

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Testování účinnosti a toxicity nových potenciálních anthelmintik OMK3 a OMK4

Bc. Barbora Žáková

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024

Poděkování

Tímto bych chtěla moc poděkovat své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D za její neskutečnou vlídnost, trpělivost a užitečné rady při tvorbě této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat mým konzultantům Mgr. Josefu Krátkému a PharmDr. Thuy Linh Nguyen, Ph.D. za jejich vedení během experimentální části této práce. Nakonec chci poděkovat své rodině, přítelovi a přátelům za jejich podporu po dobu mého studia.

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

V Hradci Králové 12.5.2024

Bc. Barbora Žáková

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Haemonchus contortus	10
2.1.1 Taxonomie	10
2.1.2 Epidemiologie	10
2.1.3 Morfologie	12
2.1.4 Vývojový cyklus	13
2.1.5 Hypobióza	14
2.1.6 Infekce a symptomy	15
2.1.7 Diagnóza	16
2.1.8 Prevence a terapie	16
2.1.9 Rezistence	18
2.2 Vývoj nových anthelmintik	19
2.2.1 Testování hepatotoxicity	19
2.2.2 Metody testování účinnosti anthelmintik	20
3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 Příprava larev L3 H. contortus na nakažení ovcí	25
4.1.1 Pomůcky a přístroje	25
4.1.2 Materiál a chemikálie	25
4.1.3 Metodika	25
4.2 Izolace vajíček	25
4.2.1 Pomůcky a přístroje	25
4.2.2 Materiál a chemikálie	26
4.2.3 Příprava Sheatherova flotačního roztoku	26
4.2.4 Metodika	26
4.3 Agarová metoda pro izolaci dospělců H. contortus	28

4.3.1	Pomůcky a přístroje	28
4.3.2	Materiál a chemikálie	28
4.3.3	Příprava Fyziologického roztoku F1/1 (0,9 % NaCl)	29
4.3.4	Příprava agaru.....	29
4.3.5	Metodika.....	29
4.4	Test líhnutí vajíček	30
4.4.1	Pomůcky a přístroje	30
4.4.2	Materiál a chemikálie	30
4.4.3	Metodika.....	31
4.5	Odpouzďení L3 larev <i>H. contortus</i>	31
4.5.1	Pomůcky a přístroje	31
4.5.2	Materiál a chemikálie	32
4.5.3	Příprava média Luria-Bertani.....	32
4.5.4	Metodika.....	32
4.6	Testování viability larev xL3	33
4.6.1	Pomůcky a přístroje	33
4.6.2	Materiál a chemikálie	33
4.6.3	Příprava Tris/EDTA pufru	34
4.6.4	Inkubace L3	34
4.6.5	Stanovení ATP	34
4.6.6	Stanovení bílkoviny.....	35
4.7	Test viability dospělců	36
4.7.1	Pomůcky a přístroje	36
4.7.2	Materiál a chemikálie	37
4.7.3	Příprava Tris/EDTA pufru	38
4.7.4	Příprava SONOPu	38
4.7.5	Inkubace dospělců	38
4.7.6	Stanovení ATP	38
4.7.7	Stanovení bílkoviny.....	39
4.8	Monitorování motility larev xL3 <i>H. contortus</i> pomocí mikroskopu s kamerou.....	40
4.8.1	Pomůcky a přístroje	40
4.8.2	Materiál a chemikálie	40
4.8.3	Metodika.....	40
4.9	Monitorování motility dospělců <i>H. contortus</i> pomocí kamery	41

4.9.1	Pomůcky a přístroje	41
4.9.2	Materiál a chemikálie	41
4.9.3	Příprava SONOPu	41
4.9.4	Inkubace dospělců a monitorování motility	42
4.10	Testování hepatotoxicity pomocí ultratenkých řezů z ovčích jater	42
4.10.1	Pomůcky a přístroje	42
4.10.2	Materiál a chemikálie	42
4.10.3	Příprava suplementovaného RPMI média	44
4.10.4	Metodika.....	44
5.	VÝSLEDKY.....	46
5.1	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na líhnutí vajíček.....	46
5.2	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3	48
5.3	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu dospělců.....	51
5.4	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na motilitu larev xL3	56
5.5	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na motilitu dospělců.....	57
5.6	Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu ultratenkých řezů z ovčích jater	58
6.	DISKUSE	60
7.	ZÁVĚR	63
8.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	64
9.	SEZNAM TABULEK	66
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
11.	POUŽITÁ LETERATURA.....	68

ABSTRAKT

Haemonchus contortus (vlasovka slezová) je parazitem menších přežvýkavců, hlavně ovcí a koz. Způsobuje onemocnění zvané haemonchóza, jehož hlavním příznakem je anémie, která může skončit až smrtí zvířete. Pro léčbu tohoto onemocnění se používají anthelmintika. Tato léčiva ale přestávají být účinná, protože na ně vzniká rezistence. Haemonchóza se proto stává velkým celosvětovým problémem. Z toho důvodu je nutné hledat nová anthelmintika s novým mechanismem účinku.

V této práci byly zkoumány potenciální anthelmintické účinky nových derivátů kyseliny benzhydroxamové, OMK3 a OMK4. Cílem práce bylo zjistit, jestli tyto látky mají účinek na vajíčka, larvy a dospělé *H. contortus*, porovnat jejich účinek na citlivém a rezistentním kmeni *H. contortus* a testovat jejich potenciální toxicitu na játrech ovcí. K těmto účelům byla izolována vajíčka, larvy a dospělci *H. contortus*, připraveny precizní tkáňové řezy z ovčích jater a použity testy: líhnutí vajíček, sledování motility a stanovení koncentrace ATP bioluminiscenční metodou.

Výsledky ukázaly, že deriváty OMK3 a OMK4 nemají žádný ovicidní účinek. Byl prokázán signifikantní účinek na viabilitu xL3 larev a dospělců ISE kmene *H. contortus*, naopak deriváty neměly žádný vliv na viabilitu xL3 larev WR kmene a motilitu xL3 larev ISE kmene. Deriváty také nemají toxický účinek na ovčí játra. Experimenty je však potřeba zopakovat a dodělat některé testy na WR kmeni, které nebyly provedeny z důvodu nízkého počtu získaných jedinců.

Klíčová slova: *H. contortus*, haemonchóza, OMK3 a OMK4, léčba, vývoj, testování

ABSTRACT

Haemonchus contortus is a parasite of smaller ruminants, mainly sheep and goats. It causes a disease called haemonchosis, the main symptom of which is anemia, which can lead to the death of the animal. Anthelmintics are used to treat this disease. However, these drugs have become ineffective due to resistance developing against them. Haemonchosis is thus becoming a significant global problem. Therefore, it is necessary to search for new anthelmintics with a new mechanism of action.

In this study, the potential anthelmintic effects of new derivatives of benzhydroxamic acid, OMK3 and OMK4, were investigated. The aim of this study was to determine whether these substances have an effect on eggs, larvae and adults of *H. contortus*, and to compare their effects on sensitive and resistant strains of *H. contortus* and to test their potential toxicity on sheep livers. For this purpose, eggs, larvae and adults of *H. contortus* were isolated, precision-cut liver slices from sheep were prepared, and the following tests were used: egg hatch test, monitoring of motility and determination of ATP concentration by bioluminescence method.

The result showed that derivatives OMK3 and OMK4 do not have ovicidal activity. A significant effect was observed on the viability of xL3 larvae and adults of the ISE strain of *H. contortus*; however, the derivatives had no effect on the viability of xL3 larvae of the WR strain and the motility of xL3 larvae of the ISE strain. The derivatives also do not have an effect on sheep's livers. However, the experiments need to be repeated and some tests need to be completed on the WR strain due to the low number of individuals obtained.

Key words: *H. contortus*, haemonchosis, OMK3 and OMK4, treatment, development, and testing

1. ÚVOD

Hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je parazit, který způsobuje onemocnění zvané haemonchóza. Toto onemocnění postihuje přežvýkavce (např. ovce, kozy atd.). Jelikož *H. contortus* je krev sající parazit, tak hlavním příznakem onemocnění je anémie. Zvířata dále trpí podkožními otoky zejména tzv. bottle jaw, jsou slabá, málo jí a trpí hypoproteinémií. Ovcím také vypadává vlna. Příznivými podmínkami pro vývoj a přenos vlasovky je vlhko a teplo, proto toto onemocnění můžeme nejčastěji najít v tropických a subtropických oblastech. Naneštěstí se ale vlasovka začala přizpůsobovat i chladnějšímu podnebí v Evropě, proto je čím dál větší hrozbou. Větší hrozbou je i z důvodu její častější rezistence k různým anthelmintikům. Z toho důvodu je potřeba vyvíjet nová anthelmintika nebo hledat nové alternativní způsoby ochrany jako např. vakcinace (Adduci et al., 2022; Besier et al., 2016; Carson et al., 2023; Dyk et al., 1972; Erhardová a Müller, 1953a; Jabar Jasim et al., 2023; Zajíčková et al., 2020).

Proces vývoje nového léčiva se skládá z mnoha kroků. Nejdříve se musí najít léčivo s aktivitou proti *H. contortus* a následně se měří jeho toxicita, farmakodynamické a farmakokinetické parametry. Dalším důležitým krokem je testování hepatotoxicity. Poté je potřeba stanovit účinnost potenciálních anthelmintik. Ta se stanovuje na základě testování životaschpnosti *H. contortus*. Mezi tyto testy patří např. test na snížení počtu vajíček (FECRT), test líhnutí vajíček (EHT), test vývinu larev (LDT), test motility/migrace (LMIA) a stanovení koncentrace ATP bioluminiscenční metodou (Nguyen et al., 2021; Zajíčková et al., 2020).

Diagnostika haemonchózy závisí hlavně na klinických příznacích např. podkožní edémy a anémie. Pro viditelné známky anémie byl pro diagnostiku vyvinut systém FAMACHA, který haemonchózu určuje na základě zbarvení spojivek zvířete. Dále lze prohlédnout stolici na přítomnost vajíček parazita (Besier et al., 2016; Carson et al., 2023).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Haemonchus contortus*

2.1.1 Taxonomie

Haemonchus contortus neboli vlasovka slezová způsobuje onemocnění zvané haemonchóza (Erhardová a Müller, 1953a). Hostitelem vlasovky je ovce, skot, koza, muflon, srnčí zvěř a další přežvýkavci (Dyk et al., 1972).

Vlasovku řadíme mezi cizopasně helminty z třídy hlístice (Nematoda) (Ryšavý, 1989).

Tabulka č. 1 Taxonomie

Kmen	Scolecida
Podkmen	Nemathelminthes/oblovci
Třída	Nematoda/hlístice
Podtřída	Secernentea (dříve Phasmida)
Řád	Rhabditida
Podřád	Strongylata
Čeleď	Trichostrongylidae/vlasovci
Rod	<i>Haemonchus</i>

Zdroj: (Ryšavý, 1989)

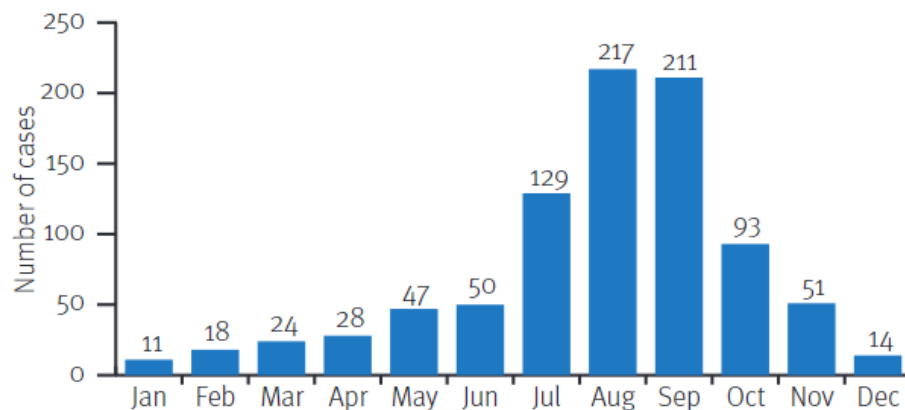
2.1.2 Epidemiologie

Vlasovka se nejčastěji nachází v oblastech tropického a subtropického pásu, díky příznivým podmínkám (teplo a vlhko) pro přežití volně žijících stádií *H. contortus*. Mezi tropické oblasti výskytu patří např. jižní Indie, střední Afrika nebo severní oblast Jižní Ameriky. Naopak mezi subtropické oblasti výskytu patří Austrálie, jižní Afrika,

Jižní Amerika nebo jižní oblast Severní Ameriky. Přes léto a na podzim jsou vhodné podmínky pro přežití larev i v Evropě (Besier et al., 2016b; Carson et al., 2023; Hoberg a Zarlenga; 2016).

Teplé počasí a následné vlhko v mírném pásmu způsobuje sezónnost výskytu haemonchózy. Vajíčka se za těchto ideálních podmínek, při minimální teplotě 10 - 11°C, rychle líhnou a infekční larvy L3 pak způsobí nákazu. K největšímu nárůstu počtu nakažených jedinců dochází v srpnu a září, jak je znázorněno v obrázku č.1. Podle výzkumu ve Velké Británii se stále častěji můžeme s hemonchózou setkat i v listopadu a prosinci (Carson et al., 2023; Emery et al., 2016).

Obrázek č. 1 Sezónnost diagnóz *Haemonchus contortus*, VIDA (Veterinary investigation data analysis) data 2002-2022



Zdroj: (Carson et al., 2023)

Vysvětlivky:

- *na ose y počty případů*
- *na ose x měsíce od ledna do prosince*

Parazit se šíří přes pastviny a vodu, která obsahuje larvy infekčního stádia. Hostitel se tedy může nakazit pozřením larev v potravě nebo pitím vody např. z kaluží (Dyk et al., 1972).

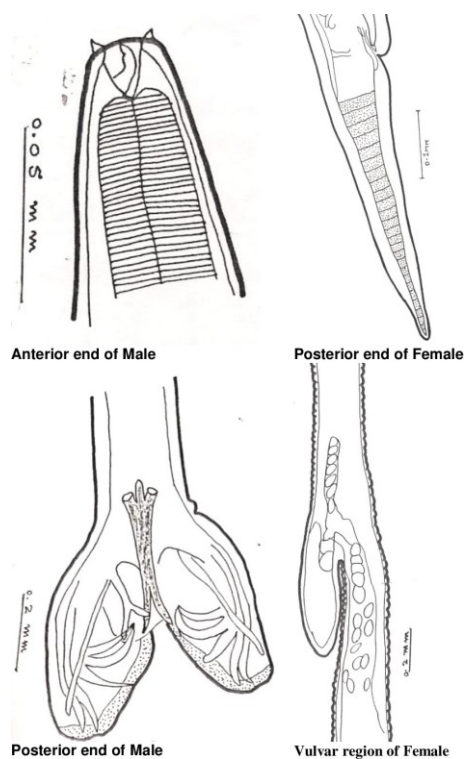
2.1.3 Morfologie

Vajíčka mají velikost 68-90 x 40-50 μm . Jejich dělením vzniká 8-16 blastomer se světlými středy (Dyk et al., 1972).

Dospělí červi jsou štíhlého podlouhlého tvaru. Nachází se ve slezu, kde jsou přísáti ke sliznici ve vysokých počtech (v řádu několika tisíc). Povrch těla mají pokrytý podélnými hřebeny tvořenými kutikulou (Erhardová et al., 1953b; Slathia et al., 2019).

Mají růžově zbarvený trávicí aparát od nasáté krve. Zažívací soustava začíná malými ústy se zubem zvaným lanceta, oesophagus je kyjovitý. Na bočních stranách cervikální oblasti se nachází dvě cervikální papuly (Dyk et al., 1972; Slathia et al., 2019).

Obrázek č. 2 Anatomie červa



Zdroj: (Mir et al., 2013)

Vysvětlivky: vlevo nahoře je obrázek předního konce samečka, vpravo nahoře zadního konce samičky, vlevo dole zadního konce samečka a poslední obrázek vpravo dole je přední konec samičky.



Obrázek č. 3 Haemonchus contortus

Zdroj: (Vokřál, 2021)

Samci jsou průměrně dlouzí okolo 12-22 mm. Přední konec mají zužující se do špičky. Ocasní konec je asymetrického tvaru burzy se třemi laloky. Dále mají samci přítomný i hřbetní lalok a dva lépe vyvinuté postranní laloky. Na jejich těle lze najít i dva bodce dlouhé asi 0,32 mm. Řitní otvor je od ocasního konce ve vzdálenosti asi 0,36 mm (Dyk et al., 1972; Slathia et al., 2019).

Samice jsou o něco delší než samci, jejich průměrná délka je okolo 18-30 mm. Zadní i přední konec mají samičky zúžený, ocasní konec navíc neobsahuje páteř. Zažívací aparát je spirálovitě obtočen bílými vaječníky. Tyto dvě soustavy (zažívací a pohlavní) prosvítají a dávají tak samičce typický vzhled. Vulva vychází na povrch ostrým zakončením asi 3-4,5mm od konce těla (Dyk et al., 1972; Erhardová et al., 1953b; Slathia et al., 2019).

2.1.4 Vývojový cyklus

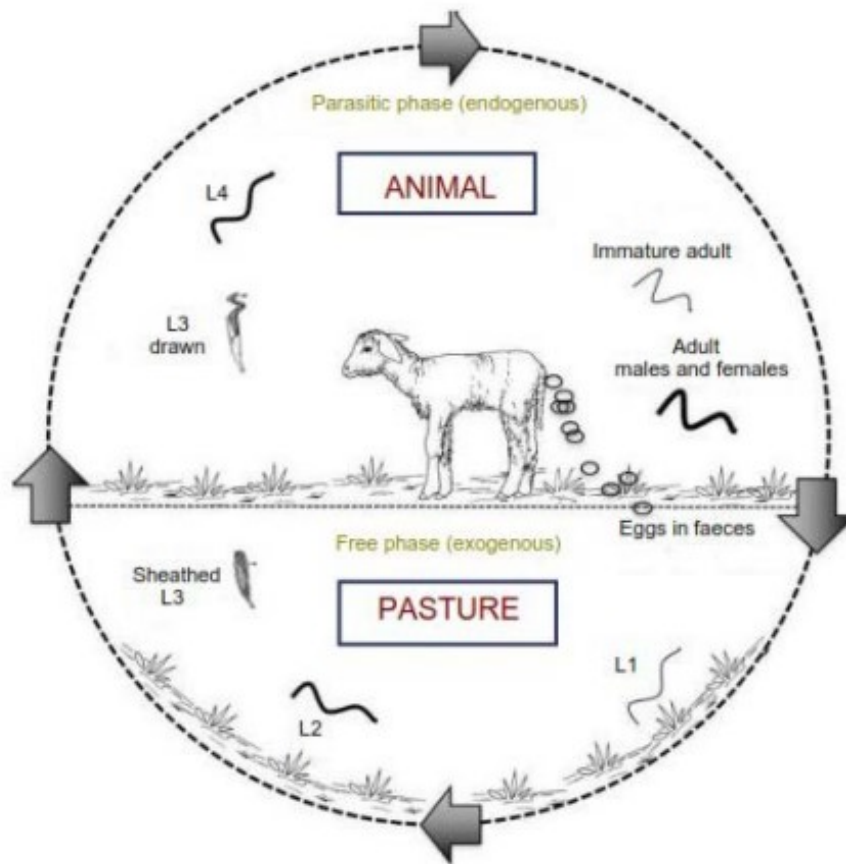
H. contortus patří mezi geohelmintry s přímým životním cyklem bez meziphostitele. Jeho hostitelem jsou přežvýkavci (Ryšavý, 1989).

Vývojový cyklus začíná naklazením vajíček samičkami ve slezu. Vajíčka vyjdou ven spolu s výkaly hostitele. Na vzduchu vajíčka rostou, zrají a do deseti hodin zárodek nabude trojnásobku své velikosti. Po dvanácti hodinách stále pokračuje vývoj, ale růst se pozastaví. Vývoj vajíčka v larvu závisí na teplotě a vlhkosti. Při 26 °C a 100% vlhkosti se vajíčko vyvine a vylíhne v larvu stádia 1 (L1) za 14-17 hodin (Ashraf a Prichard, 2014; Erhardová et al., 1953b; Ryšavý, 1989).

Larva L1 se dvakrát svléká. Po prvním svlékání vzniká larva L2 a po druhém larva L3. Třetí larvární stádium L3 je stádium invazní/infekční. Hostitel se nakazí infekčním stádiem na pastvě především po dešti, nebo když je rosa. L3 mají v těchto vlhkých podmínkách možnost pohybovat se do okolí a vzhůru po mokré trávě. Vývoj L3 stádia pokračuje v trávicím traktu hostitele. Po pohlcení hostitelem se L3 mění ve stádium L4, přes které se vlasovka slezová přeměňuje v dospělé. Dále dochází ke kopulaci a oplodnění samičky, která klade vajíčka. Samička dokáže naklást 5000-15000 vajíček denně (Ashraf a Prichard, 2014; Emery et al., 2016; Erhardová et al., 1953b; Ryšavý, 1989).

Vývoj v invazivní larvu trvá okolo pěti-šesti dnů. Vývoj v dospělé v gastrointestinálním traktu hostitele trvá okolo patnácti dnů. Invazivní larva proniká do epitelu žaludku, kde se svléká a dospívá. Průnik vyvolává na sliznici záněty, krvácení a objevení vystouplých uzlíků. Z vystouplých uzlíků červ vylézá a uzlíky následně zanikají (Erhardová a Müller, 1953a).

Obrázek č. 4 Životní cyklus *Haemonchus contortus*



Zdroj: (Dansou et al., 2021)

Vysvětlivky:

- V horní polovině obrázku je parazitická fáze endogenní (zvíře), ve spodní polovině obrázku je parazitická fáze exogenní (pastvina).
- Ovce → vajíčka ve výkalech → L1 → L2 → opláštěný L3 → nahý L3 → L4 → nezralý dospělec → dospělá samička a sameček.

2.1.5 Hypobióza

Dříve přežilo zimní roční období jen málo volně žijících larev. Vlasovka se proto přizpůsobila, aby byla schopná přežít zimu za podmínek, které jsou nevhodné pro její přenos. Využila k tomu proces zvaný hypobióza neboli inhibice vývoje larev. K inhibici dochází u raného stádia L4 (HcL4). Velkou roli pro vznik inhibované larvy hraje dlouhá doba mezi dokončením vývoje larvy do infekčního stádia a pozřením hostitelem. Další roli hraje rezistence hostitele vůči infekci. K rezistenci může dojít třeba díky vysoké

expozici hostitele novým larvám. Na jaře inhibované larvy obnoví svůj vývoj. Obnovu vývoje inhibovaných larev spouští březost samic. Občasné dřívější dozrání inhibovaných larev může vyvolat vypuknutí zimní haemonchózy (Carson et al., 2023; Emery et al., 2016).

2.1.6 Infekce a symptomy

Nejdůležitějšími příznaky infekce *H. contortus* jsou vyvolány sáním krve parazitem. Dospělý červ dokáže vysát až 50 μ l krve denně. Mezi příznaky nemoci proto řadíme anémii, která se projevuje bledostí sliznic. Anémii lze také poznat pomocí změny barvy spojivek. Spojivky mohou mít přes normální červenorůžovou až k extrémně bílé barvě. Poslední případ zbarvení spojivek se objevuje při terminálním stádiu. Zároveň dochází ke změnám i v dalších hematologických parametrech jako např. k poklesu erytrocytů a celkovému počtu leukocytů, lymfocytů a neutrofilů. K poklesu lymfocytů a neutrofilů dochází z důvodu většího putování a hromadění bílých krvinek ve slezu, kde se nachází červi. Naopak se u nemocných zvířat můžeme setkat se zvýšeným počtem eozinofilů (Adduci et al., 2022; Besier et al., 2016a; Jabar Jasim et al., 2023).

Se ztrátou krve a se sníženým příjmem potravy také souvisí hypoproteinémie (snížení albuminu a celkového proteinu), která se může projevit břišním edémem (Besier et al., 2016a; Jabar Jasim et al., 2023).

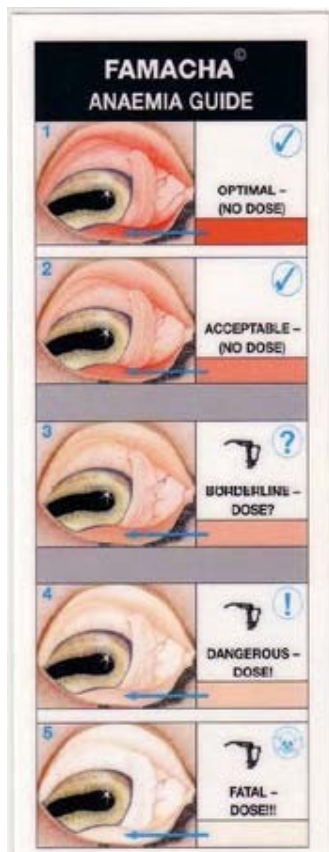
U haemonchózy je také zaznamenáno zvýšení enzymů alkalické fosfatázy (ALP), aspartátaminotransferázy (AST) a alaninaminotransferázy (ALT). K jejich zvýšení dochází následkem poškození sliznice napadené larvami (Jabar Jasim et al., 2023).

Ve výkalech lze najít stopy po okultním krvácení, ale haemonchóza nezpůsobuje průjem, výkaly jsou tedy tvrdé a drží tvar. Zvířata mají podkožní otoky (zejména podčelistní edém „bottle jaw“) a nižší schopnost snášet zátěž. Při nákaze dochází i k hubnutí. U ovcí dochází ke ztrátě vlny (Adduci et al., 2022; Besier et al., 2016a).

V případech závažné infekce trpí zvíře těžkou anémií a většinou nákazu nepřežije (Besier et al., 2016a).

2.1.7 Diagnóza

K diagnostice haemonchózy se využívají klinické příznaky např. podkožní edémy a sledování anémie. Dále se může prohlédnout stolice, ve které lze najít vyšší počet vajíček. Při nálezů vajíček pomocí mikroskopické techniky lze vynést pouze podezření na infekci *H. contortus* ale ne přesnou diagnózu a identifikaci, jelikož vajíčka si jsou příliš podobná s vajíčky dalších hlístic. K úplnému potvrzení diagnózy slouží posmrtná pitva (Carson et al., 2023).



Systém FAMACHA byl vyvinut v Jižní Africe. Používá se jako rychlý diagnostický indikátor pro viditelné známky anémie. K diagnostice se využívá pět standardizovaných barev, které se porovnávají se zbarvením spojivek zvířete. Systém byl vyvinut z důvodu, aby se snížila rezistence vůči anthelmintikům a léčba se mohla podat jen postiženým zvířatům ve skupině namísto celému stádu. (Besier et al., 2016a; Pereira et al., 2016).

Obrázek č. 5 FAMACHA

Zdroj: (Lewandowski, 2012)

Vysvětlivky:

- Zbarvení spojivek od červené po bílou barvu:
 - Červená barva – optimální (žádná dávka)
 - Růžová – hraniční (dávka?)
 - Bílá barva – smrtelná dávka!!!

2.1.8 Prevence a terapie

Nejčastěji se k léčbě infekcí způsobenými gastrointestinálními nematodami využívají širokospektrá anthelmintika imidazothiazoly, benzimidazoly, makrocyclické laktony (Parvin et al., 2023). Pokud je zvíře nakaženo pouze *H. contortus*, je vhodným

anthelmintikem klosantel, pokud je zvíře nakaženo více gastrointestinálními parazity, musí se použít širokospektrá anthelmintika. Dalším známým anthelmintikem využívaným k léčbě haemonchózy je monepantel. Používá se hlavně u multirezistentních případů, avšak i na toto anthelmintikum už byly prokázány případy rezistence (Carson et al., 2023; Niciura et al., 2020).

Jako nejčastěji využívaná strategie k terapii jsou využívána právě anthelmintika, která mají ale několik nevýhod: čím dál častěji objevující se rezistence nebo ekotoxické účinky. Proto je dobrou alternativní metodou vakcinace vyvolávající ochrannou odpověď. Nejprve se k imunizaci používaly rentgenovými paprsky ozářené invazivní larvy. Následně se začala používat živá vakcína Dictol (Adduci et al., 2022; Bassetto et al., 2020; Dyk et al., 1972).

Během posledních několika let se povedlo identifikovat různé antigeny *H. contortus* přijatelných pro vývoj nové vakcíny. Jednou z komerčně dostupných vakcín je Barbervax®. Může se používat v Austrálii, Spojeném království a jižní Africe. Tato vakcína obsahuje proteiny střevní membrány parazita (dva skryté antigeny H-11 a komplex H-gal-GP). Antigeny jsou v současnosti izolovány z dospělých jedinců, jsou tedy nativní. Vakcína má dobrou účinnost, ale k dostatečné protilátkové odpovědi je potřeba opakovat její podání, jelikož imunitní systém hostitele neodhalí střevní proteiny parazita. Její výroba je náročná a není ani cenově výhodná. Proto se začalo více přistupovat k vývoji rekombinantních forem vakcín, u kterých se však ukázalo, že nemají takovou úroveň ochrany jako živé vakcíny. Jsou ale poměrně levné a termostabilní. Nejnovějším přístupem jsou DNA vakcíny. Jsou relativně levné, stabilní při pokojových teplotách a vyvolávají specifickou imunitní odpověď pro daný kódovaný protein (Adduci et al., 2022; Bassetto et al., 2020).

Mezi další způsoby ochrany proti *H. contortu* patří alternativní sloučeniny, které mají antehmintický účinek. Do této skupiny patří třeba bioaktivní fytochemikálie. Odolnost vůči infekci a reakci na parazita zlepšuje nutriční suplementace (hlavně proteiny zvyšují imunitní odpověď hostitele). Dále je výhodná genetická selekce genů vedoucích k odolnosti a rezistenci hostitele. Tyto vlastnosti jsou většinou dobře dědičné. Další možností, jak zabránit infekci, je střídání pastvin pro zamezení styku zvířat s invazivními larvami stádia L3. Také pomáhá vysušování pastvin a umělé zdroje

vody. Na pastvinách se larvy mohou zničit za použití vysokých dávek určitých hnojiv (Adduci et al., 2022; Dyk et al., 1972).

2.1.9 Rezistence

H. contortus dělíme do tří kmenů: ISE (=Inbred-Susceptible-Edinburgh; citlivý kmen), IRE (=Inbred-Resistant-Edinburg; rezistentní kmen pouze ke skupině benzimidazolů) a WR (=white river; multirezistentní kmen). Kmen IRE pochází z kmene ISE, naopak kmen WR má původ odlišný (Stuchlíková et al., 2014; Stuchlíková et al., 2018).

Rezistence k léčivům se u *H. contortus* neustále zvyšuje a je tak velkou hrozbou pro chovatele ovcí. Byla popsána u téměř všech tříd anthelmintik. Příčinou vzniku rezistence jsou genetické mutace. Rozvoj rezistence podporuje preventivní podání anthelmintik celému stádu, podání nižších dávek a opakované podání stejného anthelmintika. Proti rezistentním kmenům bývá někdy účinné podání kombinace několika anthelmintik s různým mechanismem účinku (Naeem et al., 2021).

K omezení rozvoje rezistence se využívají různé strategie (např. chov plemene ovcí se sníženou citlivostí k infekci, vakcinační programy, střídání pastvin a selektivní léčba pouze jedinců s prokázanou nákazou). Nejlepší způsob boje proti rezistenci je před podáním léčiva testovat citlivost vyizolovaných larev k jednotlivým léčivům. Rovněž lze použít analýzu DNA, kterou lze rozpoznat kmene rezistentní proti některým anthelmintikům. Toto je možné provést, jelikož byla přečtená celá sekvence DNA *H. contortus* (Muchiut et al., 2018; Naeem et al., 2021).

Příčinou rezistence *H. contortus* vůči anthelmintikům však nemusí být pouze mutace v genu pro cílovou molekulu, ale také zvýšený metabolismus léčiva. V rezistentních kmenech *H. contortus* byla popsána zvýšená exprese enzymů deaktivujících a eliminujících anthelmintika. Bylo zjištěno, že jedinci rezistentního kmene (IRE) rychleji metabolizují některá anthelmintika než dospělci citlivého kmene (ISE) (Stuchlíková et al., 2018; Vokřál et al., 2012).

2.2 Vývoj nových anthelmintik

Haemonchóza, způsobující velké ekonomické ztráty chovatelům přežvýkavců, se stává čím dál větším celosvětovým problémem, protože dostupná anthelmintika jsou méně a méně účinná kvůli rozvoji lékové rezistence u *H. contortus*. Proto je nezbytné hledat anthelmintika nová, s novým mechanismem účinku (Jiao et al., 2020; Zajíčková et al., 2020; Zajíčková et al., 2022). Existuje mnoho přístupů k vývoji nových anthelmintik: syntéza nových sloučenin, identifikace aktivních rostlinných produktů, změna indikace u léčiv schválených pro jiné nemoci (=“terapeutická změna“) nebo syntéza nových derivátů současně používaných anthelmintik. Každý z těchto přístupů má své výhody a nevýhody. Při vývoji je důležité počítat se závislostí aktivity na struktuře látky. Dále je důležité rozumět mechanismu účinku (Suchý et al., 2009; Zajíčková et al., 2020).

Při využití strategie „terapeutická změna“ je výhodou, že pro takovéto léčivo už je známo mnoho údajů, které se dají použít, a to potom urychlí proces a sníží náklady na vývoj. Využití rostlinných přípravků k léčbě helmintóz zase zamezí kontaminaci prostředí chemickými léčivy a šíření rezistence na současně povolená anthelmintika (Zajíčková et al., 2020).

Proces vývoje léků je dlouhý a finančně nákladný. Skládá se z několika kroků. Nejprve se hledají sloučeniny s aktivitou např. proti larvám *H. contortus*, následuje měření toxicity, farmakokinetických a farmakodynamických parametrů. Dalším důležitým krokem při vývoji nových anthelmintik je testování hepatotoxicity, protože léčiva (stejně jako ostatní xenobiotika) jsou nejvíce metabolizována v játrech, a proto jsou játra orgánem, který je nejnáchylnější k poškození léčivy. Z toho důvodu je důležité při vývinu léčiva posoudit jeho případnou hepatotoxicitu (Jiao et al., 2020; Zajíčková et al., 2022)

2.2.1 Testování hepatotoxicity

K posouzení hepatotoxicity lze použít mnoho modelů. Každý z nich má svoje výhody a nevýhody. Nejpoužívanějším jsou primární kultury hepatocytů a jaterní 3D sferoidy. 3D modely mají oproti 2D jednovrstevným modelům několik výhod, jelikož

odráží morfologickou trojrozměrnou charakteristiku jater *in vivo*. Dalším modelem jsou jaterní řezy, které obsahují všechny buňky jater (PCLS), to je výhodou oproti hepatocytům. Hepatotoxicita potenciálních léčiv se testuje jak na modelech z experimentálních zvířat (většinou potkan), tak i na *in vitro* modelech cílových druhů (v případě léčiv proti haemonchóze na ovcích). Pro posouzení bezpečnosti nového léčiva je důležité také identifikovat metabolity, k čemuž lze také využít výše zmíněné jaterní modely (Gomez-Lechon et al., 2010; Sun et al., 2022; Zajíčková et al., 2022).

Při testování potenciální hepatotoxicity se hepatocyty i PCLS nejprve inkubují s testovanou látkou a poté se měří jejich životaschopnost. Životaschopnost PCLS lze stanovit pomocí stanovení koncentrace ATP bioluminiscenční metodou a normalizací výsledků jejich vztažením na celkovou koncentraci proteinu. Životaschopnost izolovaných hepatocytů lze stanovit inkubací buněk v roztoku 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Životaschopné buňky přemění MTT ze žlutého ve vodě rozpustného na fialový ve vodě nerozpustný formazan (Zajíčková et al., 2022).

2.2.2 Metody testování účinnosti anthelmintik

H. contortus se využívá jako modelový organismus pro testování nových potenciálních anthelmintik. Pro vývoj nových anthelmintik jsou zapotřebí vhodné metody testování účinnosti potenciálních anthelmintik na životaschopnost *H. contortus*. Metody stanovení životaschopnosti *H. contortus* jsou nejčastěji zaměřeny na mikroskopické sledování líhnutí vajíček, vývin larev a pohyblivost larev či dospělců. Mezi novější metody stanovení viability *H. contortus* patří měření koncentrace ATP pomocí bioluminiscence. Je to jediná biochemická metoda využitelná i u dospělců, což je velkou výhodou, protože cílem pro anthelmintika jsou právě dospělci (Nguyen et al., 2021).

Prvním krokem pro získání vajíček, larev či dospělců *H. contortus* je infekce ovcí. Jehňata, která mají být infikována *H. contortus*, nesmí mít jiné parazity, proto je zapotřebí před infikací jehňatům podat vhodné anthelmintikum a pak zkontrolovat trus. Pokud nejsou v trusu žádná vajíčka, mohou se jehňata infikovat larvami L3

(infekční stádium). Suspenze larev je podána jehňatům p.o. Infekční dávka závisí na hmotnosti jehněte (Baptistioli et al., 2018; Pavičić et al., 2023).

2.2.2.1 Test na snížení počtu vajíček ve stolici

Test na snížení počtu vajíček ve stolici (FECRT) se provádí při kontrole účinnosti anthelmintik *in vivo*. Výhodou testu je univerzální použitelnost při detekci rezistence (Untersweg et al., 2021).

Nakažené ovce se rozdělí do 2 skupin, jedné skupině je podáno léčivo, druhá skupina je kontrolní. Ovečkám se poté odebere stolice, která se testuje na počet vajíček. Vzorokly se testují v určitých intervalech od začátku léčby. Pro zjištění počtu vajíček ve stolici je možné využít metodu Mini-FLOTAC pomocí flotačního roztoku chloridu sodného (Aboelhadid et al., 2021; Untersweg et al., 2021).

2.2.2.2 Test líhnutí vajíček

Test líhnutí vajíček (EHT) se používá k posouzení vlivu anthelmintika na schopnost vajíček se vyvinout v larvy. První variantu testu popsal Le Jambre (1976) a využil ho pro srovnávání účinnosti různých benzimidazolových látek s thiabendazolem. Následně se začal EHT používat i pro stanovení účinnosti levamisolu (Dobson a kol., 1986). Vajíčka *H. contortus* se izolují z ovčího trusu. K řitnímu otvoru se ovečkám připevní sáčky, do kterých ovečky vylučují výkaly. Následně se výkaly transportují do laboratoře v chladících boxech, kde jsou rozdrceny. Hmota se přecedí přes tři síta s postupně se zmenšujícím průměrem otvorů (250, 100 a 25 μm). Vajíčka se zachytí na posledním sítu, přenesou se do zkumavek a centrifugují se. Po centrifugaci se odebere supernatant a nahradí se flotačním roztokem sacharózy. Vše se znovu nechá centrifugovat. Vajíčka poté plavou na povrchu, posbírají se a znovu se dají centrifugovat ve flotačním roztoku. Následně se vajíčka očistí odstředěním ve vodě. EHT je založen na oxicidní aktivitě anthelmintik. Nevýhodou EHT proto je, že pouze některá anthelmintika účinkují na vajíčka (např. benzimidazoly), ale řada účinných anthelmintik nemá oxicidní účinek a jejich cílovým stádiem jsou dospělci a larvy. (Babják et al., 2021; Kotze a Prichard, 2016; Pavičić et al., 2023; Nguyen et al., 2021).



EHT se provádí na destičkách s jamkami, do kterých se dá testovaná látka (léčivo) a vajíčka. Destičky se inkubují 48 hodin při 27°C. Inkubace se ukončuje přidáním Lugolova roztoku. Následně se zjišťuje, kolik vajíček se vylíhlo při určité koncentraci léčiva (Babják et al., 2021)

Obrázek č. 6 Vajíčka *H. contortus*

Zdroj: (Naeem et al., 2021)

2.2.2.3 Test vývinu larev

Test vývinu larev (LDT) byl vyvinut v 90 letech minulého století. Touto metodou lze testovat účinnost nových potenciálních anthelmintik i odlišit citlivé a rezistentní kmeny proti třem hlavním skupinám léků (imidazothiazoly, benzimidazoly a makrocyclické laktony). LDT sleduje účinek léčiva na vývoj z vajíčka až do larev třetího stádia (L3). Test může probíhat ve dvou variantách podle použitého média. První variantou je vývin larev v kapalném médiu, druhou variantou je rozvoj larev v tenké vrstvě agaru (Kotze a Prichard, 2016).

2.2.2.4 Test životaschopnosti larev a dospělců měřením ATP

Životaschopnost lze také zjistit měřením ATP. Tento test je možné využít jak u L3 larev tak i u dospělců (Nguyen et al., 2021). Pro izolaci dospělců se musí usmrtit nakažené ovečky a musí se jim odebrat slez. Obsah slezu s dospělci *H. contortus* se dá do kádinky s fyziologickým roztokem. Hádřata sedimentují a supernatant bez hádřat se odsaje. Zbytek fyziologického roztoku s vlasovkou se smíchá s agarem. Vše se poté nalije na gázu a nechá se zatuhnout. Gáza se zatuhnutým agarem se pověsí do akvária naplněného fyziologickým roztokem. Tam se vše nechá inkubovat při teplotě 37 °C, dokud živí jedinci nevylezou z agaru a neklesnou na dno kádinky (Pavičić et al., 2023).

Měření ATP hladiny se provádí bioluminiscenčně s využitím luciferázy ze světlušky. K bioluminiscenci dochází díky přeměně d-luciferinu na oxyluciferin za pomoci ATP. Koncentrace ATP (intenzita bioluminiscence) odpovídá množství metabolicky aktivních buněk. Naměřená koncentrace ATP se normalizuje (kvůli

eliminaci variability ve velikosti červů) na celkovou koncentrací proteinů. Koncentrace proteinů se měří pomocí kyseliny bicinchinové (BCA) (Nguyen et al., 2021).

2.2.2.5 Test motility/migrace (LMIA)

Hodnocení účinku anthelmintik lze provádět pomocí sledování pohybu/motility larev event. dospělců. Metoda slouží pro testování účinnosti nových látek i k rozlišení citlivých a rezistentních kmenů. Test má mnoho variant lišících se způsobem rozlišení pohyblivých a nepohyblivých larev:

1. Rozlišení larev použitím měřiče na měření mikromotility *H. contortus*.
2. Rozlišení larev po určité době expozice lékům za pomoci pozorování.
3. Oddělení larev díky jejich schopnosti migrovat skrz síť.
4. Oddělení larev díky migraci z agarového gelu.
5. Oddělení larev díky migraci skrz agar a poté přes síto.

První standardizovanou metodou pro sledování motility *H. contortus* vyvinul Demeter a kol. (2010). (Kotze a Prichard, 2016).

3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo testovat potenciální anthelmintickou účinnost a hepatotoxicitu nových derivátů kyseliny benzhydroxamové OMK3 a OMK4.

Dílčími cíli bylo:

- 1) Získat vajíčka, larvy a dospělé *H. contortus*.
- 2) Zjistit vliv OMK3 a OMK4 na líhnutí vajíček *H. contortus*.
- 3) Sledovat vliv OMK3 a OMK4 na motilitu a viabilitu larev a dospělců *H. contortus*.
- 4) Porovnat anthelmintický účinek OMK3 a OMK4 u citlivého a rezistentního kmene *H. contortus*.
- 5) Připravit precizní jaterní řezy a zjistit, zda OMK3 a OMK4 ovlivňují jejich viabilitu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Příprava larev L3 *H. contortus* na nakažení ovce

4.1.1 Pomůcky a přístroje

- Mikroskop (Novel Optics NIB-100)

4.1.2 Materiál a chemikálie

- Larvy L3 *H. contortus* (kmen ISE a IRE)
- Kónická skleněná nádoba o objemu 1 l
- Injekční stříkačka o objemu 8 ml
- Jehla s krytem
- Kádinka o objemu 500 ml

4.1.3 Metodika

Zásobní suspenze L3 byly vyndány z chladicího boxu. Následně se larvy nechaly sedimentovat ve skleněné kónické nádobě. Suspenze larev v kádince byla zředěna na koncentraci 1000 larev L3/ml. Počet larev byl určen pod mikroskopem. Larvy byly před pipetováním promíchávány, aby netvořily shluky. Jedna ovce byla nakažena 6000-8000 larvami L3 stádia. Suspenze larev byla podána per orálně stříkačkou. Před podáním byla suspenze ve stříkačce promíchána.

4.2 Izolace vajíček

4.2.1 Pomůcky a přístroje

- Magnetická míchačka (Heidolph, MR Hei-mix S)
- Centrifuga (Eppendorf – 5810 R)
- Mikroskop (Novel Optics NIB-100)

4.2.2 Materiál a chemikálie

- Trus s vajíčky *H. contortus* (kmen ISE a IRE)
- Cvočky
- Sáčky (bílé o velikosti 2 l do mrazáku a bílé se žlutým popisovacím pruhem o velikosti 20x30 cm)
- Centropen
- Rukavice
- Velký sáček na převoz
- Soustava sít s rozměry ok 250, 100 a 25 μm
- Kádinka o objemu 2 l
- Destilovaná voda
- Cukr
- Odměrný válec o objemu 1 l
- Miska
- Kónické zkumavky (o objemu 50 ml, 15 ml)
- Kohoutková voda
- Kovová tyčka
- Pipeta (o objemu 1 ml, 10 μl)
- Podložní sklíčko

4.2.3 Příprava Sheatherova flotačního roztoku

Do kádinky o objemu 2 l bylo nalito 500-600 ml destilované vody. Voda byla ohřáta na 45 °C za stálého míchání. Postupně bylo přisypáno 0,5 kg cukru. Po rozpuštění cukru byl roztok přelit do odměrného válce, ve kterém byla změřena hustota, která dosahovala 1,27 g/cm³.

4.2.4 Metodika

Nejprve byly ovečkám připevněny pomocí cvočků k vlně okolo řitního otvoru popsané sáčky, tak aby se jim do sáčku nedostala moč. Trus byl do sáčku sbírán 8-24 hodin.

Před izolací vajíček byl nejprve trus v kádince zalit studenou kohoutkovou vodou. Následně bylo vše rozmixováno a suspenze byla nalita na síto s největším průměrem ok 250 μm . Směs byla přes síto pasírovaná a prolévána vodou. Filtrát protékal do misky pod sítem a byl přenesen do druhého síta s průměrem ok 100 μm . Postup pasírování byl zopakován a filtrát byl opět přenesen. Tentokrát na síto s nejmenším průměrem ok 25 μm . Z povrchu třetího síta, kde se zachytila vajíčka, byl přenesen obsah do kónické plastové zkumavky o objemu 50 ml. Suspenze z třetího síta byla centrifugována při 1600 rpm po dobu 3 minut. Supernatant byl vylit a k sedimentu byl přidán Sheatherův flotační roztok cca do $\frac{3}{4}$ kónické zkumavky. Vše bylo promícháno kovovou tyčkou, doplněno Sheatherovým flotačním roztokem po okraj zkumavky, opět promícháno a znovu centrifugováno při 1000 rpm po dobu 3 minut. Po stočení byla odebrána vajíčka plovoucí na hladině a celý krok s doplněním zkumavek flotačním roztokem, promícháním, centrifugací a odebráním vajíček byl zopakován.

Přečištění vajíček bylo provedeno odebráním 2ml vrchní vrstvy do kónické plastové zkumavky o objemu 15 ml. Kónická zkumavka byla doplněna flotačním roztokem a suspenze centrifugována při 1000 rpm po dobu 3 minut. Z kónické zkumavky byly následně odebrány 2ml horní vrstvy do nové kónické zkumavky o objemu 15 ml. Kónická zkumavka byla doplněna vodou, promíchána a suspenze centrifugována při 1600 rpm po dobu 3 minut. Následně byl vylit supernatant, byla přidána trocha vody a stejná vajíčka byla slita do jedné kónické zkumavky. Kónická zkumavka byla doplněna vodou a centrifugována při 1600 rpm po dobu 3 minut. Tento krok s odlitím supernatantu a přidáním vody a centrifugací byl opakován, dokud se úplně nevymyl flotační roztok. Následně byl všechn supernatant slit a k sedimentu (vajíčkům) se přidaly 2ml studené kohoutkové vody.

V suspenzi vajíček byla určena jejich koncentrace. Nejprve byla suspenze o známém objemu protřepána, poté bylo odebráno 5x10 μl na podložní sklíčko a pod mikroskopem byla spočítána vajíčka. Počet vajíček byl následně přepočítán na 1 ml suspenze.

4.3 Agarová metoda pro izolaci dospělců *H. contortus*

4.3.1 Pomůcky a přístroje

- Předvážky (KERN 440-43)
- Magnetická míchačka (Heidolph, MR Hei-mix S)
- Inkubátor (Biological thermostat BT 120M)

4.3.2 Materiál a chemikálie

- Kanystř s F1/1
 - Kbelík o objemu 9 l
 - 81 g NaCl
 - Akvárium
 - 9 l kohoutkové vody
 - Kanystř o objemu 5 l
- Agar
 - 30 g agaru
 - 500 ml studené vody
 - Hrnc
 - Vařečka
 - Teploměr
 - Míchadlo
 - Leukopor
- Alobal
- Kádinka (500 ml; 2 l)
- Velký odměrný válec
- Hadice
- Trychtýř
- Gáza
- Nůžky
- Skřipce
- Železné tyčky

- Tácy
- Slez s dospělci *H. contortus* (kmen ISE, IRE a WR)
- PBS (Sigma-Aldrich)
- Pinzety
- Stereolupy
- Černé podkladové papíry

4.3.3 Příprava fyziologického roztoku F1/1 (0,9 % NaCl)

Na přípravu F1/1 roztoku bylo 81 g NaCl rozpuštěno v 9 l kohoutkové vody. Čtyři připravené roztoky (36 l) byly přelity do akvária, kde hladina dosahovala do 4/5 objemu akvária.

Stejným způsobem byl roztok připraven i do kanystrů o objemu 5 l, ten byl využit na oplach slezu a doplnění akvárií.

4.3.4 Příprava agarů

Do kádinky bylo naváženo 30 g agarů. K tomu bylo přidáno 500 ml studené vody. Vzniklá suspenze byla dána do hrnce a k ní bylo přilito 1,5 l ohřáté vody. Vše bylo přivedeno do varu za stálého míchání. Do směsi byl dán teploměr, který byl přilepen leukoporem. Hrnc se směsí byl ochlazen pod studenou tekoucí vodou na 48°C. Po ochlazení bylo do hrnce dáno míchadlo a hrnc byl přikryt alobalem. Na magnetické míchačce byla udržována stálá teplota 48 °C.

4.3.5 Metodika

Den před izolací dospělců byly kanystry spolu s naplněnými akvárii do 4/5 fyziologickým roztokem F1/1 přikryty alobalem a uloženy do termostatu při 38 °C.

Na tácy byla rozprostřena gáza s přesahujícími okraji a navlhčená F1/1 roztokem.

Kádinka o objemu 2 l byla do poloviny naplněna teplým fyziologickým roztokem F1/1. Na tácu byl rozstříhnut sléz a jeho obsah byl vyhozen. Sléz byl přenesen a jemně promnut v F1/1 roztoku tak, aby se z něj pustili dospělci. Záhyby slezu byly opláchnuty

a sléz byl přenesen na čistý táč s F1/1 a dočištěn. Kádinka s červy byla vložena do inkubátoru, tam byla inkubována, dokud nesedimentoval její obsah. Roztok nad sedimentem byl odsán a do kádinky byl přidán roztok agarů přibližně v poměru 1:1, vše bylo promícháno a hned vylito na táč s připravenou gázou. Okraj gázy byl navázán na tyčku, která byla upevněna skřipci. Druhá strana byla také zatížena skřipci a případně odštířena, aby se do ní nezamotávali dospělci. Takto vytvořené závěsy byly pověšeny do akvária a za tyčky přilepeny leukoporem. Závěsy byly pověšeny zády k sobě tak, aby se nedotýkaly dna. Do akvárií byl přes trychtýř opatrně po stěnách akvárií doplněn roztok F1/1. tak, aby agary na závěsech byly ponořené. Postupně byly pomocí hadičky odsávání spadáni dospělci ze dna akvária. Každé akvárium bylo určeno pouze pro jeden kmen.

Po izolaci dospělců následovalo třídění červů na samičky a samečky podle morfologických znaků. Následně byly rozpočítány do destiček, které byly naplněny pomocí automatické pipety 1 ml sterilního PBS ohřátého na 37 °C. Naplněné destičky byly vloženy do inkubátoru, který byl nastaven na 37 °C.

4.4 Test líhnutí vajíček

4.4.1 Pomůcky a přístroje

- Inkubátor (Biological thermostat BT 120M)
- Mikroskop (Novel Optics NIB-100)

4.4.2 Materiál a chemikálie

- Průhledná 96 jamková P destička (TPP)
- Vajíčka *H. contortus* (kmen ISE a WR)
- 200 μM OMK3/4 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- 4 mM OMK207 (derivát z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- 2 mM ABZ (Sigma-Aldrich)
- 100 % DMSO (Sigma-Aldrich)
- Kohoutková voda
- Pipeta

- 100% vodný Lugolův roztok (Sigma-Aldrich)

4.4.3 Metodika

Do všech jamek na okraji destičky bylo dáno 280 μ l kohoutkové vody, aby bylo zabráněno odpařování jednotlivých vzorků. Do prvních šesti sloupečků bylo pipetováno 1 μ l zásobního roztoku OMK3/4 v DMSO a 199 μ l suspenze vajíček ve vodě, tak aby výsledné koncentrace byly 0,01; 0,1 a 1 μ M pro každou z testovaných látek. Z toho důvodu byl zásobní 200 μ M OMK naředěn na 20 a 2 μ M, každá z těchto koncentrací byla napipetována do jiného sloupečku. Vše bylo pipetováno v triplikátech do dvou destiček. Jedna destička byla pro ISE kmen, druhá pro WR kmen. Výsledný počet vajíček na jamku činil 60. Do sedmého a osmého sloupečku bylo pipetováno 1 μ l 4 mM OMK207 (derivát OMK s prokázaným ovicidním účinkem) a 199 μ l vajíček ve vodě tak, aby výsledná koncentrace OMK 207 byla 20 μ M. Do devátého sloupečku byla pipetovaná pozitivní kontrola (2 mM ABZ) spolu s vajíčky ve vodě tak, aby výsledná koncentrace ABZ byla 0,1 μ M pro ISE a 10 μ M pro WR (protože ISE je citlivý kmen a IRE je rezistentní kmen). Do posledního sloupečku (negativní kontroly) bylo pipetováno 1 μ l čistého DMSO a 199 μ l suspenze vajíček. Výsledná koncentrace tedy byla 0,5 % DMSO ve vodě.

Následně byla destička inkubovaná 48 hodin v termostatu při 37 °C. Po 48 hodinách inkubace bylo přidáno 5 μ l 100 % vodného Lugolova roztoku do všech jamek. Následně byla spočítána všechna nevylíhnutá vajíčka a larvy stádia L1 v jednotlivých jamkách.

4.5 Odpouzďení L3 larev *H. contortus*

4.5.1 Pomůcky a přístroje

- Centrifuga (Eppendorf-5810 R)
- Inkubátor s CO₂ (HERAcell)
- Mikroskop (Novel Optics NIB-100)
- Ultrazvuková lázeň pro ohřev vody (Kraintek s.r.o.)

- Systém Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) pro přípravu ultračisté vody ddH₂O

4.5.2 Materiál a chemikálie

- Larvy *H. contortus* (kmen ISE a WR)
- Podložní sklíčka
- 50 ml kónické zkumavky
- 11 % (v/v) NaClO (Sigma-Aldrich)
- Destilovaná voda
- Sterilní médium Luria-Bertani (LB) (prášek zakoupený v laboratoři 2310)
 - Penicilin (Sigma-Aldrich)
 - Streptomycin (Sigma-Aldrich)
 - Amfotericin (Sigma-Aldrich)
- Pipeta

4.5.3 Příprava média Luria-Bertani

Při přípravě bylo k zakoupenému prášku přidáno 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 2,5 µl/ml amfotericinu.

4.5.4 Metodika

Larvy stádia L3 byly odebrány do kónické zkumavky o objemu 50 ml. Následně byl přidán 11 % (v/v) NaClO, tak, aby výsledná koncentrace byla 0,15 % (v/v). 628 µl NaClO bylo tedy přidáno do 50 ml kónické zkumavky. Poté byl obsah kónické zkumavky protřepán a nechal se inkubovat 20 min. při 38 °C v inkubátoru s 10 % CO₂. Odpláštění bylo zkontrolováno pod mikroskopem. Suspenze odpláštěných larev L3 (xL3) se dala centrifugovat 5x při 1600rpm po dobu 3 min. Po každé centrifugaci byl odlit supernatant a larvy se znovu resuspendovaly v lázni ohřáté vodě na 37 °C. Po posledním stočení se larvy xL3 resuspendovaly v Luria-Bertani médiu, které bylo ohřáté na 37 °C.

4.6 Testování viability larev xL3

4.6.1 Pomůcky a přístroje

- Mikroskop (Novel Optics NIB-100)
- Homogenizátor (Biobase)
- Centrifuga s chlazením (Heraeus Biofuge Stratos, rotor č. 3332, Thermo Fisher Scientific)
- Čtečka destiček Tecan Spark (Tecan Group Ltd.)
- Koncentrátor (Eppendorf Concentrator Plus)
- Thermomixer (Eppendorf-comfort)
- Inkubátor (Biological thermostat BT 120M)
- Systém Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) pro přípravu ultračisté vody ddH₂O

4.6.2 Materiál a chemikálie

- Larvy xL3 *H. contortus* (kmen ISE a IRE)
- Podložní sklíčko
- OMK3/4 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- Levamizol (Penta)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche)
 - Luciferasa
 - ATP standart
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermoscientific)
 - Roztok A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH)
 - Roztok B (4 % CuSO₄, 6H₂O)
 - 0,2 % BSA
- Černá 96 jamková destička (Corning Costar CLS9102, Sigma-Aldrich)
- Průhledná 96 jamková destička (GAMA)
- Plastová mikrozkuhavka o objemu 2ml se šroubovacím víčkem

- Homogenizační kuličky—směs velikostí 1,0mm; 1,4mm; 2,0mm v poměru 1:1:0,5 (zirkonové Silidbeads)
- Pipeta a multikanálová pipeta
- Chladicí bloček
- Redestilovaná voda
- Tris/EDTA
 - Baňka o objemu 1 l
 - 100 mM Tris-HCl
 - 2mM EDTA pufr (pH=7,6-8,0) (Sigma-Aldrich)
 - Redestilovaná voda
- Plastová mikroskopická (1,5 ml; 0,5 ml)

4.6.3 Příprava Tris/EDTA pufru

Na přípravu 1 l pufru Tris/EDTA bylo rozpuštěno 12 g Tris a 0,74 g EDTA v 600 ml redestilované vody. Následně bylo upraveno pH pufru 6 M HCl a baňka byla doplněna redestilovanou vodou na objem 1 l.

4.6.4 Inkubace L3

Z larviček xL3 byla připravena suspenze o koncentraci 20 larev xL3/10 μ l spočítáním pod mikroskopem. Do jedné mikroskopické se šroubovacím víčkem o objemu 2 ml bylo napipetováno 200 μ l suspenze o koncentraci 400 larev xL3/200 μ l. Larvičky se nechaly inkubovat při 27 °C 24 hodin ve finálních koncentracích látek (OMK3/4 v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μ M; jako negativní kontrola bylo použito 1 % DMSO a jako pozitivní kontrola bylo použito 10 μ M levamisol). Vzorky byly pipetovány v 6 paralelkách a po inkubaci zamraženy.

4.6.5 Stanovení ATP

Při stanovení ATP byla nejprve vychlazena centrifuga na 4 °C. Následně byly rozmraženy roztoky ATP a luciferázy. Vzorky byly dány na chladicí bloček a k nim byla přidána odměrka homogenizačních kuliček. Vzorky byly 2x homogenizovány po dobu 20 s, rychlostí 7. Následně byly vzorky centrifugovány při 13200 rpm po dobu 10 min

při 4 °C. Naředěním ATP standartu byly připraveny roztoky na kalibrační křivku podle tabulky níže.

Tabulka č. 2 Ředění ATP standartu

ŘEDĚNÍ	V [μl]	V Tris/EDTA [μl]	c ATP [nM]
A	10 μl ATP-standard	990	165000
C1	10 (A)	990	1650
C2	100 (C1)	400	330
C3	50 (C1)	450	165
C4	100 (C3)	400	33
C5	50 (C3)	450	16,5
C6	100 (C5)	400	3,3
C7	50 (C5)	450	1,65
C8 (sl)	0	500	0

Do černé 96ti jamkové destičky bylo pipetováno 5 μl supernatantu vzorku a 45 μl TRIS/EDTA pufru pokojové teploty v duplikátech. Při přípravě vzorků pro získání kalibrační křivky bylo pipetováno 50 μl roztoku C1-C8 v duplikátech. Chvilí před měřením bylo do každé jamky pipetováno multikanálovou pipetou 50 μl luciferázy. Následně byla změřena luminiscence na přístroji Spark (Tecan).

4.6.6 Stanovení bílkoviny

Na měření bílkoviny byly použity vzorky po měření ATP. Vzorky byly dány sušit do koncentrátoru. Sušily se při 45 °C po dobu 6-8 hodin na program V-AQ. Po usušení bylo přidáno 40 μl 5 M NaOH a vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C při 800 rpm v Thermomixeru. Po 30 minutách inkubace bylo přidáno 160 μl redestilované vody. Suspenze byla protřepána.

Dále byly vytvořeny roztoky na kalibrační křivku pomocí postupu v tabulce níže:

- 1.mikrozkumavka: 250 μl 0,2 % BSA z kitu + 250 μl 2 M NaOH

- 2.mikrozkumavka: 500 μ l 1 M NaOH

Tabulka č. 3 Kalibrační křivka BCA L3

	Koncentrace [μ g/ml]	0,1 % roztok BSA v 1M NaOH (tj. 1. mikrozkumavka) [μ l]	1M NaOH (tj. 2. mikrozkumavka) [μ l]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Následně byl připraven pracovní roztok C (zelený roztok) smícháním roztoku A (čirý) s roztokem B (modrý) v poměru 50:1.

Do 96 jamkové GAMA-U průhledné destičky bylo pipetováno 10 μ l vzorku v duplikátech. Při přípravě vzorků pro získání kalibrační křivky bylo pipetováno 10 μ l z mikrozkumavek 1-6 v duplikátech. Následně bylo napipetováno automatickou multikanálovou pipetou 200 μ l pracovního roztoku C do všech jamek. Poté byla destička inkubovaná 30 min. při 350 rpm po dobu 60 °C na Thermomixeru. Po inkubaci byla změřena absorbance při 562 nm na přístroji Spark (Tecan).

4.7 Test viability dospělců

4.7.1 Pomůcky a přístroje

- Homogenizátor (MP biomedical FastPrep)
- Centrifuga s chlazením (Heraeus Biofuge Stratos, rotor č. 3332, Thermo Fisher Scientific)
- Čtečka destiček Tecan Spark (Tecan Group Ltd.)
- Thermomixer (Eppendorf-comfort)
- Inkubátor (Biological thermostat BT 120M)

- Systém Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) pro přípravu ultračisté vody ddH₂O

4.7.2 Materiál a chemikálie

- Dospělci *H. contortus* (kmen ISE a IRE)
- RPMI médium 1640 (Lonza)
- Suchý led
- OMK3/4 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- Levamizol (Penta)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche)
 - Luciferasa
 - ATP standart
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermoscientific)
 - Roztok A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH)
 - Roztok B (4 % CuSO₄, 6H₂O)
 - 0,2 % BSA
- Černá 96 jamková destička (Corning Costar CLS9102, Sigma-Aldrich)
- Průhledná 96 jamková U destička (GAMA)
- 24 jamková destička s plochým dnem (TPP)
- Plastové mikrozkušavky o objemu 2 ml, se šroubovacím víčkem
- Homogenizační kuličky – směs velikostí 1,0 mm; 1,4 mm; 2,0 mm v poměru 1:1:0,5 (zirkonové Silidbeads)
- Pipeta a multikanálová pipeta
- Chladící bloček
- Redestilovaná voda
- Tris/EDTA
 - Baňka o objemu 1 l
 - 100 mM Tris-HCl
 - 2 mM EDTA pufr (pH=7,6-8,0) (Sigma-Aldrich)
 - Redestilovaná voda

- Plastové mikroskopické kumavky (1,5 ml; 0,5 ml)
- SONOP (sonification solution)
 - 96 % ethanol (lach:ner)
 - 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- PBS (Sigma-Aldrich)

4.7.3 Příprava Tris/EDTA pufru

Viz.:4. 6.3 Příprava Tris/EDTA pufru.

4.7.4 Příprava SONOPu

Nejprve byla rozpuštěna 2 mM EDTA v redestilované vodě, poté bylo upraveno pH na 10,9 a nakonec bylo vše doplněno 96 % ethanolom, jehož finální koncentrace byla 70 % v/v.

4.7.5 Inkubace dospělců

Po izolaci dospělců a jejich rozdělení na samičky a samečky byly červy inkubovány 24 h ve 24 jamkových destičkách, přičemž do jedné jamky byly vloženy 4 samičky nebo 8 sameček. Do jamek přitom bylo napipetováno 1000 μ l RPMI média s testovanou látkou o požadované koncentraci (OMK3/4 v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μ M; jako negativní kontrola 1 % DMSO a jako pozitivní kontrola 10 μ M levamizol). Takto byly červy ponechány v inkubátoru 48 h při 37 °C. Po skončení inkubace byly červy opláchnuty v PBS médiu a posbírány do 2 ml mikroskopických kumavek se 100 μ l SONOPu. Mikroskopické kumavky byly ihned vloženy na suchý led. Vzorky byly dále uchovány v -80 °C až do jejich zpracování.

4.7.6 Stanovení ATP

Při stanovení ATP byla nejdříve vychlazená centrifuga na 4 °C. Následně byly rozmrazeny roztoky ATP a luciferázy. Vzorky byly dány na chladicí bloček a k nim byla přidána odměrka homogenizačních kuliček a 1,4 ml Tris/EDTA pufru. Vzorky byly 2x homogenizovány po dobu 20 s, rychlostí 7. Následně byly vzorky centrifugovány

při 13200 rpm po dobu 10 min při 4 °C. Naředěním ATP standartu byly připraveny roztoky na kalibrační křivku podle tabulky č. 2 Ředění ATP standardu.

Do černé 96ti jamkové destičky bylo pipetováno 5 µl supernatantu vzorku a 45 µl TRIS/EDTA pufru pokojové teploty v duplikátech. Při přípravě vzorků pro získání kalibrační křivky bylo pipetováno 50 µl roztoku C1-C8 v duplikátech. Chvilí před měřením bylo do každé jamky pipetováno multikanálovou pipetou 50 µl luciferázy. Následně byla změřena luminiscence na přístroji Spark (Tecan).

4.7.7 Stanovení bílkoviny

Na měření bílkoviny byly nejprve připraveny roztoky na kalibrační křivku naředěním 0,2 % BSA z kitu na 0,04 % pomocí zředění Tris/EDTA. 120 µl 0,2 % BSA tedy bylo naředěno 480 µl Tris/EDTA pufru. Dále byly roztoky na kalibrační křivku tvořeny podle tabulky níže.

Tabulka č. 4 Kalibrační křivka BCA dospělci

	Koncentrace [µg/ml]	0,04 % roztok BSA v TRIS/EDTA pufru [µl]	TRIS/EDTA pufr [µl]
1	0	0	200
2	80	40	160
3	160	80	120
4	240	120	80
5	320	160	40
6	400	200	0

Následně byl připraven pracovní roztok C (zelený roztok) smícháním roztoku A (čirý) s roztokem B (modrý) v poměru 50:1.

Do 96ti jamkové GAMA-U průhledné destičky bylo pipetováno 10 µl supernatantu vzorku v duplikátech. Při přípravě vzorků pro získání kalibrační křivky bylo pipetováno 10 µl z mikrozkušavek 1-6 v duplikátech. Následně bylo napipetováno

automatickou multikanálovou pipetou 200 μ l pracovního roztoku C do všech jamek. Poté byla destička inkubovaná 30 min. při 350 rpm po dobu 37 °C na Thermomixeru. Po inkubaci byla změřena absorbance při 562 nm na přístroji Spark (Tecan).

4.8 Monitorování motility larev xL3 *H. contortus* pomocí mikroskopu s kamerou

4.8.1 Pomůcky a přístroje

- Mikroskop (Nikon Eclipse Ti) s kamerou (Andor Zyla 5,5 s CMOS)

4.8.2 Materiál a chemikálie

- Larvy L3 *H. contortus* (kmen ISE)
- 1,25 mM OMK3/4 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- 96 jamková P destička (TPP)
- Pipeta
- 100 % DMSO (Sigma-Aldrich)
- 0,5 mM levamizol (Penta)

4.8.3 Metodika

Nejprve byly larvy odpláštěny. Následně byly pipetovány 2 μ l látky a 198 μ l suspenze s larvami xL3 v tetraplikátech. Do prvního sloupečku tedy byly pipetovány 2 μ l 100 % DMSO a 198 μ l suspenze s xL3 larvami. Výsledná koncentrace DMSO v suspenzi byla 1 %. Do druhého sloupečku byly pipetovány 2 μ l 0,5 mM levamizolu a 198 μ l suspenze s xL3. Výsledná koncentrace levamizolu v suspenzi byla 5 μ M. Do posledních deseti sloupečků byly pipetovány látky OMK 3 a 4. Byly pipetovány 2 μ l OMK3/4 a 198 μ l xL3 larev v suspenzi tak, aby vznikly tři různé koncentrace (0,78; 1,56 a 3,12 μ M) pro každou z látek. Z toho důvodu bylo zásobní 1,25 mM OMK naředěno na 312; 156 a 78 μ M a každá z těchto koncentrací byla napipetována do jiného sloupečku na destičce. Destička byla inkubovaná 72 h při 37 °C. Po dokončení inkubace byla zaznamenána krátká desetisekundová videa kamerou ve tmě pod mikroskopem při 37 °C, aby byla zachována pohyblivost larev. Záznam byl pořízen pomocí softwaru

NIS-Elements Imaging Software. Následně byla videa zkonvertována na MJPEG. Na videích byl vyhodnocen poměr živých a mrtvých larev podle jejich pohybu. Každá larva na videu byla označena číselným identifikátorem a byla vyhodnocena její motilita.

4.9 Monitorování motility dospělců *H. contortus* pomocí kamery

4.9.1 Pomůcky a přístroje

- Kamera (Nicon)
- Stojan na kameru (Velvon P-max)
- Inkubátor D180-P (RWD Life Science)

4.9.2 Materiál a chemikálie

- Dospělci *H. contortus* (kmen ISE a IRE)
- RPMI médium 1640 (Lonza)
- OMK1/2 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- Levamizol (Penta)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- 24 jamková destička s plochým dnem (TPP)
- Plastová mikrokumavka o objemu 2 ml, se šroubovacím víčkem
- Pipeta
- SONOP (sonification solution)
 - 96 % ethanol (Iach:ner)
 - 2 mM EDTA (Sigma- Aldrich)
- PBS (Sigma-Aldrich)

4.9.3 Příprava SONOPu

Viz. 4.7.4 Příprava SONOPu

4.9.4 Inkubace dospělců a monitorování motility

Po izolaci dospělců a jejich rozdělení na samičky a samečky byly červy inkubovány ve 24 jamkových destičkách, přičemž do jedné jamky byly vloženy 4 samičky nebo 8 sameček. Do jamek bylo napipetováno 1000 μ l RPMI média s testovanou látkou o požadované koncentraci (OMK3/4 v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μ M; jako negativní kontrola 1 % DMSO a jako pozitivní kontrola 10 μ M levamizol). Destičky se daly inkubovat při 37 °C. Po určité době (v čase 0; 1,5; 3; 5; 6; 15; 20; 24; 28; 41 a 48 h) byly destičky vždy vytaženy a bylo kamerou zaznamenáno krátké desetisekundové video. Potom byly destičky znovu uloženy do termostatu a znovu vyndány na další záznam. Po dokončení monitorování motility byly červy opláchnuty v PBS, posbírány do mikrozkuvek o objemu 2 ml se 100 μ l SONOPu a hned dány na suchý led. Vzorky byly dále uchovány v -80 °C a dále využity na stanovení ATP.

Data byla následně zpracována manuálně.

4.10 Testování hepatotoxicity pomocí ultratenkých řezů z ovčích jater

4.10.1 Pomůcky a přístroje

- Tkáňový kráječ (Krumdieck Tissue Slicer MD400)
- Tlaková nádoba s pneumoxidem
- Inkubátor (Biologicalthermostat BT 120M)
- Homogenizátor (MP biomedicals FastPrep)
- Centrifuga s chlazením (Heraeus Biofuge Stratos, rotor č. 3332, Thermo Fisher Scientific)
- Inkubátor s CO₂ (HERAcell)

4.10.2 Materiál a chemikálie

- EBSS pufr (1500 ml na 2-4 játra)
- 12ti jamková destička (TPP)
- Pipeta

- DMSO (Sigma-Aldrich)
- Paracetamol (Sigma-Aldrich)
- OMK3/4 (deriváty z laboratoře prof. Kurze z Německa)
- 25 mM roztok D-glukózy (Penta)
- Suplementované RPMI médium 1640
 - RPMI médium (Lonza)
 - 5 % FBS (Sigma-Aldrich)
 - 0,5 mM L-metionin (Biochemica)
 - 1 μ M insulin (Sigma-Aldrich)
 - mM hydrokortison 21-hemisukcinát (Sigma-Aldrich)
 - 50 μ g/ml gentamycin (Sigma-Aldrich)
- Sáček s roztokem Eurocollins (Sigma-Aldrich)
- 70% ethanol (lach:ner)
- Box s ledem
- Tác
- Petriho misky
- Filtrační papír
- Nůžky a pinzety
- 0,154 M KCl pufr s 20 mM Tris-HCl (pH=7,4)
- Ovčí játra

4.10.3 Příprava suplementovaného RPMI média

Příprava suplementovaného RPMI média byla provedena podle tabulky níže.

Tabulka č. 5 Příprava suplementovaného média

	Mr	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
5% FBS		5 ml	10 ml	25 ml	50 ml
0.5 mM L-metionin	149.2	0.0075 g	0.015 g	0.0375 g	0.075 g
1 μM insulin	5733.5	0.0006 g	0.0012 g	0.003 g	0.006 g
0.1 mM hydrocortison 21-hemisukcinát	484.5	0.0048 g	0.0096 g	0.024 g	0.048 g
50 μg/ml gentamycin	50 mg/ml	100 μ l	200 μ l	500 μ l	1000 μ l

4.10.4 Metodika

První den bylo do jedné 12ti jamkové destičky napipetováno 1,5 ml suplementovaného RPMI média. Do druhé 12ti jamkové destičky bylo napipetováno suplementované RPMI médium s testovanými látkami o koncentraci 1 μ M OMK3/4, jako negativní kontrola bylo použito 1 % DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 10 μ M paracetamol. Rozložený kráječ, média a pufr byly dány do chladicí místnosti.

Druhý den byl EBSS pufr s 25 mM roztokem D-glukózy probublán v tlakové nádobě s pneumoxidem (95 % O₂, 5 % CO₂) po dobu 60ti minut. Destička s médiem byla umístěna do inkubátoru na 0,5-1 hodinu. Součásti kráječe byly otřeny 70 % ethanolem, poté byl kráječ složen. Po usmrcení ovce byla vyjmuta játra, která byla vložena do plastového sáčku s roztokem Eurocollins a umístěna do chladicí nádoby s ledem. V laboratoři byla játra vložena do EBSS pufr s 25 mM roztokem D-glukózy a z jater byly ocelovým vykrajovačem o průměru 8 mm vykrojeny válečky. Válečky byly dány do nástavce na kráječi, kde byly ukrojeny řezy o tloušťce 200-250 μ m. Každý řez byl vložen do jamky v 12ti jamkové destičce s 1,5 ml suplementovaného RPMI média bez testované látky. Po 30ti minutách byly řezy přemístěny do média s testovanou látkou. Řezy v médiu s testovanou látkou byly dány inkubovat na 24 h při 37 °C při 5 % CO₂ a 95 % O₂. Po inkubaci byly řezy opláchnuty 0,154 M KCl puforem s 20 mM Tris-HCl (pH=7,4). Médium, ve kterém byly řezy inkubovány, bylo odpipetováno

a uschováno. Řezy byly homogenizovány v Tris-KCl pufru, centrifugovány po dobu 20 min při 9000 g a 4 °C. Následně byl odebrán supernatant z frakce S9 a uschován při - 20 °C.

Hepatotoxicita byla následně zjištěna změřením ATP a bílkoviny, podle stejného postupu, který je již uveden v předešlých kapitolách.

5. VÝSLEDKY

5.1 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na líhnutí vajíček

Test líhnutí vajíček byl využit pro sledování potenciálního ovicidního účinku nových derivátů OMK3 a OMK4. Deriváty byly testovány ve třech koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . Na konci experimentu byly spočítány vylíhlé larvy a nevylíhlá vajíčka. Úspěšnost líhnutí byla vyjádřena v procentech. Počet vylíhlých larev v kontrole (vajíčka inkubovaná pouze s 0,5 % DMSO) představoval 100 %. V experimentu byly rovněž použity látky s prokázaným ovicidním účinkem (OMK207 a ABZ) jako pozitivní kontrola. Test byl proveden pouze jednou na ISE a WR kmenu.

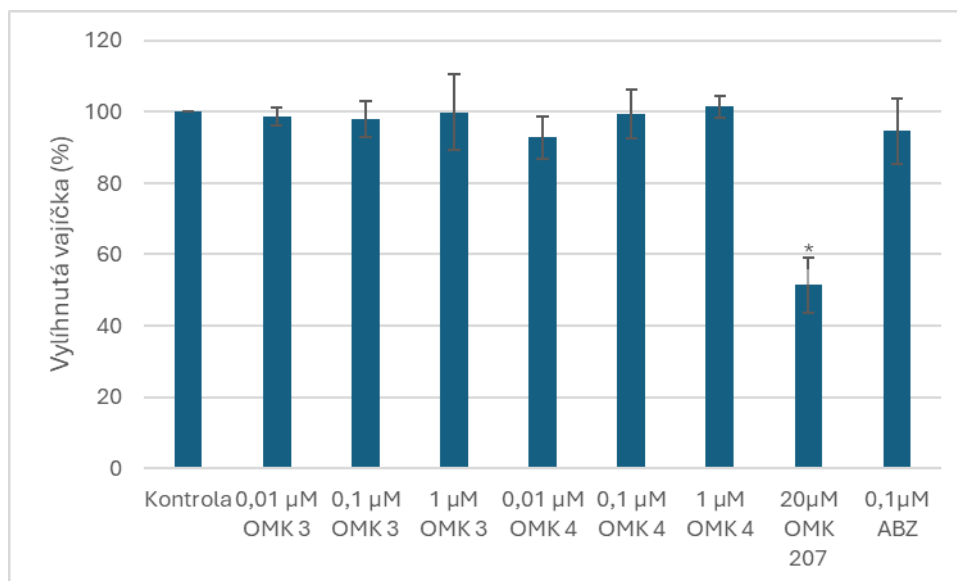
Výsledky líhnutí vajíček ISE kmene ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 6 a 7 a na obrázku 7. Jak je z výsledků patrné, nové deriváty OMK 3 a OMK4 nemají ovicidní účinek na vajíčka ISE kmene, na rozdíl od dříve testovaného derivátu OMK207. V použité koncentraci 0,1 μM ani ABZ neinhiboval líhnutí vajíček.

Tabulka č. 6 Vliv OMK3 na líhnutí vajíček ISE kmene

	kontrola	OMK3			OMK207	ABZ
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	0,1 μM
Vylíhlá vajíčka (průměr,%)	100	98,73	97,96	99,86	21,52	94,64
SD (%)	0	2,52	5,06	10,58	7,74	9,12

Tabulka č. 7 Vliv OMK4 na líhnutí vajíček ISE kmene

	kontrola	OMK4			OMK207	ABZ
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	0,1 μM
Vylíhlá vajíčka (průměr,%)	100	92,85	99,59	101,49	21,52	94,64
SD (%)	0	5,84	6,85	3,13	7,74	9,12



Obrázek č. 7 Vliv OMK3, OMK4, OMK207 a ABZ na líhnutí vajíček ISE kmene *H. contortus*. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní inhibici líhnutí vajíček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

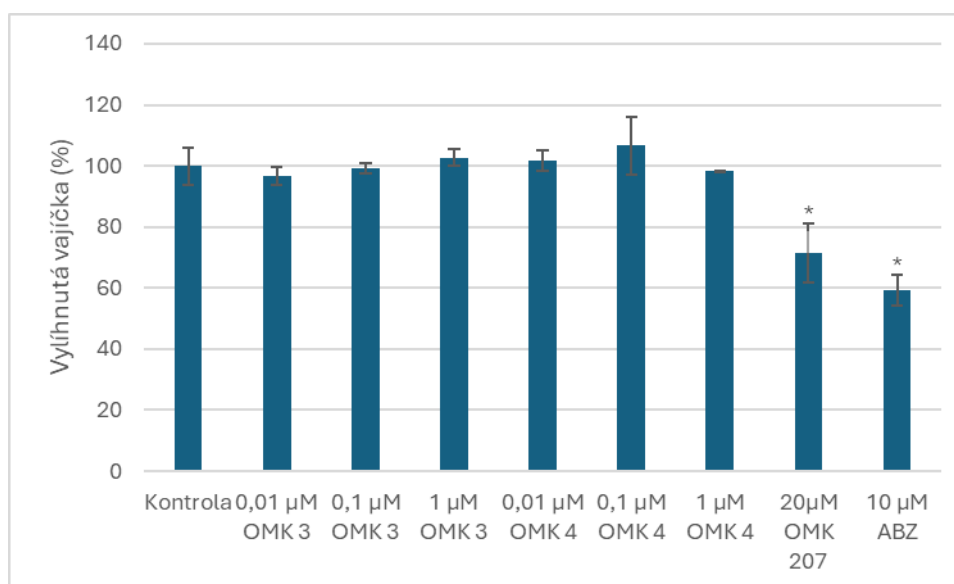
Výsledky líhnutí vajíček WR kmene ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 8 a 9 a na obrázku 8. Jak je z výsledků patrné, nové deriváty OMK3 a OMK4 nemají ovicidní účinek na vajíčka WR kmene, na rozdíl od dříve testovaného derivátu OMK207. V použité koncentraci 10 μM inhiboval líhnutí vajíček o cca 41 % oproti kontrole.

Tabulka č. 8 Vliv OMK3 na líhnutí vajíček WR kmene

	kontrola	OMK3			OMK207	ABZ
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	10 μM
Vylíhlá vajíčka (průměr,%)	100	96,56	99,27	102,7	71,48	59,31
SD (%)	6,07	2,97	1,76	2,62	9,55	5,22

Tabulka č. 9 Vliv OMK4 na líhnutí vajíček WR kmene

	kontrola	OMK4			OMK207	ABZ
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	10 μM
Vylíhlá vajíčka (průměr,%)	100	101,67	106,56	98,29	71,48	59,31
SD (%)	6,07	3,29	9,66	0,19	9,55	5,22



Obrázek č. 8 Vliv OMK3, OMK4, OMK207 a ABZ na líhnutí vajíček WR kmene *H. contortus*. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní inhibici líhnutí vajíček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

5.2 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3

Test viability larev xL3 byl využit pro sledování potenciálního anthelmintického účinku nových derivátů OMK3 a OMK4. Deriváty byly testovány ve třech koncentracích 0,01; 0,1 a 1 µM na larvách xL3 ISE a WR kmene. Na konci experimentu byla zjištěna viabilita pomocí stanovení koncentrace ATP. Naměřené koncentrace byly normalizovány vztahem na koncentraci proteinů. Viabilita byla vyjádřena v procentech. Výsledný poměr ATP/koncentrace proteinů v kontrole (larvy xL3 inkubovaná pouze s 1 % DMSO) představoval 100 %. V experimentu byl rovněž použit 10 µM levamisol jako pozitivní kontrola. Test byl proveden jednou na ISE a jednou na WR kmenu.

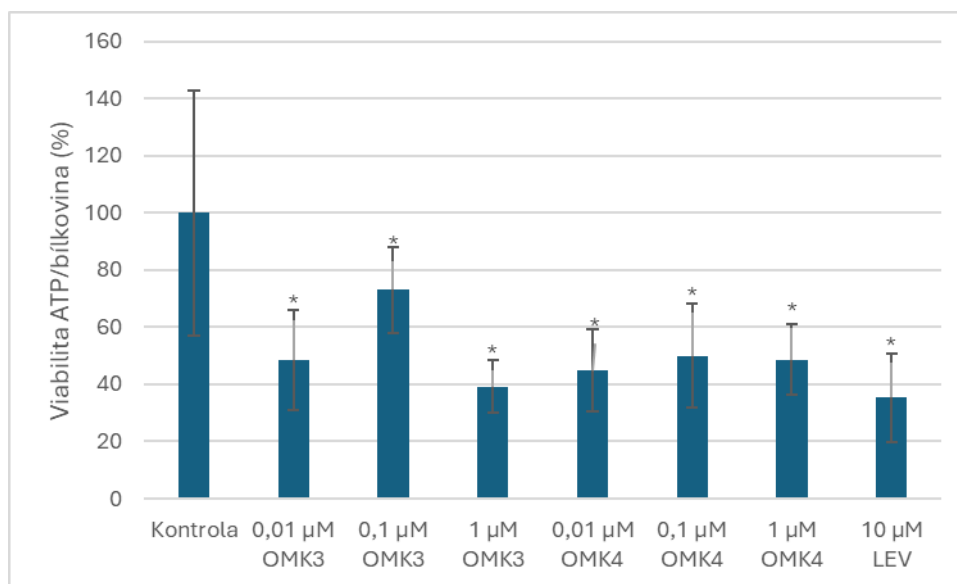
Statistická analýza byla provedena v excelu za pomoci nepárového T-testu.

Výsledky viability larev xL3 ISE kmene ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 10 a na obrázku 9. Jak je z výsledků patrné, došlo ke snížení viability vlivem téměř všech koncentrací OMK3 i OMK4. Nejvíce snížil viabilitu 10 µM levamisol

cca o 65 % oproti kontrole. Nové deriváty OMK 3 a OMK4 i ve velmi nízkých koncentracích tedy mají anthelmintický účinek na larvy xL3 ISE kmene.

Tabulka č. 10 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3 ISE kmene

	kontrola	OMK3			OMK4			LEV 10 µM
		0,01 µM	0,1 µM	1 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	
CATP (průměr±SD) [nM]	656,7 ± 116	786,82 ± 30	672,52 ± 99	576,61 ± 37	810,52 ± 115	638,4 ± 19	598,52 ± 66	409,44 ± 68
Cbílkovina (průměr±SD) [mg/ml]	26,48 ± 18	55,94 ± 16	30,68 ± 11	47,34 ± 8	61,69 ± 22	46,18 ± 19	40,86 ± 12	46,28 ± 26
Viabilita ATP/bílkovina (%±SD)	100 ± 43	48,44 ± 18	73,04 ± 15	39,263 ± 9	44,85 ± 14	50,01 ± 18	48,73 ± 13	35,31 ± 15



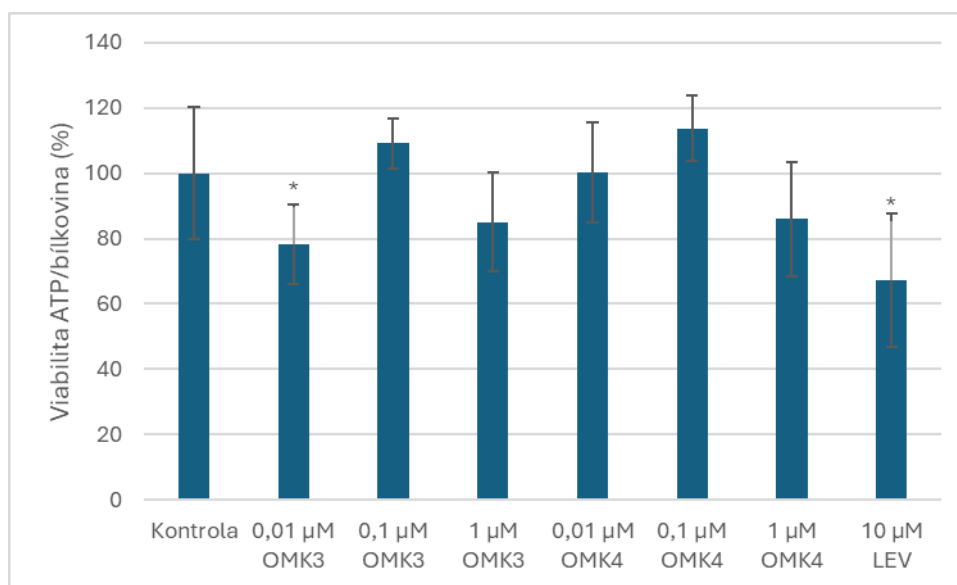
Obrázek č. 9 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na viabilitu larev xL3 *H. contortus* ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

Výsledky viability larev xL3 WR kmene ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 µM jsou uvedeny v tabulce 11 a na obrázku 10. Jak je

z výsledků patrné, deriváty pouze mírně (většinou nesignifikantně) snižovaly viabilitu larev xL3 WR kmene. 10 μ M levamisol snížil viabilitu xL3 larev WR kmene cca o 23 % oproti kontrole.

Tabulka č. 11 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3 WR kmene

	kontrola	OMK3			OMK4			LEV
		0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
CATP (průměr \pm SD) [nM]	517,59 \pm 97	499,69 \pm 74	580,4 \pm 85	404,84 \pm 45	446,67 \pm 22	426,53 \pm 40	507,19 \pm 76	374,56 \pm 27
Cbílkovina (průměr \pm SD) [mg/ml]	84,84 \pm 4	106,13 \pm 19	87,3 \pm 14	81,01 \pm 20	74,26 \pm 10	61,68 \pm 7	100,13 \pm 25	102,87 \pm 41
Viabilita ATP/bílkovina (% \pm SD)	100 \pm 20	78,21 \pm 12	109,12 \pm 7	85,03 \pm 15	100,27 \pm 15	113,7 \pm 10	85,95 \pm 17	67,09 \pm 20



Obrázek č. 10 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na viabilitu larev xL3 *H. contortus* WR kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

5.3 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu dospělců

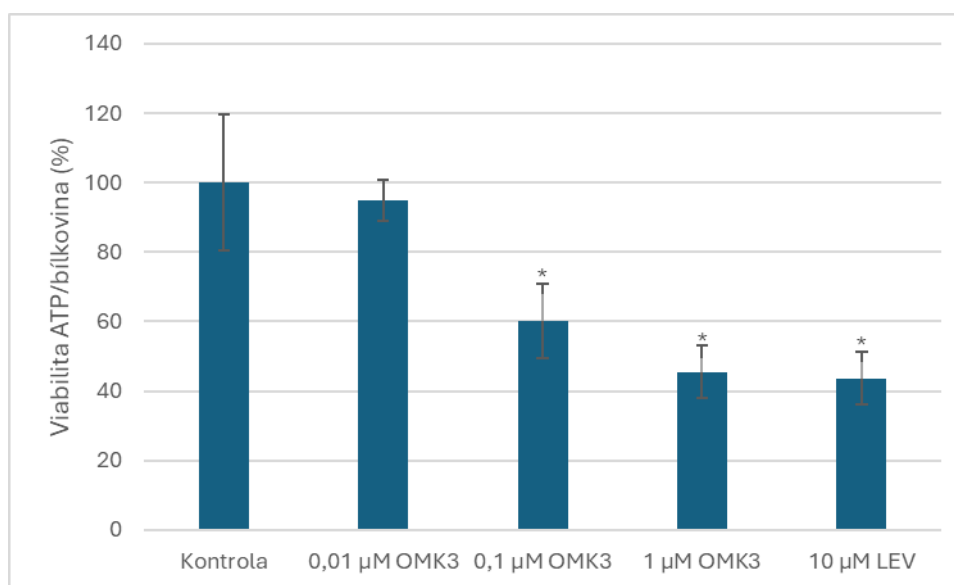
Test viability dospělců (sameček i samečeků) byl využit pro sledování potenciálního anthelmintického účinku nových derivátů OMK3 a OMK4. Deriváty byly testovány na dospělých samečcích i samičkách ve třech koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . Na konci experimentu byla zjištěna viabilita pomocí stanovení koncentrace ATP. Naměřené koncentrace byly normalizovány vztahem na koncentraci proteinů. Viabilita byla vyjádřena v procentech. Výsledný poměr ATP/koncentrace proteinů v kontrole (dospělci inkubovaní pouze s 1 % DMSO) představoval 100 %. V experimentu byl rovněž použit 10 μM levamizol jako pozitivní kontrola. Test byl proveden jednou na ISE kmenu.

Statistická analýza byla provedena v excelu za pomoci nepárového T-testu.

Výsledky viability samečeků ISE kmene ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 12; 13 a na obrázku 11; 12. Jak je z výsledků patrné, došlo ke snížení viability ve vzorcích inkubovaných s téměř všemi koncentracemi OMK3 i OMK4. S rostoucí koncentrací obou derivátů došlo k většímu poklesu viability. 10 μM levamizol snížil viabilitu cca o 56 % oproti kontrole. 1 μM OMK3 i OMK4 způsobil podobný pokles na viabilitu samečeků jako 10 μM levamizol. Nové deriváty OMK 3 a OMK4 i ve velmi nízkých koncentracích tedy mají výrazný anthelmintický účinek na dospělé samečky ISE kmene.

Tabulka č. 12 Vliv OMK3 na viabilitu dospělců sameček ISE kmene

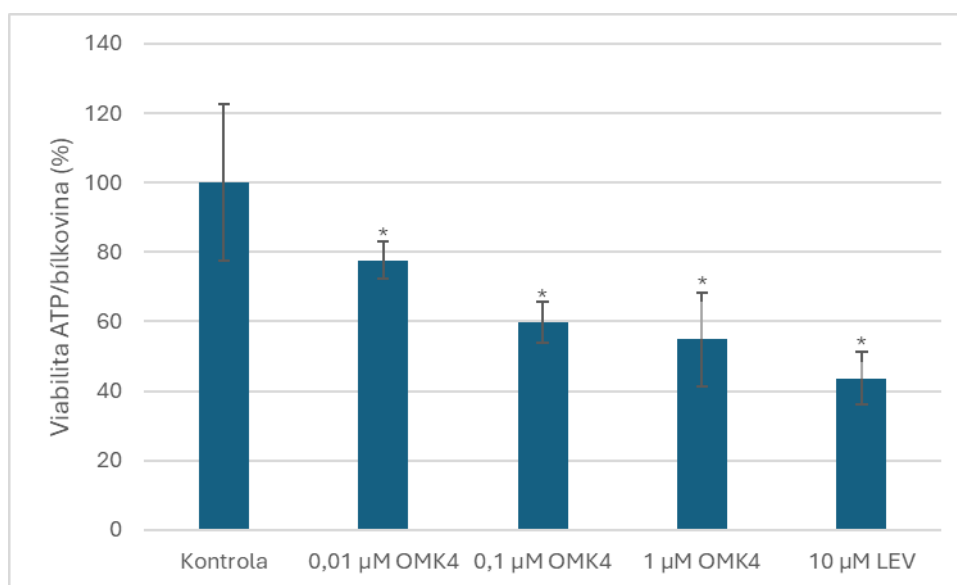
	kontrola	OMK3			LEV
		0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
C_{ATP} (průměr \pm SD) [nM]	206,63 \pm 39,67	199,3 \pm 21,78	120,44 \pm 24,59	92,9 \pm 26,24	115,7 \pm 17,92
$C_{Bílkovina}$ (průměr \pm SD) [mg/ml]	207,5 \pm 18,41	209,5 \pm 14,97	198,75 \pm 14,57	201,5 \pm 25,47	265,5 \pm 7,3
Viabilita ATP/bílkovina (% \pm SD)	100 \pm 19,65	95 \pm 5,92	60,33 \pm 10,72	45,43 \pm 7,61	43,7 \pm 7,48



Obrázek č. 11 Vliv OMK3 a LEV na viabilitu dospělců sameček *H. contortus* ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců sameček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

Tabulka č. 13 Vliv OMK4 na viabilitu dospělců sameček ISE kmene

	kontrola	OMK4			LEV
		0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
C_{ATP} (průměr \pm SD) [nM]	226,27 \pm 68,46	155,88 \pm 11,74	127,47 \pm 22,18	107,83 \pm 21,1	115,7 \pm 17,92
$C_{\text{bílkovina}}$ (průměr \pm SD) [mg/ml]	223,25 \pm 27,56	201,25 \pm 13,39	212,5 \pm 24,55	200 \pm 23,16	265,5 \pm 7,3
Viabilita ATP/bílkovina (% \pm SD)	100 \pm 22,64	77,58 \pm 5,34	59,79 \pm 6,06	54,83 \pm 13,57	43,7 \pm 7,48



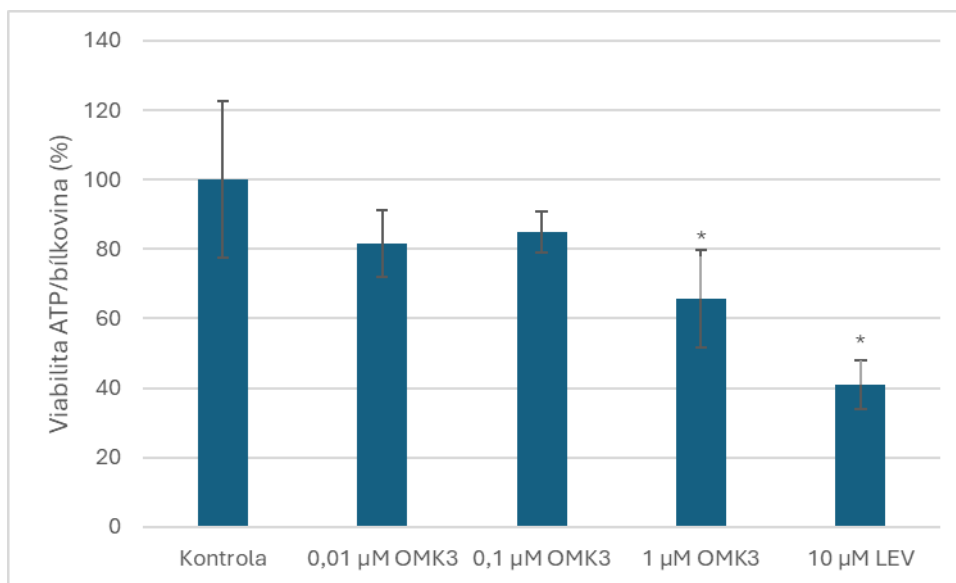
Obrázek č. 12 Vliv OMK4 a LEV na viabilitu dospělců sameček *H. contortus* ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců sameček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

Výsledky viability samic ISE kmene ovlivněné deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 14; 15 a na obrázku 13; 14. Jak je z výsledků patrné, došlo ke snížení viability u všech koncentrací OMK3 i OMK4. U OMK 3 byl pokles viability u 0,01 μ M a 0,1 μ M koncentrace podobný. Největší pokles byl zaznamenán u 1 μ M koncentrace

se snížením viability o 34 % oproti kontrole. U OMK4 s rostoucí koncentrací derivátu došlo k většímu poklesu viability. Nejvíce došlo k poklesu viability u 10 μ M levamizolu a to cca o 59 % oproti kontrole. 1 μ M OMK4 zaznamenalo podobný pokles jako 10 μ M levamizol. Nové deriváty OMK 3 a OMK4 tedy mají anthelmintický účinek na dospělé samičky ISE kmene.

Tabulka č. 14 Vliv OMK3 na viabilitu dospělých samiček ISE kmene

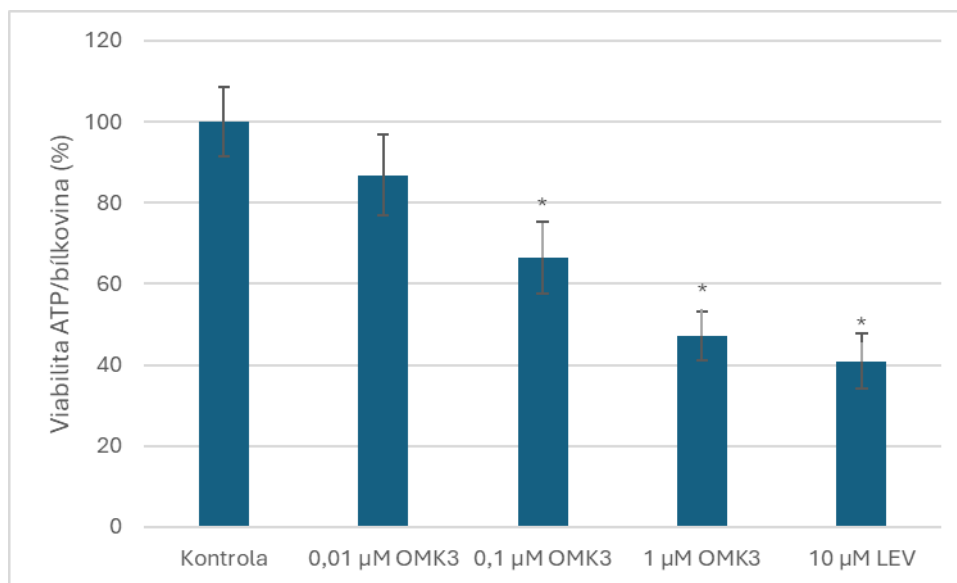
	kontrola	OMK3			LEV
		0,01 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
CATP (průměr \pm SD)	173,21	137,16	135,28	107,85	70,41
[nM]	\pm 38,85	\pm 26,06	\pm 6,59	\pm 25,23	\pm 14,83
Bílkovina (průměr \pm SD)	173,5	159	160	164	170,75
[mg/ml]	\pm 8,62	\pm 13,13	\pm 13,29	\pm 10,25	\pm 13,39
Viabilita ATP/bílkovina (% \pm SD)	100	81,54	84,96	65,73	40,93
	\pm 22,64	\pm 9,65	\pm 6,03	\pm 14,07	\pm 6,91



Obrázek č. 13 Vliv OMK3 a LEV na viabilitu dospělčů samiček *H. contortus* ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělčů samiček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

Tabulka č. 15 Vliv OMK4 na viabilitu dospělčů samiček ISE kmene

	kontrola	OMK4			LEV
		0,01 μM	0,1 μM	1 μM	10 μM
C_{ATP} (průměr±SD) [nM]	150,8 ± 12,53	138,3 ± 22,76	107,61 ± 14	79,45 ± 8,42	70,41 ± 14,83
$C_{Bílkovina}$ (průměr±SD) [mg/ml]	151 ± 6,2	158,5 ± 7,8	162,25 ± 6,06	169,5 ± 7,23	170,75 ± 13,39
Viabilita ATP/bílkovina (%±SD)	100 ± 8,69	86,79 ± 10,03	66,4 ± 8,89	47,07 ± 6,02	40,93 ± 6,91



Obrázek č. 14 Vliv OMK4 a LEV na viabilitu dospělců samiček *H. contortus* ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců samiček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

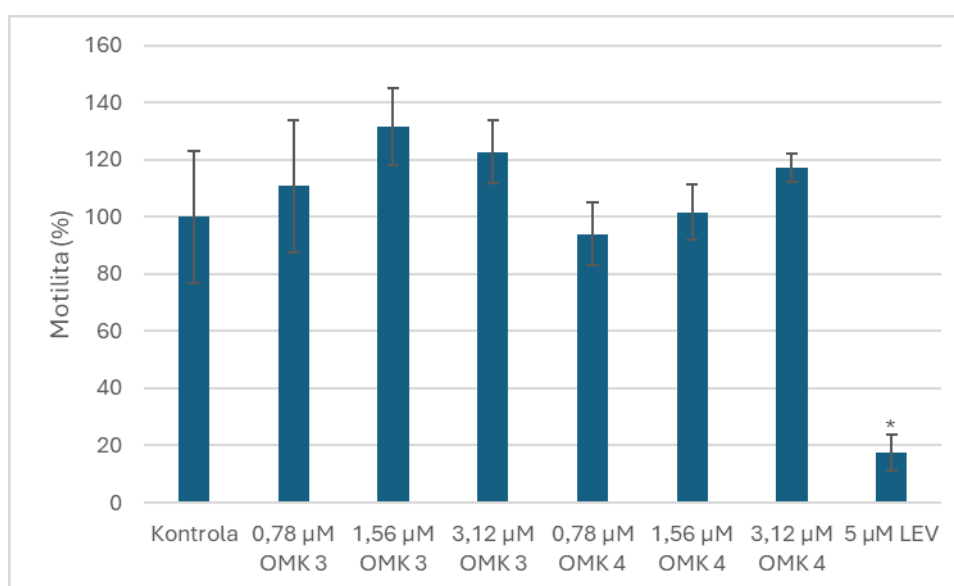
5.4 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na motilitu larev xL3

Test motility larev xL3 ISE kmene byl využit pro sledování potenciálního anthelmintického účinku nových derivátů OMK3 a OMK4. Deriváty byly testovány ve třech koncentracích 0,78; 1,56 a 3,12 µM. Na konci experimentu byly spočítány mrtvé a pohyblivé larvy. Úspěšnost motility byla vyjádřena v procentech. Počet pohyblivých larev v kontrole (vajíčka inkubovaná pouze s 1 % DMSO) představoval 100 %. V experimentu byl rovněž použit 5 µM levamizol jako pozitivní kontrola. Test byl proveden jednou na ISE kmenu.

Výsledky motility xL3 larev ISE kmene ovlivněné deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 16 a na obrázku 15. Jak je z výsledků patrné, nové deriváty OMK 3 a OMK4 nemají vliv na motilitu xL3 larev ISE kmene, na rozdíl od 5 µM levamizolu, který inhiboval motilitu o 94 % oproti kontrole.

Tabulka č. 16 Vliv OMK3 a OMK4 na motilitu larev xL3 ISE kmene

	kontrola	OMK3			OMK4			LEV 5 μ M
		0,78 μ M	1,56 μ M	3,12 μ M	0,78 μ M	1,56 μ M	3,12 μ M	
Motilita (průměr,%)	100	110,89	131,65	122,83	94,11	101,62	117,3	17,48
SD (%)	23,07	23,18	13,63	11,17	11	9,62	4,87	6,28



Obrázek č. 15 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na motilitu larev xL3 *H. contortus* ISE kmenu. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení motility larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

5.5 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na motilitu dospělců

Test pozorování motility dospělců byl využit pro sledování potenciálního anthelmintického účinku nových derivátů OMK3 a OMK4 na dospělé. Deriváty byly testovány ve třech koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μ M. Jako kontrola bylo použito 1 % DMSO. V experimentu byl rovněž použit 10 μ M levamisol jako pozitivní kontrola. Pohyblivost dospělců, kteří byli inkubováni při 37 °C, byla zaznamenána na krátká desetisekundová videa (v čase 0; 1,5; 3; 5; 6; 15; 20; 24; 28; 41 a 48 h). Test byl proveden pouze jednou na ISE a WR kmenu.

Z tohoto experimentu nevyšly žádné výsledky, jelikož se dospělci na video nehýbali už od počátečních záznamů, tedy už v čase 0 h.

5.6 Vliv derivátů OMK3 a OMK4 na viabilitu ultratenkých řezů z ovčích jater

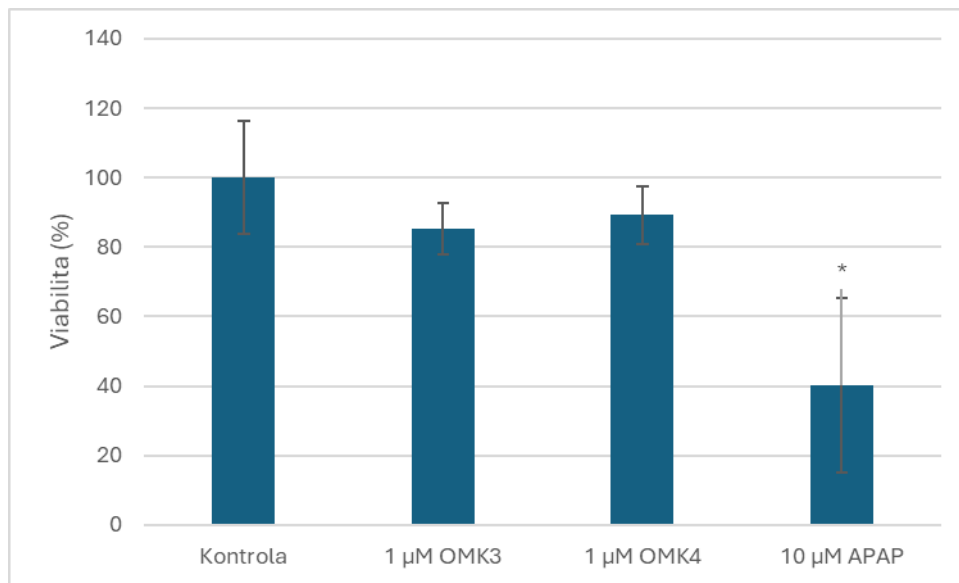
Pro sledování potencionálního hepatotoxického účinku nových derivátů OMK3 a OMK4 byly využity ultratenké řezy ovčích jater. Deriváty byly testovány v jedné koncentraci 1 μM . Na konci experimentu byla zjištěna viabilita jaterních buněk pomocí změření koncentrace ATP a bílkoviny. Viabilita byla vyjádřena v procentech. Poměr ATP/koncentrace proteinů ultratenkých řezů z ovčích jater inkubovaných v médiu pouze s 1 % DMSO představoval 100 %. V experimentu byl rovněž použit 10 μM paracetamol jako pozitivní kontrola. Test byl proveden pouze jednou pro všechny látky.

Statistická analýza byla provedena v excelu za pomoci nepárového T-testu.

Výsledky viability ultratenkých řezů ovlivněných deriváty OMK3 a OMK4 jsou uvedeny v tabulce 17 a na obrázku 16. Jak je z výsledků patrné, nové deriváty OMK 3 a OMK4 nemají hepatotoxický účinek na ovčí játra, na rozdíl od 10 μM paracetamolu, který snížil viabilitu jater o 60 %.

Tabulka č. 17 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu ultratenkých řezů

	kontrola 1 %	OMK3 1 μM	OMK4 1 μM	APAP 10 μM
Viabilita (ATP/bílkovina) (průměr, %)	100	85,26	89,27	40,31
SD (%)	16,17	7,36	8,26	25,1



Obrázek č. 16 Vliv OMK3, OMK4 a paracetamolu na viabilitu ultratenkých řezů. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Ve výsledcích je uvedena i viabilita ultratenkých řezů v čase 0 h. Hvězdička značí signifikantní snížení viability ultratenkých řezů oproti kontrole ($p \leq 0,01$).

6. DISKUSE

V průběhu let se stávají dostupná anthelmintika méně a méně účinná z důvodu narůstající lékové rezistence (Zajíčková et al., 2020). Rezistence na anthelmintika u *H. contortus* byla přitom už popsána u téměř všech tříd anthelmintik (Naeem et al., 2021). Haemonchóza přitom způsobuje velké ekonomické ztráty chovatelům přežvýkavců a stává se čím dál větším celosvětovým problémem. Proto je třeba hledat anthelmintika nová s novým mechanismem účinku. Při vývoji léčiv je také důležité kromě otestování účinnosti látek proti anthelmintům, rovněž testovat potenciaální toxicitu nového léčiva na buňky hostitele, aby bylo léčivo pro zvíře bezpečné. Protože játra jsou velmi náchylná k léčivům bývá v první řadě u potenciaálních léčiv testována jejich hepatotoxicita (Zajíčková et al., 2020; Zajíčková et al., 2022).

Pro sledování ovicidní aktivity látek OMK3 a OMK4 byla použita metoda testování líhnutí vajíček. Výhodou této metody je relativně snadné získání vajíček helmintů a jejich kultivace. Nevýhodou této metody je, že vajíčka většinou nebývají cílovým stádiem pro anthelmintika, proto také řada běžně používaných anthelmintik nemá ovicidní účinek (např. imidazothiazoly). Mezi anthelmintika s ovicidním účinkem se řadí např. benzimidazoly (Babják et al., 2021; Janošítková; 2020; Kotze a Prichard, 2016; Nguyen et al., 2021). Na základě výsledků testu líhnutí vajíček bylo zjištěno, že deriváty OMK3 a OMK4 nemají žádný vliv na líhnutí vajíček ISE ani WR kmene. Ani jeden z derivátů tedy nedisponuje ovicidním účinkem.

Dále byl u derivátů BLK3 a BLK4 sledován anthelmintický účinek metodami sledujícími životaschopnost *H. contortus*. V našem případě byl použit test motility a měření koncentrace ATP. Dále by se ještě dala pozorovat životaschopnost *H. contortus* testem vývinu larev. Stanovení koncentrace ATP je jednou z novějších metod. Velkou výhodou této metody je, že se dá použít na larvální i dospělé stádium parazita. Stanovení anthelmintické aktivity na stádiu dospělého je důležité, jelikož cílem pro anthelmintika jsou právě dospělci. Nevýhodou při testování potenciaálních anthelmintik na dospělých je relativně obtížné získání dospělců a také krátká doba jejich životaschopnosti při uchování *ex vivo* v kultivačním médiu (Nguyen et al., 2021). Metodu stanovení motility lze také použít i na dospělé stádium, ale její nevýhodou

a zároveň i nevýhodou metody testování vývinu larev je jejich pracnost a subjektivnost při vyhodnocení (Smout et al., 2010).

Stanovení životaschopnosti pomocí bioluminiscenční metody ATP je velmi citlivou a robustní metodou. Koncentrace ATP po smrti buňky velmi rychle klesá a závisí na velikosti červa. Získané hodnoty ATP musí tedy být normalizovány na celkovou koncentraci bílkoviny (Nguyen et al., 2021).

Z výsledků sledování vlivu testovaných derivátů na viabilitu larev xL3 je patrné, že deriváty OMK3 i OMK4 mají anthelmintický účinek proti xL3 larvám ISE kmene a to i ve velmi nízkých koncentracích. Naopak při testování motility na xL3 larvách ISE kmene nebyl vidět žádný účinek derivátů. Viabilitu WR kmene ovlivnily testované deriváty pouze mírně nebo vůbec. Z toho vyplývá, že by deriváty OMK3 i OMK4 nemusely vykazovat anthelmintický účinek u rezistentního WR kmene *H. contortus*, avšak bude nezbytné experiment zopakovat.

Z výsledků sledování vlivu testovaných derivátů na viabilitu dospělců je patrné, že deriváty OMK3 i OMK4 mají anthelmintický účinek proti samečkům i samičkám ISE kmene i ve velmi nízkých koncentracích. U samečků i samiček inkubovaných s látkami OMK3 a OMK4 přitom došlo k podobnému poklesu. Z toho vyplývá, že by deriváty OMK3 i OMK4 mohly mít anthelmintický účinek na samičky i samičky ISE kmene. Na dospělcích kmene WR nebylo, bohužel, možné deriváty OMK3 a OMK4 otestovat z důvodů nízkého počtu získaných jedinců.

U dospělců inkubovaných s testovanými deriváty byla také sledována motilita pomocí záznamu krátkých desetisekundových videí. Videá byla zaznamenána v několika časech (0; 1,5; 3; 5; 6; 15; 20; 24; 28; 41 a 48 h) po přidání derivátů OMK3 a OMK4 k dospělcům. Z tohoto testu, bohužel, nebyly získány žádné výsledky z důvodu špatné motility už od počátečních záznamů v čase 0 h a to včetně kontrolní skupiny.

Na základě vlivu derivátů OMK3 a OMK4 na ovčí hepatocyty bylo zjištěno, že deriváty nemají toxický účinek na ovčí játra, tudíž by mohly být použity jako potenciální anthelmintika.

Před zahájením klinického testování derivátů OMK3 a OMK4 jako potenciálních anthelmintik by bylo potřeba testy zopakovat, aby bylo více údajů o účincích derivátů

a látky mohly být prohlášeny za účinné. Dále by bylo potřeba potvrdit anthelmintický účinek na xL3 larvy ISE kmene, jelikož test stanovení ATP bioluminiscenční metodou a test motilit dávají rozdílné výsledky. Mělo by se dodělat několik testů na WR kmeni, který nebyly provedeny z důvodu nízkého počtu vyprodukovaných jedinců a zopakovat nepovedené testování motilit na dospělých. Před samotným klinickým hodnocením je potřeba potvrdit, že látky nejsou toxické pro zvířata. Následně by léčiva mohla být schválena.

Na základě nejnovějších studií bylo v poslední době testováno několik látek, které se mohou stát potenciálními anthelmintiky. Jednou z těchto látek je BLK127, která neprojevila ovicidní aktivitu, ale projevila anthelmintickou aktivitu při testování proti dospělým citlivého i rezistentního kmene. Jelikož u této látky nebyla prokázána ani hepatotoxická aktivita v koncentraci 100 μM , jeví se jako potenciální kandidát na anthelmintikum (Zajíčková et al.; 2022). V boji proti rezistenci se také využívají různé alternativní způsoby. Mezi ně patří např. rostlinná anthelmintika. V poslední době byl např. vyzkoušen účinek myrty obecné (*Myrtus communis*). Při testování byl jako *in vivo* model zvolen gastrointestinální parazit myši *Heligmosomoides polygyrus*. U silic této rostliny byly potvrzeny ovicidní účinky za pomoci testu líhnutí vajíček a anthelmintické účinky za pomoci *in vivo* testů na *H. polygyrus* (Sebai et al., 2022). Další testovanou rostlinou byla *Acacia bilimekii*. Hodnotily se ovicidní účinky hydroalkoholového extraktu, a jeho hlavní složky kyseliny p-kumurové, na vajíčkách *H. contortus* testem líhnutí vajíček. Z výsledků vyplývá, že by rostlina měla mít ovicidní účinky (Cortes-Morales et al., 2023). Také byl hodnocen účinek kombinace ivermektinu s limonenem podané ovcím nakaženým multirezistentní *H. contortus*. Zjistilo se, že limonen s ivermektinem není schopen zabít multirezistentní kmen *H. contortus*, ale snižuje kontaminaci pastvin snížením vylučování vajíček samičkami *H. contortus*. Mechanismus účinku není znám (Katiki et al., 2023).

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla testována potenciální anthelmintická účinnost a hepatotoxicita nových derivátů kyseliny benzhydroxamové OMK3 a OMK4.

- 1) Byla získána vajíčka, larvy a dospělci ISE a WR kmene *H. contortus*.
- 2) Byl sledován vliv derivátů OMK3 a OMK4 na líhnutí vajíček *H. contortus* pomocí testu líhnutí vajíček. Ani jeden z derivátů neprojevil ovicidní účinek.
- 3) Byl sledován vliv derivátů OMK3 a OMK4 na motilitu a viabilitu larev a dospělců *H. contortus*. Deriváty vykazovaly signifikantní anthelmintický účinek na xL3 larvy a dospělé *H. contortus* ISE kmene. Naopak neměly žádný vliv na viabilitu xL3 larev WR kmene a na motilitu xL3 larev ISE kmene.
- 4) Při porovnání anthelmintického účinku derivátů OMK3 a OMK4 u xL3 larev ISE a WR kmene *H. contortus* bylo zjištěno, že deriváty působí pouze na ISE kmen a na WR kmen ne. Vzhledem k tomu, že experiment byl proveden jen jednou a pouze na larvách, je nezbytné v testování derivátů na WR kmeni pokračovat.
- 5) Byly připraveny precizní jaterní řezy a bylo zjištěno, že OMK3 ani OMK4 neovlivňují jejich viabilitu.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky v AJ	Český význam
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Vlasovka slezová
Larva L1; 2; 3 a 4	--	Larva stádia 1; 2; 3 a 4
HcL4	--	Rané stádium L4
ALP	Alkaline phosphatases	Alkalická fosfatáza
AST	Aspartate aminotransferase	Aspartátaminotransferáza
ALT	Alanine aminotransferase	Alaninaminotransferáza
ISE	Inbred Susceptible Edinburgh	Citlivý kmen <i>H. contortus</i>
IRE	Inbred Resistant Edinburgh	Rezistentní kmen <i>H. contortus</i> pouze ke skupině benzimidazolů
WR	White river	Multirezistentní kmen <i>H. contortus</i>
HTS	High-throughput screening	Vysoce výkonný screening
PCLS	Precision-cut liver slice	Přecizní ultratenký jaterní řez
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-difenyltatrazoliumbromid
p.o.	Per os	Perorální podání
FECRT	Faecal egg count reduction test	Test na snížení počtu vajíček ve

		stolici
EHT	Egg hatch test	Test líhnutí vajíček
LDT	Larval development test	Test vývinu larev
BCA	Bicinchoninic acid	Kyselina bicinchinová
PBS	Phosphate Buffered Saline	Fosfátový pufr
NaCl	Sodium chloride	Chlorid sodný
ABZ	Albendazole	Albendazol
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
CO ₂	Carbon dioxide	Oxid uhličitý
NaClO	Sodium hypochlorite	Chlornan sodný
LEV	Levamisole	Levamisol
BSA	Bovine serum albumin	Hovězí sérový albumin
HCl	Hydrochlorid acid	Kyselina chlorovodíková
ddH ₂ O	Double distilled water	Dvakrát destilovaná voda (ultračistá voda)
xL3	--	Odpláštěné larvy
NaOH	Sodium hydroxide	Hydroxid sodný
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute	Buněčné kultivační médium

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Taxonomie.....	10
Tabulka č. 2 Ředění ATP standardu.....	35
Tabulka č. 3 Kalibrační křivka BCA L3.....	36
Tabulka č. 4 Kalibrační křivka BCA dospělci	39
Tabulka č. 5 Příprava suplementovaného média	44
Tabulka č. 6 Vliv OMK3 na líhnutí vajíček ISE kmene.....	46
Tabulka č. 7 Vliv OMK4 na líhnutí vajíček ISE kmene.....	46
Tabulka č. 8 Vliv OMK3 na líhnutí vajíček WR kmene.....	47
Tabulka č. 9 Vliv OMK4 na líhnutí vajíček WR kmene.....	47
Tabulka č. 10 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3 ISE kmene	49
Tabulka č. 11 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu larev xL3 WR kmene	50
Tabulka č. 12 Vliv OMK3 na viabilitu dospělců samečků ISE kmene.....	52
Tabulka č. 13 Vliv OMK4 na viabilitu dospělců samečků ISE kmene.....	53
Tabulka č. 14 Vliv OMK3 na viabilitu dospělců samiček ISE kmene	54
Tabulka č. 15 Vliv OMK4 na viabilitu dospělců samiček ISE kmene.....	55
Tabulka č. 16 Vliv OMK3 a OMK4 na motilitu larev xL3 ISE kmene	57
Tabulka č. 17 Vliv OMK3 a OMK4 na viabilitu ultratenkých řezů.....	58

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Sezónnost diagnóz <i>Haemonchus contortus</i> , VIDA (Veterinary investigation data analysis) data 2002-2022	11
Obrázek č. 2 Anatomie červa	12
Obrázek č. 3 <i>Haemonchus contortus</i>	12
Obrázek č. 4 Životní cyklus <i>Haemonchus contortus</i>	14
Obrázek č. 5 FAMACHA	16
Obrázek č. 6 Vajíčka <i>H. contortus</i>	22
Obrázek č. 7 Vliv OMK3, OMK4, OMK207 a ABZ na líhnutí vajíček ISE kmene <i>H. contortus</i> . Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní inhibici líhnutí vajíček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).....	47
Obrázek č. 8 Vliv OMK3, OMK4, OMK207 a ABZ na líhnutí vajíček WR kmene <i>H. contortus</i> . Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní inhibici líhnutí vajíček oproti kontrole ($p \leq 0,01$).....	48
Obrázek č. 9 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na viabilitu larev xL3 <i>H. contortus</i> ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).....	49
Obrázek č. 10 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na viabilitu larev xL3 <i>H. contortus</i> WR kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).....	50
Obrázek č. 11 Vliv OMK3 a LEV na viabilitu dospělců samečků <i>H. contortus</i> ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců samečků oproti kontrole ($p \leq 0,01$).	52
Obrázek č. 12 Vliv OMK4 a LEV na viabilitu dospělců samečků <i>H. contortus</i> ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců samečků oproti kontrole ($p \leq 0,01$).	53
Obrázek č. 13 Vliv OMK3 a LEV na viabilitu dospělců samic <i>H. contortus</i> ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců samic oproti kontrole ($p \leq 0,01$).	55
Obrázek č. 14 Vliv OMK4 a LEV na viabilitu dospělců samic <i>H. contortus</i> ISE kmene. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení viability dospělců samic oproti kontrole ($p \leq 0,01$).	56
Obrázek č. 15 Vliv OMK3, OMK4 a LEV na motilitu larev xL3 <i>H. contortus</i> ISE kmenu. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Hvězdička značí signifikantní snížení motility larev xL3 oproti kontrole ($p \leq 0,01$).....	57
Obrázek č. 16 Vliv OMK3, OMK4 a paracetamolu na viabilitu ultratenkých řezů. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech kontroly (= 100 %). Ve výsledcích je uvedena i viabilita ultratenkých řezů v čase 0 h. Hvězdička značí signifikantní snížení viability ultratenkých řezů oproti kontrole ($p \leq 0,01$).	59

11. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ABOELHADID, Shawky M.; ARAFA, Waleed M.; EL-ASHRAM, Saeed; NOAMAN, Asmaa Fathy; SHOKIER, Khalid A. et al. Haemonchus contortus Susceptibility and Resistance to Anthelmintics in Naturally Infected Egyptian Sheep. Online. *Acta Parasitologica*. 2021, roč. 66, č. 2, s. 329-335. ISSN 1230-2821. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00284-1>. [cit. 2024-01-29].
- 2) ADDUCI, Isabella; SAJOVITZ, Floriana; HINNEY, Barbara; LICHTMANNSPERGER, Katharina; JOACHIM, Anja et al. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against Haemonchus contortus. Online. *Animals*. 2022, roč. 12, č. 18. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani12182339>. [cit. 2023-11-26].
- 3) ASHRAF, Shoaib a PRICHARD, Roger K. Haemonchus contortus microtubules are cold resistant. Online. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014, roč. 193, č. 1, s. 20-22. ISSN 01666851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.01.006>. [cit. 2023-11-19].
- 4) BABJÁK, Michal; KÖNIGOVÁ, Alžbeta; URDA DOLINSKÁ, Michaela; KUPČINSKAS, Tomas; VADLEJCH, Jaroslav et al. Does the in vitro egg hatch test predict the failure of benzimidazole treatment in Haemonchus contortus ? Online. *Parasite*. 2021, roč. 28. ISSN 1776-1042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/parasite/2021059>. [cit. 2024-01-29].
- 5) BAPTISTIOLLI, Lillian; NARCISO, Luis Gustavo; ALMEIDA, Breno Fernando Martins de; BOSCO, Anelise Maria; SOUZA, Jucilene Conceição de et al. Systemic oxidative stress in Suffolk and Santa Ines sheep experimentally infected with Haemonchus contortus. Online. *Acta Parasitologica*. 2018, roč. 63, č. 3, s. 504-514. ISSN 1896-1851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0060>. [cit. 2024-02-20].
- 6) BASSETTO, Cesar C.; ALMEIDA, Fabiana A.; NEWLANDS, George F.J.; SMITH, W. David a AMARANTE, Alessandro F.T. Repeated vaccination against Haemonchus contortus provides continuous protection to young grazing sheep. Online. *Veterinary Parasitology*. 2020, roč. 287. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109273>. [cit. 2023-12-05].
- 7) BESIER, R.B.; KAHN, L.P.; SARGISON, N.D. a VAN WYK, J.A. Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants. Online. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. 2016a, s. 181-238. ISBN 9780128103951. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>. [cit. 2023-11-15].
- 8) BESIER, R.B.; KAHN, L.P.; SARGISON, N.D. a VAN WYK, J.A. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of Haemonchus contortus

Infection in Small Ruminants. Online. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. 2016b, s. 95-143. ISBN 9780128103951. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022>. [cit. 2024-05-13].

- 9) CARSON, Amanda; REICHEL, Rudolf; BELL, Suzie; COLLINS, Rachael; SMITH, Jasmine et al. *Haemonchus contortus*: an overview. Online. *Veterinary Record*. 2023, roč. 192, č. 1, s. 26-28. ISSN 0042-4900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/vetr.2613>. [cit. 2023-11-05].
- 10) CORTES-MORALES, Jorge A.; ZAMILPA, Alejandro; SALINAS-SÁNCHEZ, David O.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, Manasés; TAPIA-MARURI, Daniel et al. In vitro ovicidal effect of p-coumaric acid from *Acacia bilimekii* aerial parts against *Haemonchus contortus*. Online. *Veterinary Parasitology*. 2023, roč. 320. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109971>. [cit. 2024-05-02].
- 11) DANSOU, Christian Cocou; KUISEU, Julienne; OLOUNLADE, Pascal Abiodoun; AZANDO, Erick Virgile Bertrand; LAGNIKA, Latifou et al. Haemonchosis: A review on dreaded strongylosis that affects the zootechnical performance of sheep. Online. *Journal of Parasitology and Vector Biology*. 2021, roč. 13. ISSN 2141-2510. Dostupné z: <https://doi.org/10.5897/JPVB2020.0405>. [cit. 2023-11-19].
- 12) DYK, Václav; CHROUST, Karel a ZAVADIL, Rostislav. *Parazitologie a invazní choroby (vybrané kapitoly z veterinární helmintologie)*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1972.
- 13) EMERY, David L.; HUNT, Peter W. a LE JAMBRE, Leo F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? Online. *International Journal for Parasitology*. 2016, roč. 46, č. 12, s. 755-769. ISSN 00207519. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>. [cit. 2023-11-19].
- 14) ERHARDOVÁ, Božena a MÜLLER, Karel. *Veterinární antiparasitika*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1953a.
- 15) ERHARDOVÁ; KOTRLÝ; PÁV a RYŠAVÝ. *Choroby lovné zvěře*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1953b.
- 16) GOMEZ-LECHON, M.J.; LAHOZ, A.; GOMBAU, L.; CASTELL, J.V. a DONATO, M.T. In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. Online. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, roč. 16, č. 17, s. 1963-1977. ISSN 13816128. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138161210791208910>. [cit. 2024-02-20].
- 17) HOBERG, E.P. a ZARLENGA, D.S. Evolution and Biogeography of *Haemonchus contortus*. Online. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Advances in Parasitology. 2016, s. 1-30. ISBN

9780128103951. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.021>. [cit. 2024-05-13].

- 18) JABAR JASIM, H.; MIJBAS MOHAMMED ALOMARI, M.; ABBAS ALI, N.; KHALID ALANI, Z.; ABED, S. M. et al. Prevalence, Haematological and Molecular Studies of *Haemonchus contortus* Isolated from Goat at AL-Muthanna Province, Iraq. Online. 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359004.2353>. [cit. 2023-11-26].
- 19) JANOŠTÍKOVÁ, Tereza. *Principy vzniku a metody detekce rezistencí parazitických helmintů proti anthelmintikům*. Online, Bakalářská práce, vedoucí Mgr. Jiří Vore. Brno: MASARYKOVA UNIVERZITA, 2020. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/ijj15/Bakalarska_prace.pdf. [cit. 2024-05-02].
- 20) JIAO, Yaqing; PRESTON, Sarah; HOFMANN, Andreas; TAKI, Aya; BAELL, Jonathan et al. A perspective on the discovery of selected compounds with anthelmintic activity against the barber's pole worm—Where to from here? Online. *Advances in Parasitology*. 2020, s. 1-45. ISBN 9780128207505. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.12.003>. [cit. 2024-05-13].
- 21) KATIKI, L.M.; GIGLIOTI, R.; FERREIRA, J.F.S.; PACHECO, P.A.; BARBOSA, H.Z. et al. Combined effects of Limonene and Ivermectin on P-glycoprotein-9 gene expression of lambs Infected with *Haemonchus contortus*. Online. *Veterinary Parasitology*. 2023, roč. 324. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.110069>. [cit. 2024-05-02].
- 22) KOTZE, A.C. a PRICHARD, R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. Online. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. *Advances in Parasitology*. 2016, s. 397-428. ISBN 9780128103951. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>. [cit. 2024-01-19].
- 23) LEWANDOWSKI, Rory. *Use FAMACHA Correctly for Best Results: OSU Extension Educator ANR, Wayne County*. Online. In: THE OHIO STATE UNIVERSITY. 2012. Dostupné z: <https://u.osu.edu/sheep/2012/06/23/use-famacha-correctly-for-best-results/>. [cit. 2024-01-29].
- 24) MIR, M.; RASHID, M.; KATOCH, R.; RASOOL, S. a RASOOL, Ruqaya. *FIRST REPORT ON MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY OF HAEMONCHUS CONTORTUS IN SHEEP OF JAMMU (J&K) - INDIA*. Online. In: SEMANTICSCHOLAR. 2013. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/FIRST-REPORT-ON-MORPHOLOGY-AND-MORPHOMETRY-OF-IN-OF-Mir-Rashid/9cf6f0fec0a5097ac86fe7e7a9f09fca739ee12e>. [cit. 2023-11-19].
- 25) MUCHIUT, Sebastián Manuel; FERNÁNDEZ, Alicia Silvina; STEFFAN, Pedro Eduardo; RIVA, Eliana a FIEL, César Alberto. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. Online. *Veterinary*

- Parasitology*. 2018, roč. 254, s. 43-48. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.004>. [cit. 2024-05-13].
- 26) NAEEM, Muhammad; IQBAL, Zahid a ROOHI, Nabila. Ovine haemonchosis: a review. Online. *Tropical Animal Health and Production*. 2021, roč. 53, č. 1. ISSN 0049-4747. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02439-8>. [cit. 2024-01-29].
- 27) NGUYEN, Linh Thuy; ZAJÍČKOVÁ, Markéta; MAŠÁTOVÁ, Eva; MATOUŠKOVÁ, Petra a SKÁLOVÁ, Lenka. The ATP bioluminescence assay: a new application and optimization for viability testing in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. Online. *Veterinary Research*. 2021, roč. 52, č. 1. ISSN 1297-9716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00980-4>. [cit. 2024-01-19].
- 28) NICIURA, S.C.M.; CRUVINEL, G.G.; MORAES, C.V.; CHAGAS, A.C.S.; ESTEVES, S.N. et al. In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. Online. *Journal of Helminthology*. 2020, roč. 94. ISSN 0022-149X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000221>. [cit. 2023-12-14].
- 29) PARVIN, Shanaz; DEY, Anita Rani; SHOHANA, Nusrat Nowrin; ANISUZZAMAN, Md.; RONY, Sharmin Aqter et al. Ex-vivo efficacy of commercially available anthelmintics against blood feeding stomach worm *Haemonchus contortus* of ruminants. Online. *Journal of Parasitic Diseases*. 2023, roč. 47, č. 2, s. 250-256. ISSN 0971-7196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01565-y>. [cit. 2023-11-25].
- 30) PAVIČIĆ, Antonio; ZAJÍČKOVÁ, Markéta; ŠADIBOLOVÁ, Michaela; SVOBODOVÁ, Gabriela; MATOUŠKOVÁ, Petra et al. Anthelmintic activity of European fern extracts against *Haemonchus contortus*. Online. *Veterinary Research*. 2023, roč. 54, č. 1. ISSN 1297-9716. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01192-8>. [cit. 2024-01-24].
- 31) PEREIRA, J.F.S.; MENDES, J.B.; DE JONG, G.; MAIA, D.; TEIXEIRA, V.N. et al. FAMACHA© scores history of sheep characterized as resistant/resilient or susceptible to *H. contortus* in artificial infection challenge. Online. *Veterinary Parasitology*. 2016, roč. 218, s. 102-105. ISSN 03044017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.011>. [cit. 2024-05-13].
- 32) RYŠAVÝ, Bohumil. *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. ISBN 80-042-0864-9.
- 33) SEBAI, Essia; ABIDI, Amel; SERAIRI, Raja; GHAWARI, Bochra; DHIBI, Mokhtar et al. Assessment of anthelmintic potentials of *Myrtus communis* against *Haemonchus contortus* and *Heligmosomoides polygyrus*. Online. *Experimental Parasitology*. 2022, roč. 240. ISSN 00144894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108320>. [cit. 2024-05-02].

- 34) SLATHIA, Nidhi; LANGER, Seema; KATOCH, Palaq a KATOCH, Rajesh. *INTERNATIONAL JOURNAL OF RESEARCH AND ANALYTICAL REVIEWS (IJRAR): Morphological and Morphometric characterization of Haemonchus contortus found in Jammu region of J&K state*. Online. 2019, č. 6. Indie, 2019. ISSN 2348-1269. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/333918084_Morphological_and_Morphometric_characterization_of_Haemonchus_contortus_found_in_Jammu_region_of_JK_state. [cit. 2023-11-10].
- 35) SMOUT, Michael J.; KOTZE, Andrew C.; MCCARTHY, James S.; LOUKAS, Alex a KEISER, Jennifer. A Novel High Throughput Assay for Anthelmintic Drug Screening and Resistance Diagnosis by Real-Time Monitoring of Parasite Motility. Online. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010, roč. 4, č. 11. ISSN 1935-2735. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000885>. [cit. 2024-04-28].
- 36) STUHLÍKOVÁ, Lucie; JIRÁSKO, Robert; VOKŘÁL, Ivan; VALÁT, Martin; LAMKA, Jiří et al. Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). Online. *Drug Testing and Analysis*. 2014, roč. 6, č. 10, s. 1055-1062. ISSN 1942-7603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/dta.1630>. [cit. 2024-02-19].
- 37) STUHLÍKOVÁ, Lucie Raisová; MATOUŠKOVÁ, Petra; VOKŘÁL, Ivan; LAMKA, Jiří; SZOTÁKOVÁ, Barbora et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. Online. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, roč. 8, č. 1, s. 50-58. ISSN 22113207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>. [cit. 2024-01-29].
- 38) SUCHÝ, David; HORA, Milan a FÍNEK, Jindřich. VÝVOJ A KLINICKÉ HODNOCENÍ NOVÝCH LÉČIV. Online. *Česká urologie*. 2009, č. 2, s. 141-148. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-urologie/2009-2/vyvoj-a-klinicke-hodnoceni-novych-leciv-57982>. [cit. 2024-05-13].
- 39) SUN, Sujie; WANG, Jianshe; YAO, Jingzhi; GUO, Hua a DAI. Online. *Science of The Total Environment*. 2022, roč. 812. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151509>. [cit. 2024-02-20].
- 40) UNTERSWEIG, Florian; FERNER, Viktoria; WIEDERMANN, Sandra; GÖLLER, Marie; HÖRL-RANNEGGER, Marion et al. Multispecific resistance of sheep trichostrongylids in Austria. Online. *Parasite*. 2021, roč. 28. ISSN 1776-1042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/parasite/2021048>. [cit. 2024-01-30].
- 41) VOKŘÁL, IVAN; BÁRTÍKOVÁ, HANA; PRCHAL, LUKÁŠ; STUHLÍKOVÁ, LUCIE; SKÁLOVÁ, LENKA et al. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. Online. *Parasitology*. 2012, roč.

139, č. 10, s. 1309-1316. ISSN 0031-1820. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0031182012000595>. [cit. 2024-05-13].

- 42) VOKŘÁL, Ivan. Online. In: ČESKÁ PARAZITOLOGICKÁ SPOLEČNOST. Facebook. 2021. Dostupné z: <https://www.facebook.com/parazitologie.cz/photos/pb.100064859131257.-2207520000/4585529688140323/?type=3>. [cit. 2023-12-06].
- 43) ZAJÍČKOVÁ, Markéta; NGUYEN, Linh Thuy; SKÁLOVÁ, Lenka; RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, Lucie a MATOUŠKOVÁ, Petra. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. Online. *Drug Discovery Today*. 2020, roč. 25, č. 2, s. 430-437. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>. [cit. 2024-02-22].
- 44) ZAJÍČKOVÁ, Markéta; PRCHAL, Lukáš; VOKŘÁL, Ivan; NGUYEN, Linh Thuy; KURZ, Thomas et al. Assessing the Anthelmintic Candidates BLK127 and HBK4 for Their Efficacy on *Haemonchus contortus* Adults and Eggs, and Their Hepatotoxicity and Biotransformation. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 4. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040754>. [cit. 2024-01-24].