., Duthaler, U., Speich, B., & Keiser, J. (2014). Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 185–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.07.002>
- Parkinson, A., Ogilvie, B., Buckley, D., Kazmi, F., Czerwinski, M., & Parkinson, O. (2015). *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 3rd Edition; Chapter 6: Biotransformation of Xenobiotics*. The McGraw-Hill Companies. ISBN 978-0-07-184708-7.
- Petrova, E. (2014). *Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development* (pp. 19–81). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7801-0_2
- Preziosi, P., & Heart, S. (2007). 2.06 Drug Development. 173–202.
- Prichard, R. K. (2001). Genetic diversity in *Haemonchus contortus* and other nematodes. In *TRENDS in Parasitology* (Vol. 17, Issue 9). <http://parasites.trends.com446>
- Riou, M., Guégnard, F., Le Vern, Y., & Kerboeuf, D. (2003). Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: Effects on resistance to anthelmintics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), 180–187. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg332>
- Roberts, L. S., Schmidt, G. D., & Janovy, J. (2009). *Foundations of Parasitology, 8th Edition*. The McGraw-Hill Companies. ISBN 978-0-07-302827-9.
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants. A Turning Point? In *Advances in Parasitology* (1st ed., Vol. 83). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407705-8.00004-5>
- Ryšavý, B. (1989). *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN 80-04-20864-9.

- Sedlák, E. (2005). *Zoologie bezobratlých*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2892-0.
- Skálová, L. (2017). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3733-4.
- Skálová, L., & Boušová, I. (2011). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1917-0.
- Speich, B., Ame, S. M., Ali, S. M., Alles, R., Huwyler, J., Hattendorf, J., Utzinger, J., Albonico, M., & Keiser, J. (2014). Oxantel Pamoate–Albendazole for *Trichuris trichiura* Infection. *New England Journal of Medicine*, 370(7), 610–620. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1301956>
- Stasiuk, S. J., MacNevin, G., Workentine, M. L., Gray, D., Redman, E., Bartley, D., Morrison, A., Sharma, N., Colwell, D., Ro, D. K., & Gilleard, J. S. (2019). Similarities and differences in the biotransformation and transcriptomic responses of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus* to five different benzimidazole drugs. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11(September), 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.09.001>
- Stear, M. J., Doligalska, M., & Donskow-Schmelter, K. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. In *Parasitology* (Vol. 134, Issue 2, pp. 139–151). <https://doi.org/10.1017/S0031182006001557>
- Stuchlíková, L. R., Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Sečkařová, A., Dimunová, D., Nguyen, L. T., Várady, M., & Skálová, L. (2018). Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>
- Tabak, F., Gunduz, F., Tahan, V., Tabak, O., & Ozaras, R. (2009). Sertraline Hepatotoxicity: Report of a Case and Review of the Literature. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(7). <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0524-3>
- Taylor, M. A., Hunt, K. R., & Goodyear, K. L. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103(3), 183–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00604-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00604-5)
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). [Cit. 2021-01-10]. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays->

analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html

- Veit, O., Beck, B., Steuerwald, M., & Hatz, C. (2006). First case of ivermectin-induced severe hepatitis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *100*(8), 795–797. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.003>
- Veterian Key*. (2017). [Cit. 2021-01-03]. <https://veteriankey.com/antiparasitic-agents/#fig16-3>
- Vinken, M., & Hengstler, J. G. (2018). Characterization of hepatocyte-based in vitro systems for reliable toxicity testing. *Archives of Toxicology*, *92*(10), 2981–2986. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2297-6>
- Vokřál, I., Jedličková, V., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Skálová, L., Lamka, J., Holčapek, M., & Szotáková, B. (2013). The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology*, *140*(3), 361–367. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001680>
- Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN 80-04-20864-9.
- Waller, P. J. (2005). *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. In *Tropical Biomedicine* (Vol. 22, Issue 2). <https://www.researchgate.net/publication/6904034>
- Weeks, J. C., Roberts, W. M., Leasure, C., Suzuki, B. M., Robinson, K. J., Currey, H., Wangchuk, P., Eichenberger, R. M., Saxton, A. D., Bird, T. D., Kraemer, B. C., Loukas, A., Hawdon, J. M., Caffrey, C. R., & Liachko, N. F. (2018). Sertraline, Paroxetine, and Chlorpromazine Are Rapidly Acting Anthelmintic Drugs Capable of Clinical Repurposing. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18457-w>
- Whittaker, J. H., Carlson, S. A., Jones, D. E., & Brewer, M. T. (2017). Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *40*(2), 105–115. <https://doi.org/10.1111/jvp.12330>
- Winikoff, S. E., Zeh, H. J., DeMarco, R., & Lotze, M. T. (2005). Cytolytic Assays. In *Measuring Immunity*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012455900-4/50291-9>
- Zajíčková, M., Nguyen, L. T., Skálová, L., Raisová Stuchlíková, L., & Matoušková, P. (2020). Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. In *Drug Discovery Today* (Vol. 25, Issue 2, pp. 430–437). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>