

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Testování účinnosti a toxicity nových potenciálních anthelmintik OMK1 a OMK2

Diplomová práce

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

Konzultanti: Mgr. Josef Krátký

PharmDr. Thuy Linh Nguyen, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Bc. Kateřina Junková

Poděkování

Tímto bych ráda vyjádřila upřímné poděkování paní prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Vaše odborné rady, cenné připomínky a trpělivost mi pomohly zdolat všechny překážky a dokončit tuto diplomovou práci. Velmi si vážím Vašeho času a energie, kterou jste mi věnovala.

Moje poděkování patří také mým konzultantům, Mgr. Josefovi Krátkému a PharmDr. Thuy Linh Nguyen, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a podporu během celého procesu tvoření diplomové práce. Vaše cenné rady a připomínky mi pomohly zlepšit kvalitu mé práce a posunout ji na další úroveň.

Děkuji také všem, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli s dokončením mé diplomové práce

Prohlášení

„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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2024

.....
Bc. Kateřina Junková

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kateřina Junková

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

Konzultant: Mgr. Josef Krátký, PharmDr. Thuy Linh Nguyen, Ph.D.

Název diplomové práce: **Testování účinnosti a toxicity nových potenciálních anthelmintik I**

Hlístice *Haemonchus contortus* je krev sající parazit přežvýkavců, který značně snižuje produktivitu chovů hospodářských zvířat na celém světě. Navzdory tomu, že anthelmintická léčba je klíčová pro kontrolu hemonchózy, stále častější rozvoj lékové rezistence u *H. contortus* snižuje účinnost dostupných anthelmintik. Proto je nezbytné hledat nová léčiva, která budou účinná i proti rezistentním kmenům *H. contortus*.

Teoretická část této diplomové práce předkládá stručný přehled současných možností léčby hemonchózy, včetně mechanismu účinku běžně používaných anthelmintik. Rovněž jsou představena alternativní opatření k prevenci a léčbě hemonchózy, včetně podávání rostlinných látek, vakcín a biologické kontroly, z hlediska jejich potenciálu nahradit či doplňovat anthelmintickou léčbu a tím zmírňovat rizika rozvoje rezistence.

V experimentální části byla hodnocena účinnost dvou nových potenciálních anthelmintik OMK1 a OMK2, syntetizovaných v laboratoři prof. Kurze na Univerzitě Heinricha Heina v Düsseldorfu. V našich laboratořích byla sledována účinnost OMK1 a OMK2 proti vajíčkům, larvám a dospělcům *H. contortus* kmene citlivého i kmene rezistentního na anthelmintika. Rovněž byla testována potenciální toxicita těchto látek v jaterních řezech.

Výsledky ukázaly, že OMK1 nemá ovicidní účinek, avšak OMK2 inhibuje líhnutí vajíček při koncentraci 1 μM . Vliv těchto látek na xL3 larvy byl nejednoznačný. Slibná anthelmintická aktivita OMK1 a OMK2 se jeví u dospělců *H. contortus*. U samců a samic ISE kmene došlo k poklesu viability vlivem látky OMK1 při koncentracích 0,1 a 1 μM . U samic IRE kmene OMK1 viabilitu nesnižoval, avšak u samců byl účinný

již v koncentraci 0,1 μM . Derivát OMK1 nesnižoval motilitu samic ISE kmene, avšak u samců nastal významný pokles motility vlivem OMK1. Derivát OMK2 v koncentraci 0,1 a 1 μM snižoval viabilitu dospělců obou pohlaví i kmenů. Rovněž bylo u samců i samic exponovaných OMK2 pozorováno snížení motility. Ani jeden z derivátů nevykazoval toxicitu na řezech z ovčích jater.

Z výsledků je zřejmé, že oba nové deriváty, obzvláště OMK2, mají potenciál se stát novými anthelmintiky proti *H. contortus*.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kateřina Junková

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

Consultant: Mgr. Josef Krátký, PharmDr. Thuy Linh Nguyen, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Testing of the efficacy and toxicity of new potential anthelmintics I**

Haemonchus contortus, a blood-feeding nematode of ruminants, causes significant economic losses in livestock production worldwide. Despite anthelmintic therapy being crucial for haemonchosis control, the emergence of anthelmintic resistance in *H. contortus* is increasingly compromising the efficacy of available drugs. Therefore, there is an urgent need for novel anthelmintics effective against resistant *H. contortus* strains.

The theoretical part of this thesis provides a concise overview of current treatment options for haemonchosis, including the mode of action of commonly used anthelmintics. Alternative measures for haemonchosis prevention and control, including plant-derived anthelmintics, vaccines, and biological control, are also presented in the context of their potential to replace or supplement anthelmintic therapy and thereby mitigate the risk of resistance development.

The experimental part of this thesis evaluated the efficacy of two novel potential anthelmintics, OMK1 and OMK2, synthesized in the laboratory of Prof. Kurz at Heinrich Heine University Düsseldorf. The anthelmintic activity of OMK1 and OMK2 against eggs, larvae, and adults of both susceptible and anthelmintic-resistant *H. contortus* strains was assessed in our laboratories. Additionally, the potential toxicity of these compounds was tested in liver slices.

The results demonstrated that OMK1 had no ovicidal effect, while OMK2 inhibited egg hatching at a concentration of 1 μM . The effect of these compounds on xL3 larvae

was inconclusive. Promising anthelmintic activity of OMK1 and OMK2 was observed against adult *H. contortus*. OMK1 reduced the viability of ISE strain males and females at concentrations of 0,1 and 1 μM , respectively. In IRE strain females, OMK1 did not affect viability, but was effective against males at a concentration of 0,1 μM . The OMK1 derivative did not reduce the motility of ISE strain females; however, a significant decrease in motility was observed in males exposed to OMK1. The OMK2 derivative reduced the viability of adults of both sexes and strains at concentrations of 0,1 and 1 μM . A decrease in motility was also observed in both males and females exposed to OMK2. Neither derivative exhibited toxicity to sheep liver slices.

The results suggest that both novel derivatives, particularly OMK2, hold promise as potential anthelmintics against *H. contortus*.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Haemonchus contortus.....	2
2.1.1	Výskyt.....	2
2.1.2	Morfologie	2
2.1.3	Vývojový cyklus	4
2.1.4	Hemonchóza	6
2.2	Možnosti prevence a terapie	9
2.2.1	Prevence.....	9
2.2.2	Léčba.....	10
2.3	Léková rezistence u H. contortus.....	18
2.3.1	Mechanismy rezistence	18
2.4	Vývoj nových anthelmintik	22
2.4.1	Nová anthelmintika	23
2.5	Metody testování účinnosti anthelmintik.....	27
2.5.1	Stanovení ATP	27
2.5.2	Test líhnutí vajíček (EHT)	29
2.5.3	Test vývoje larev (LDT)	30
2.5.4	Test migrace larev (LMIA).....	30
2.5.5	Testování motility	31
2.5.6	Sledování počtu vajíček v trusu infikovaných zvířat (FECRT).....	31
2.5.7	Molekulární diagnostika	32
2.5.8	Testování hepatotoxicity	32
3	Cíl práce.....	33
4	Experimentální část	34
4.1	Používané materiály a přístroje.....	34
4.1.1	Přístroje	34
4.1.2	Pomůcky	34
4.1.3	Chemikálie	35

4.1.4	Biologický materiál.....	36
4.2	Metodika práce	37
4.2.1	Příprava roztoků.....	37
4.2.2	Získ biologického materiálu	38
4.2.3	Test líhnutí vajíček.....	42
4.2.4	Stanovení účinnosti OMK1 a OMK2 u larev	42
4.2.5	Stanovení účinnosti OMK1 a OMK2 u dospělců	45
4.2.6	Stanovení motility.....	46
4.2.7	Stanovení účinku OMK1 a OMK2 na jaterní řezy	47
4.2.8	Statistická analýza dat.....	49
5	Výsledky.....	50
5.1	Vliv OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček	50
5.1.1	ISE kmen.....	50
5.1.2	WR kmen	52
5.2	Vliv OMK1 a OMK2 na viabilitu a motilitu xL3 larev	54
5.2.1	ISE kmen.....	54
5.2.2	WR kmen	59
5.3	Vliv OMK1 a OMK2 na viabilitu dospělců.....	63
5.3.1	ISE kmen.....	63
5.3.2	IRE kmen	66
5.4	Vliv OMK1 a OMK2 na motilitu dospělců	69
5.4.1	Samice ISE kmene	69
5.4.2	Samci ISE kmene.....	70
5.5	Vliv OMK1 a OMK2 na viabilitu jaterní řezů.....	73
6	Diskuse	74
7	Závěr.....	78
8	Seznam zkratk.....	79
9	Seznam obrázků.....	81
10	Seznam tabulek.....	83

11 Použitá literatura.....	84
----------------------------	----

1 Úvod

Parazitické infekce, zejména ty způsobené gastrointestinálními hlísticemi, představují významnou hrozbu pro zdraví a produktivitu hospodářských zvířat na celém světě. Mezi těmito parazity je *Haemonchus contortus* považován za jednoho z hlavních patogenů postihující malé přežvýkavce, mezi které patří například ovce a kozy.

Anthelmintika jsou zpravidla prostředky první volby při kontrole infekcí způsobených *H. contortus*. Avšak vznik lékové rezistence podtrhl naléhavou potřebu nových léčiv, která budou účinná i u rezistentních kmenů *H. contortus*.

Tato diplomová práce se zaměřuje na testování účinnosti a toxicity nových potenciálních anthelmintik cílených proti tomuto parazitovi. S ohledem na klesající účinnost stávajících anthelmintik představuje intenzivní vývoj nových léčiv příslib řešení problémů způsobených kmeny parazitů, které jsou odolné proti dostupným léčivům. V této práci byla posouzena účinnost dvou nových potenciálních anthelmintik OMK1 a OMK2 u citlivých i rezistentních kmenů *H. contortus*.

Zavedení nových anthelmintik do veterinární praxe vyžaduje přísné hodnocení, aby se zajistila jejich účinnost a současně i bezpečnost. Proto byla rovněž testována potenciální hepatotoxicita u obou nových sloučenin.

Objasněním účinnosti a toxicity těchto nových potenciálních anthelmintik si tato diplomová práce klade za cíl poskytnout cenné poznatky o vhodnosti jejich dalšího výzkumu a budoucího využití pro praktickou aplikaci při léčbě hemonchózy. Úspěšný vývoj a nasazení účinných a bezpečných anthelmintik jsou zásadní pro ochranu zdraví a dobrých životních podmínek pro populace malých přežvýkavců, a též jsou podstatné pro minimalizování finanční ztráty farmářů.

2 Teoretická část

2.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus neboli vlasovka slézová, jak zní její český název, je helmint z kmene *Nematoda* a čeledi *Trichostrongylidae* (Rudolphi, 1803). Jedná se o jednoho z nejvýznamnějších parazitů malých přežvýkavců, nejčastěji ovcí a koz, který žije v jejich gastrointestinálním traktu (Besier et al., 2016; Geary, 2016).

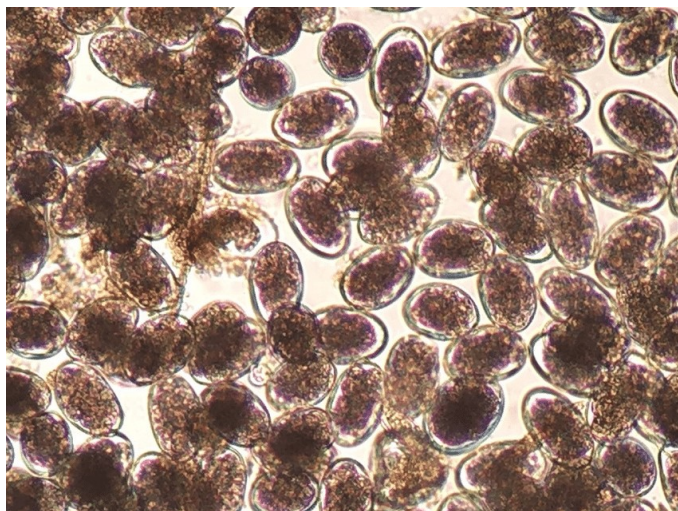
H. contortus se stal jedním z nejvíce studovaných *Trichostrongylidů* také díky jeho schopnosti přizpůsobovat se. Tato schopnost umožnila *H. contortus* se bránit účinkům hlavních tříd nejčastěji používaných léčiv, což vede k selhání účinnosti terapie a s tím souvisejícím značným ekonomickým ztrátám chovatelů těchto malých přežvýkavců. *H. contortus* je také vhodným experimentálním modelem z pohledu biologie a fyziologie, jelikož oplývá vysokou plodností. Dalším pozitivem se jeví i to, že se jím hostující organismus lehce nakazí, a tak je možné získat i několik tisíc červů z hostitelských zvířat, nemluvě o velkém množství larev a vajíček (Kotze & Prichard, 2016).

2.1.1 Výskyt

Volně žijícím stádiím *H. contortus* vyhovuje teplé a vlhké prostředí. Proto se hojně vyskytuje v oblastech tropického klimatického pásma obou polokoulí planety Země. Jelikož je *H. contortus* velmi přizpůsobivý v širokém spektru prostředí, kde i prokázal své výborné adaptivní mechanismy, tak se nyní nachází téměř ve všech oblastech, kde se chovají malí přežvýkavci, bez ohledu na klimatické pásmo (Besier et al., 2016).

2.1.2 Morfologie

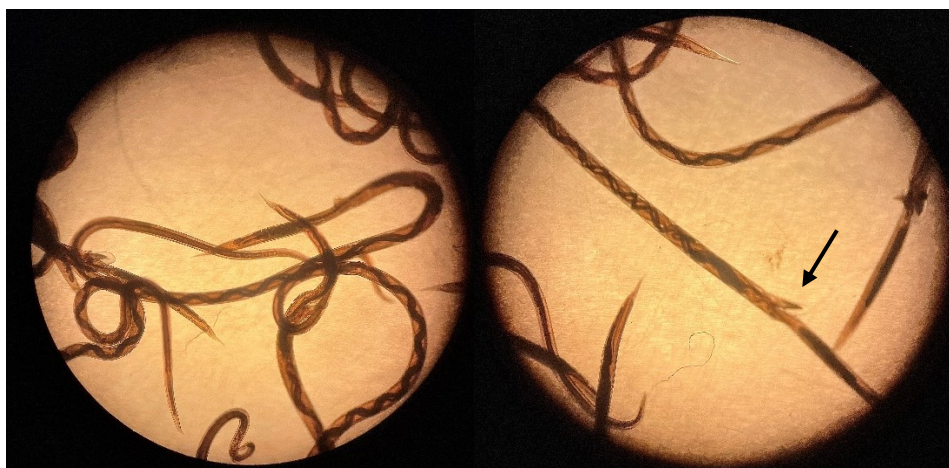
Vajíčka tohoto parazita jsou oválná, často s jednou stranou více zakřivenou. Vajíčko má průměrnou délku $70 \pm 10 \mu\text{m}$ a šířku $\pm 45 \mu\text{m}$. Barva obalu vajíček v čerstvém trusu je udávána od mírně nažloutlé přes průhlednou. Při pohledu pod mikroskopem si můžeme všimnout zrnitého vzhledu vajíčka viz obrázek 1, který je daný tím, že se jedná o blastomeru (Ljungström et al., 2018; Veglia, 1916).



Obrázek 1: Vajíčka *Haemonchus contortus*

Zdroj: převzato z https://www.researchgate.net/figure/Haemonchus-eggs-as-seen-during-microscopic-observation-75-45-mm_fig2_348951348

Dospělec *H. contortus* je nitkovitý červ, který měří 1-3 cm. Parazit má válcovité tělo, které se zužuje směrem dopředu. Malá ústní dutina je opatřena zubem lancetového typu, který slouží pro sání kapilární krve ze stěny žaludku. Zbarvení těla je bělavě žluté, avšak požitá krev mu dodává načervenalý nádech (Naeem et al., 2021).

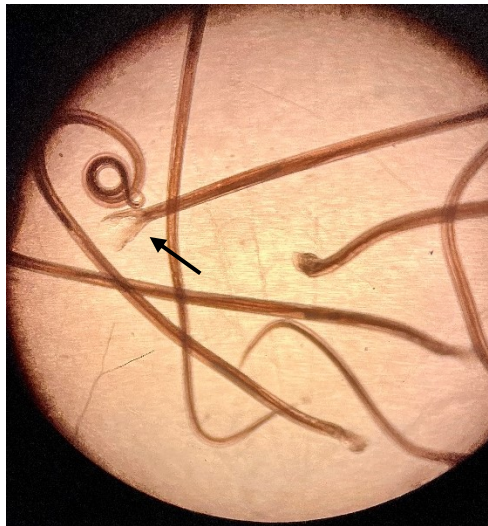


Obrázek 2: Morfologie samice, její pohlavní ústrojí

Zdroj: vlastní

Na konci těla samce se vyskytuje laločnatá genitální burza. Samičky mají směrem k zadnímu konci těla vulvální váčky, které využívají k rozmnožování. Krví naplněné střevo u samic s bílou dělohou, zdůrazňuje spirálovou vlnovku vedoucí skrze tělo, která je pro samice typická viz předcházející obrázek 2 (Naeem et al., 2021).

Samečci bývají většinou menší než samičky. Na následujícím obrázku 3 můžeme sledovat vzhled a bursu u samce. Odlišnost mezi samičkami a samečkami můžeme spatřit nejenom v délce těla, ale i v jeho šířce, dále pak v přítomnosti burzy u samců a vulvy u samic. (Widiarso et al., 2018)



Obrázek 3: Morfologie samce, bursa

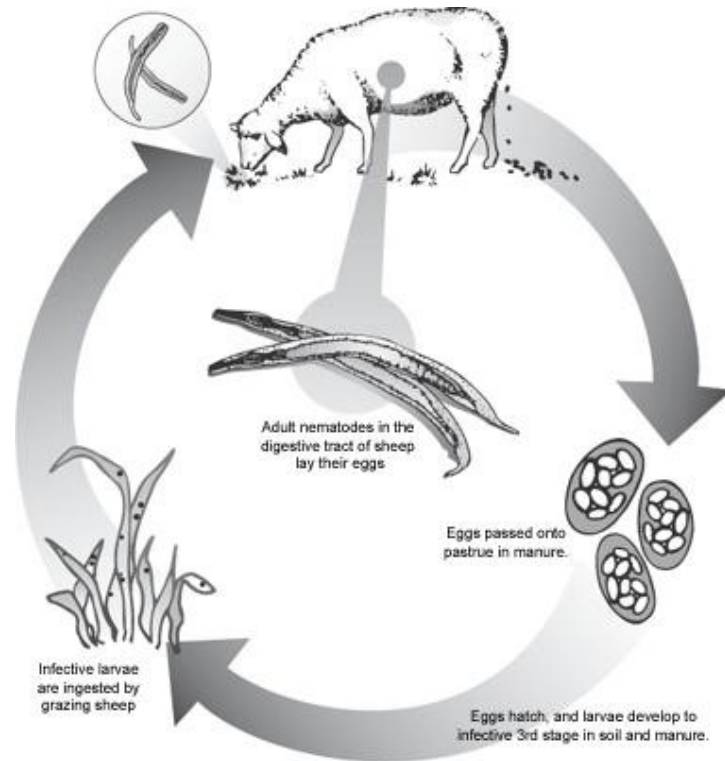
Zdroj: vlastní

2.1.3 Vývojový cyklus

Každé jednotlivé stádium *H. contortus* potřebuje jiné životní podmínky pro svůj život. Volně žijící stádia, tj. vajíčka, larvy prvního stádia (L1), larvy druhého stádia (L2), larvy třetího stádia (L3) a parazitující stádia, tj. larvy čtvrtého stádia (L4) a dospělci, potřebují odlišné fyzikální i chemické podmínky pro své přežití, jako například pO₂, pCO₂, pH, osmotický tlak, redoxní potenciál i teplotu (Besier et al., 2016; Harder, 2016).

Vývojový cyklus je přímý, tudíž probíhá bez mezihostitele. Nákaza se přenáší horizontálně pastvou zvířat na travnatých pastvinách infekčními L3. Životní cyklus tohoto parazita se skládá se dvou fází, a to života parazita ve slezu hostitele a života mimo

hostitele, jak můžeme vidět na následujícím obrázku. Doba tohoto cyklu se udává okolo dvaceti dní (Besier et al., 2016; Ehsan et al., 2020; Emery et al., 2016).



Obrázek 4: Životní cyklus *H. contortus*

Vajíčka z trusu infikují rostliny na pastvě, tyto rostliny jsou poté pozřeny zvířaty, následně se parazit usídí ve slezu, kde dospívá a produkuje nová vajíčka

Zdroj: převzato z https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT1HH8qCnkLGccOoZo3F5Q3JPqmpR4jmJKUoHcfwCGq28_dOZvA

Životní cyklus začíná, když se dospělí samci a samice pohlavně rozmnožují v hostitelském slezu. Odhaduje se, že průměrná samička vyprodukuje 5 000-15 000 vajíček za den. Vajíčka se dostávají na pastvinu skrze trus nakažených zvířat. Z vajíček se během 4-6 dnů vyvinou L1 a L2, a tyto larvy se začnou živit bakteriemi v trusu. Zajímavostí je, že čím je vajíčko menší, tím kratší dobu trvá, než se larva vylíhne, avšak čím je vajíčko větší, tím spíše se dokáže larva vylíhnout i při nižších teplotách. Larvy L2 se vyvíjí do L3 za optimálních teplotních podmínek 24-29 °C, ale stále

si ponechávají kutikulu z předchozího vývojového stádia (Ehsan et al., 2020; Emery et al., 2016).

L3 jsou infekčním stádiem a jsou pozřeny zvířetem spolu s rostlinnou stravou. Po požití L3 o dalším průběhu vývoje infekce rozhoduje řada faktorů, které ovlivňují přežití a usazení těchto larev v hostiteli. Mezi tyto faktory spadá věk, plemeno, zdravotní stav a výživa hostitele. Tyto faktory ovlivňují schopnost ovce vyvolat imunitní reakci proti larvám *H. contortus*. Pokud nedojde k optimální imunitní odpovědi, tak L3 putují až do slezu. Ve slezu tyto larvy svlékají svou kutikulu a zavrtávají se do jeho vnitřní stěny. V L4 stádium se obvykle vyvíjí během 48 hodin, jedná se o první stádium živící se krví hostitelského organismu. Následuje stádium časně dospělosti (L5) a stádium pozdní dospělosti, během těchto stádií se červi živí krví svého hostitele (Arsenopoulos et al., 2021; Ehsan et al., 2020; Emery et al., 2016; Flay et al., 2022; Harder, 2016).

Hlavním zdrojem energie pro *H. contortus*, jakožto i pro mnohé další krev-sající organismy, jsou živiny z krve. Krev savců se vyznačuje relativně konstantním pH a obsahuje hojné množství glukózy, aminokyselin, vitamínů a dalších živin, které může být jednoduše absorbované hlístem (Harder, 2016).

Pokud infekční L3 či L4 larvy nemají optimální podmínky pro svůj rozvoj, tak nemusí pokračovat ve svém vývoji. Tento jev nazýváme zástavou vývoje, kdy tyto larvy mohou spočinout v žaludeční sliznici slezu. Jedná se o stádium, ve kterém parazit „spí“, nezpůsobuje onemocnění a není metabolicky aktivní (Ehsan et al., 2020).

2.1.4 Hemonchóza

Jak už bylo zmíněno, *H. contortus* patří k nejvíce patogenním parazitům malých přežvýkavců, nejenom díky značné spotřebě krve hostitele, ale i díky své schopnosti se rychle množit za podmínek vhodných pro rozvoj tohoto parazita. Důležité je zmínit, že dospělý jedinec *H. contortus* je schopen denně odsát až 30 μ l krve, což při silné infekci, kdy ve slezu může parazitovat i více než 10 000 jedinců *H. contortus*, může vést ke smrti hostitele (Besier et al., 2016).

Klinické příznaky hemonchózy souvisí především s projevy anémie. Anémie bývá poprvé zachycena 10 až 12 dní po propuknutí infekce. Další příznaky, které se u infikovaného zvířete nacházejí, jsou eozinofilie a hypoproteinemie, které mají

za následek bledé sliznice a submandibulární edém. Všechny tyto příznaky se často používají i k diagnóze tohoto onemocnění (Adduci et al., 2022; Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016; Emery et al., 2016). Mezi doprovodné symptomy řadíme ztrátu chuti k jídlu, zhoršené vstřebávání živin, zakrnělý růst, slabost, chudokrevnost, špatnou plodnost a často i smrt jehňat (Naeem et al., 2021).

Hemonchóza se vyskytuje hlavně u neimunizovaných mladých zvířat a u dospělých jedinců s oslabeným imunitním systémem. Závažnost onemocnění úzce souvisí s počtem červů. Počet parazitů v hostiteli lze odhadnout na základě korelace mezi ztrátou krve a počtem dospělých červů. Výsledný dopad infekce je dán příjmem infekčních larev, odolností hostitele proti infekci a schopností krvetvorby, a tím pádem nahrazením ztracené krve (Adduci et al., 2022; Besier et al., 2016).

Existují tři kategorie hemonchózy, které se dělí dle závažnosti infekce a reakce hostitele, a to: chronická, akutní a hyperakutní.

Hyperakutní forma bývá relativně vzácná. Masivní ztráta krve v důsledku parazitózy způsobuje hemoragickou gastritidu, což přispívá ke chronické gastritidě. Úmrtí často nastává náhle a bez varovných příznaků, kdy se nakažený hostitel může zhroutit a uhynout během několika hodin či dní. Pokud hostitel přežije hyperakutní formu, tak se u něho vyskytuje mnoho známek závažné anémie. Diagnóza je jednoznačná při provedení nekropsie, jelikož se na povrchu sliznice nachází velké množství červů a na sliznici lze nalézt zjevné krvácení (Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016).

Při akutní hemonchóze se rovněž rozvíjí anémie, avšak rozvoj onemocnění trvá delší dobu. K úmrtí může dojít během 4-6 týdnů od infekce. Tento časový údaj závisí na množství přijatých a uchycených larev. Ve slezu jednoho hostitele může být přítomno i 20 000 červů, přičemž počet vajíček ve fekáliích bývá okolo 50 000 vajíček na gram trusu (Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016).

Infekce s menším, avšak přetrvávajícím výskytem parazita je označována jako chronická hemonchóza, která může probíhat i bez zjevných symptomů. Příznaků chronické hemonchózy si můžeme povšimnout v případě, že dojde k zvýšenému příjmu larev a tím pádem i navýšení množství červů v žaludku, nebo při špatné výživě zvířete, kvůli které se hostiteli sníží schopnost úspěšně odolávat parazitovi. Výživa zvířat hraje důležitou roli v toleranci infekce, jelikož počínající hemonchózu může urychlit

nedostatek kvalitního krmiva (Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016). Existuje studie, která tvrdí, že pokud budeme chovat zvíře v ohradě s extrémně nízkým příjmem bílkovin, tak odolnost proti parazitovi rapidně klesá, oproti skupině zvířat, která dostávala doplňky stravy, i přes fakt, že se tyto skupiny nemusí lišit v počtu červů na zvíře (Nnadi et al., 2009).

2.2 Možnosti prevence a terapie

2.2.1 Prevence

Většina strategií, které slouží k prevenci a kontrole hemonchózy, není zaměřena pouze na parazita *H. contortus*, ale spíše na všechny trichostrongyloidy a všeobecně i na další gastrointestinální hlístice (Adduci et al., 2022).

Hemonchóza by měla být v ideálním případě kontrolována takovým způsobem, aby byla zachována jak produktivita, tak i zdraví zvířat bez zjevného rozvoje rezistence u *H. contortus*. Toho lze dosáhnout pomocí strategie, která zahrnuje několik typů přístupů, místo spoléhání se na jednu jedinou možnost. Mezi tato opatření spadají optimalizace anthelmintické léčby, nutriční suplementace, genetická selekce, vakcinace a management pastev (Adduci et al., 2022).

Na celém světě malí přežvýkavci pobývají na pastvách, proto je důležité dbát na správný management pastev. Důležitým principem je minimalizace kontaktu přežvýkavců s infekčními L3 larvami (Adduci et al., 2022; Naeem et al., 2021).

Optimalizovaná výživa zvířete ovlivňuje jeho celkovou kvalitu života, proto je i jedním z klíčových faktorů pro odolnost proti infekcím gastrointestinálního traktu. Bylo dokázáno, že potrava bohatá na proteiny zvyšuje imunitu přežvýkavců, kteří se díky této suplementaci dokážou snáze bránit parazitóze (Adduci et al., 2022).

Genetická selekce, která se soustředí na vlastnosti vedoucí k zvýšení odolnosti zvířete vůči nákaze, je velmi slibnou strategií, jelikož jsou tyto vlastnosti dědičné. Příkladem může být provedené pozorování, které zjistilo, že ovce srstnatých plemen jsou více odolné proti *H. contortus* než jiná plemena (Adduci et al., 2022; Besier et al., 2016; Preston & Allonby, 1979).

Vakcinace proti hemonchóze rozšiřuje možnosti prevence. Očkování se ukazuje slibným pro vyvolání ochranné imunitní reakce hostitele. Tento přístup se často využívá na farmách, kde se vyskytují multirezistentní kmeny. Příkladem těchto vakcín mohou být Barbervax® a WormVax. Tyto vakcíny obsahují dva nativní integrální proteiny H11 a H-gal-GP, které pocházejí ze střevní membrány *H. contortus*. V procesu testování je DNA vakcína, u které je zatím uváděna pouze částečná ochrana zvířat. Nevýhodou vakcinace

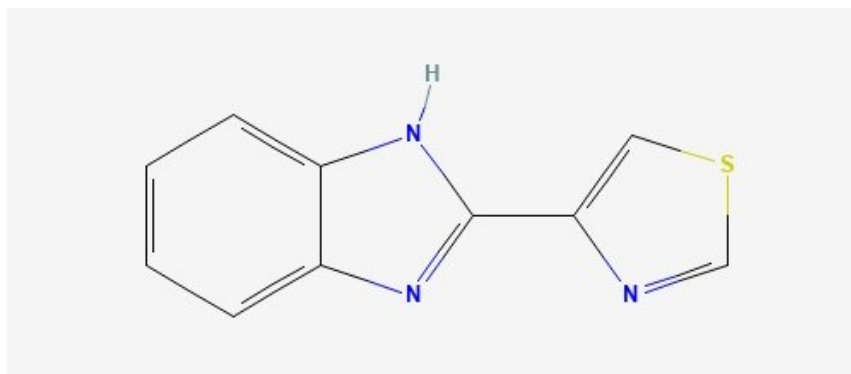
proti hemonchóze je její vysoká cena (Adduci et al., 2022; Ehsan et al., 2020; Nisbet et al., 2016).

2.2.2 Léčba

Existuje několik druhů léčebných postupů při hemonchóze. Jednou z často používaných praktik je pravidelné odčervování všech zvířat ve stádě pomocí anthelmintik (Naeem et al., 2021). Anthelmintika jsou léčivé látky, které jsou využívány pro terapii a profylaxi parazitóz, přesněji pro zahubení červů a jejich infekčních stádií. Jsou to látky často syntetického či biosyntetického původu. Většina z nich působí současně nejen proti více třídám červů, ale i proti původcům zevních parazitóz. Nejčastěji jsou využívána anthelmintika z těchto skupin léčiv, a to benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony, z nichž všechna zmíněná anthelmintika jsou širokospektrá. Při volbě, která anthelmintika použít, je nutné vzít v úvahu, jestli je infekce akutní či je užití indikováno z preventivního důvodu. Dále by se mělo brát v úvahu ekonomické hledisko léčby a též by se nemělo zapomínat na potenciální rozvoj rezistence (Baltrušis et al., 2018; Dobšíková R et al., 2012; Kaplan, 2004).

2.2.2.1 Benzimidazoly

Většina anthelmintik byla objevena v 60. a 70. létech 20. století. Jinak tomu není ani u skupiny benzimidazolů, která byla objevena na počátku 60. let (Prichard & Geary, 2008). Tehdy bylo světu představeno první širokospektrální anthelmintikum thiabendazol, struktura viz obrázek 5. Dokázalo se, že se jedná o bezpečné léčivo, které lze snadno podat zvířatům a je velmi účinné proti širokému spektru parazitů, a i jejich volně žijícím stádiím. Po tomto úspěchu následoval vývoj dalších léčiv z této skupiny, dnes užívanými léčivy jsou například albendazol, fenbendazol, oxfendazol a mebendazol (Besier et al., 2016).



Obrázek: 5 Struktura thiabendazolu

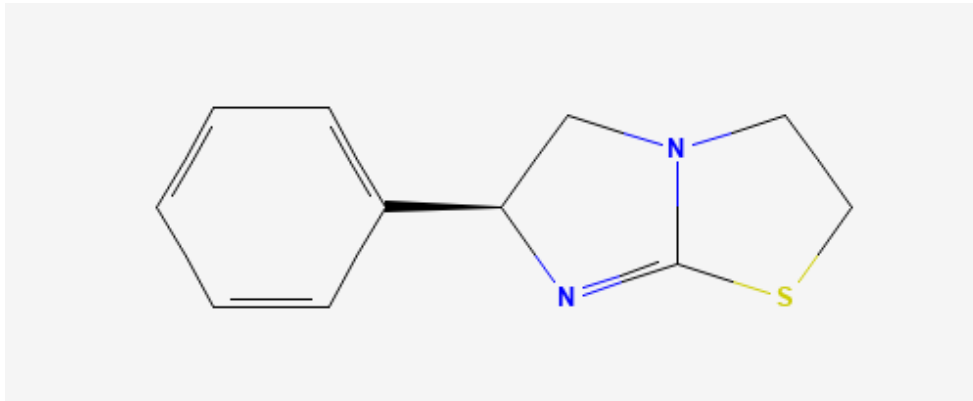
Zdroj: přejato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=5430&t=l>

Mechanismus účinku léčiva je založen na inhibici polymerace mikrotubulů. Ztráta cytoplazmatických mikrotubulů tegumentálních (= termín v helmintologii pro vnější pokrývku těla u červů (Wendt et al., 2018)) a střevních buněk tasemnic a nematodů způsobí snížené vstřebávání glukózy a zvýšenou utilizaci uloženého glykogenu, což způsobí nedostatečnou výživu parazita a následně jeho úhyn (Besier et al., 2016; Dobšíková R et al., 2012; Martin, 1997).

Vzhledem k dostupnosti a častému využívání těchto léčiv je již několik let rozvinuta celosvětová rezistence u helmintů vůči této skupině anthelmintik. Při samostatném užití benzimidazolů málo kdy nastane žádaný účinek, proto jsou často kombinované s účinnými látkami z jiných skupin anthelmintik (Besier et al., 2016).

2.2.2.2 Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Imidazothiazoly byly syntetizovány koncem 60. let jako širokospektrální anthelmintika. Levamisol, struktura viz následující obrázek 6, je nejrozšířenější zástupce imidazothiazolů. Jedná se o léčivo s účinností proti řadě parazitárních druhů včetně plicních a gastrointestinálních nematod. Levamisol je účinný jak proti dospělým stádiím gastrointestinálních hlístic, tak i proti larválním stádiím. Velkou výhodou této látky je flexibilita v možnostech podávání. Může se podávat jak orálně, tak i subkutánně, přičemž účinnost orální léčby je nižší. I když se rezistence projevila i u levamisolu, tak výsledky terénních testů poukazují na to, že *H. contortus* zůstal delší dobu citlivý na levamisol než na jiná používaná léčiva (Besier et al., 2016; Lanusse et al., 2016).



Obrázek 6: Struktura levamisolu

Zdroj: převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=26879&t=l>

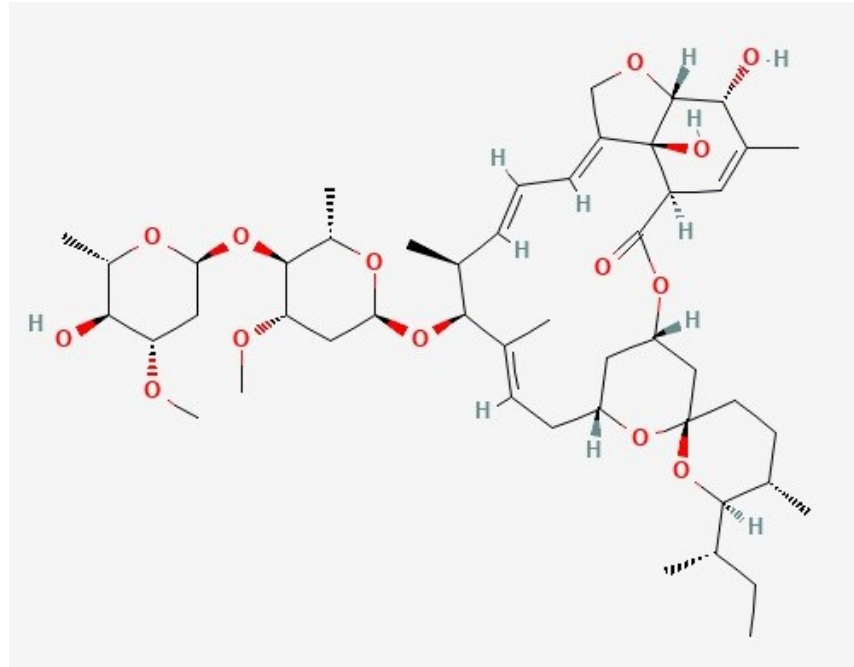
Jelikož je levamisol agonista cholinergních receptorů, tak u hlístic vyvolává spastickou svalovou paralýzu, která je způsobena prodlouženou aktivací excitačního nikotinového acetylcholinového receptoru na svalové stěně hlístic. Levamisol ovlivňuje neuromuskulární koordinaci, což zapříčiní spastickou paralýzu a rychlé uvolnění dospělého červa ze slezu (Lanusse et al., 2016).

2.2.2.3 Makrocyclické laktony

Ivermektin byl představen na trhu počátkem 80. let 20. století. Toto léčivo bylo účinné proti většině druhů hlístic, a též proti některým ektoparazitům. Tato skutečnost odstartovala novou éru v anthelmintické léčbě. Rodina avermektinů zahrnuje řadu přírodních a polysyntetických molekul, mezi které patří abamektin, ivermektin, eprinomektin, selamektin a daramektin. Jak již bylo zmíněno ivermektin byl první molekulou endektocidu na trhu, jeho strukturu můžeme vidět na obrázku 7 (Besier et al., 2016; Lanusse et al., 2016).

I přes to že tato skupina zahrnuje strukturně různé látky, tak všechny tyto látky sdílejí stejný mechanismus účinku. Makrocyclické laktony snižují motorickou aktivitu a způsobují paralýzu u hlístic i členovců. Paralýza je způsobena především narušením glutamát-řízených chloridových kanálů, které se stanou propustnými pro chloridové ionty. Vlivem zvýšeného influxu chloridových iontů v neuronu, dojde k hyperpolarizaci a ke snížení převodu nervového impulzu s navozením totální svalové paralýzy u všech

stádií parazita, a následnému vypuzení parazita z těla ven (Besier et al., 2016; Dobšíková R et al., 2012; Lanusse et al., 2016; Prichard & Geary, 2008).



Obrázek 7: Struktura ivermektinu

Zdroj: převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=6321424&t=1>

Makrocyclické laktony jsou velice účinné proti larválním i dospělým stádiím většiny gastrointestinálních a plicních červů. Velkou výhodou je, že mají prodloužený ochranný účinek díky farmakokinetickému chování těchto látek. Makrocyclické laktony jsou vysoce lipofilní a jsou extenzivně distribuovány krevním řečištěm do různých tkání. Přetrvání anthelmintického účinku proti GIT parazitům je způsobeno tím, že tato léčiva déle zůstávají ve sliznicích trávicího traktu. Dlouhou perzistenci u makrocyclických laktonů vysvětluje jejich široká tkáňová distribuce, nízký metabolismus, nízká clearance a enterohepatální vstřebávání (Lanusse et al., 2016).

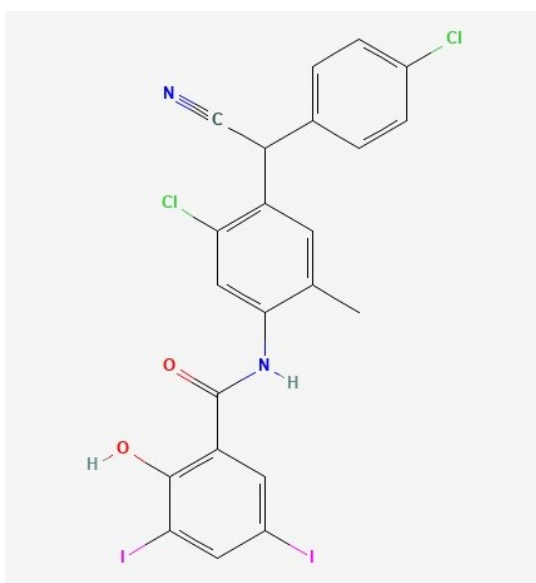
2.2.2.4 Organofosfáty

Organofosfáty mají nematocidní i insekticidní aktivitu. Nejčastěji používanými organofosfáty proti helmintům u přežvýkavců jsou haloxon, naftalofos a kumafos (Lanusse et al., 2016).

Mechanismus účinku souvisí s nevratnou inhibicí acetylcholinesterázy pomocí fosforylace, což způsobuje akumulaci acetylcholinu v cholinergních receptorech. V důsledku akumulace acetylcholinu nastane paralýza a následná smrt parazita. Celkově jsou účinky organofosfátů při perorálním podání poměrně uspokojivé proti parazitům slezu a tenkého střeva, ale nejsou již tak úspěšné u parazitů tlustého střeva (Lanusse et al., 2016).

2.2.2.5 Salicylanilidy

Tato skupina zahrnuje řadu sloučenin, které působí inhibici energetického metabolismu (Besier et al., 2016). Nejpoužívanější salicylanilidovou sloučeninou je klosantel, jehož strukturu můžeme vidět na následujícím obrázku 8. Tato látka je určena pro perorální i intramuskulární podání. Klosantel je úzkospektrální anthelmintikum se specifickou aktivitou proti hlístům, kteří se živí krví, proto je využíván i pro léčbu hemonchózy. Používá se jako alternativní léčba, pokud je parazit na ostatní léčiva rezistentní (Lanusse et al., 2016).



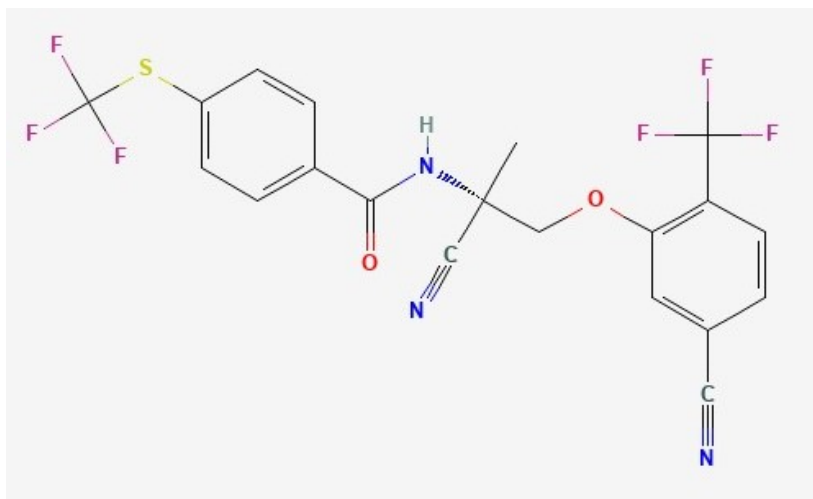
Obrázek 8: Struktura klosantelu

Zdroj: převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=42574&t=l>

Mechanismus účinku salicylanilidů spočívá v rozpojení oxidační fosforylace. Farmakokinetické chování klosantelu je charakteristické vazbou na plazmatické proteiny, nízkým distribučním objemem a dlouhým poločasem eliminace. Toto léčivo dokáže dlouhou dobu (u ovcí až 90 dní) setrvat v systémové cirkulaci, díky čemu se v organismu akumuluje a zabíjí cílové parazity. Právě proto je tato látka vysoce účinná jak proti dospělcům, tak i proti nižším vývojovým stádiím *H. contortus*. V těle hostitele zůstává ještě další 28 dní po léčbě. Při *in vivo* podmínkách bylo zjištěno, že k vypuzení *H. contortus* dojde, jakmile je motilita ovlivněna klosantelem (Lanusse et al., 2016).

2.2.2.6 Aminoacetonitrilové deriváty

Jediným členem této skupiny je monepantel, který byl na trhu představen jako nový typ anthelmintika téměř po 30 letech, a to koncem roku 2000 (Besier et al., 2016). Monepantel je účinný proti larválním i dospělým stádiím gastrointestinálních hlístic. Používá se u ovcí, které jsou rezistentní vůči dostupným anthelmintikům z ostatních skupin léčiv. Struktura monepantelu je představena na následujícím obrázku 9.



Obrázek 9: Struktura monepantelu

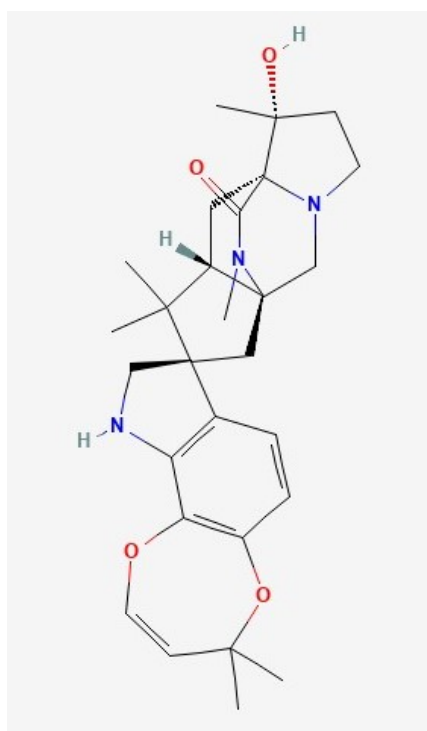
Zdroj: převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=44449087&t=1>

Monepantel funguje jako agonista nikotinového acetylcholinového receptoru a způsobí spastickou paralýzu a následnou smrt červů. Studie účinnosti potvrdila, že i přes skutečnost, že monepantel sulfon (hlavní metabolit) je detekovatelný 9-12 dní

po podání, je monepantel krátkodobě působící léčivo s anthelmintickou aktivitou (Lanusse et al., 2016).

2.2.2.7 *Spiroindoly*

Hlavní zástupce spiroindolů je semisyntetický derivát paraherquamidu s názvem derquantel, jehož strukturu můžeme vidět na následujícím obrázku 10 (Lanusse et al., 2016).



Obrázek 10: Struktura derquantelu

Zdroj: převzato z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=25154194&t=1>

Dequantel funguje jako nikotinový cholinergní antagonist, který způsobuje flacidní paralýzu nematod. Jelikož se jedná o odlišný způsob účinku, tak je toto anthelmintikum účinné i u rezistentních kmenů hád'átek (Lanusse et al., 2016).

Ve snaze optimalizace anthelmintické aktivity se dequantel kombinuje s abamektinem. Z důvodu, že samotný dequantel není účinný proti všem hád'átkům, zvláště proti larválním stádiím některých druhů. Ve vícero studiích bylo dokázáno, že tato kombinace léčiv je vysoce účinná proti kmenům hlístic i s rozvinutou lékovou rezistencí

(Besier et al., 2016; Little et al., 2011). Například proti *H. contortus* byla účinnost při současném použití dequantelu a abamectinu, 98,9 %. (Lanusse et al., 2016)

2.2.2.8 Ostatní

Přístup, který bere anthelmintickou léčbu jako základní kámen pro léčbu helmintóz, je dlouhodobě neudržitelný, a je nutné využívat i jiné strategie. Důležitost managementu pastvin, nutriční výživy, vakcinace a genetické selekce již byla zmíněna v předešlé podkapitole. Avšak existují ještě další strategie léčby, které nezahrnují anthelmintika, takovýmto příkladem může být biologická kontrola (Besier et al., 2016).

Biologická kontrola je alternativní přístup, který může doplnit anthelmintickou léčbu. Tento přístup zahrnuje zejména nematofágní houby a bioaktivní rostliny, které se vyskytují na pastvách. Účinek hub, které se přirozeně vyskytují na pastvách, spočívá v tom, že jejich hyfy zachycují infekční larvy, pronikají do jejich těl a tím je usmrtí. Proti larvám působí několik druhů hub, například *Duddingtonia flagrans*, a stále se pátrá i po dalších houbách (Besier et al., 2016; Comans-Pérez et al., 2021).

Také je známo, že existuje několik druhů rostlin vyskytujících se na pastvách, které obsahují bioaktivní chemické látky, zejména kondenzované fenolické sloučeniny taninu, které jsou spojené se sníženým výskytem hlístic u přežvýkavců na těchto pastvinách (Besier et al., 2016).

2.3 Léková rezistence u *H. contortus*

Haemonchus contortus má vysokou prevalenci a patogenitu. Kontrola těchto parazitárních infekcí je založena na strategickém použití anthelmintik. Při častém užívání určitého druhu anthelmintik může dojít u helminta k rozvoji rezistence, kvůli které není léčba účinná. Helminti mohou využívat řadu různých strategií ke snížení citlivosti na použité léčivo. Tyto strategie zahrnují modifikaci cíle léčiva, zvýšený počet cílových míst, zvýšený eflux léčiva, změny metabolismu (inaktivace, odstranění nebo zabránění aktivace léčiva) či sekvestraci léčiva (Harder, 2016).

Bohužel, odolnost parazitických hlístic vůči používaným anthelmintikům je velmi rozšířená a taky se rozvíjí velmi rychle. Například rozvoj rezistence na monepantel trval méně jak čtyři roky od jeho uvedení na trh (Partridge et al., 2020; Zajíčková et al., 2021).

Kmeny, u kterých se vyskytuje rezistence na více skupin anthelmintik nazýváme multirezistentními. Některé multirezistentní kmeny jsou schopné odolávat všem v současnosti dostupným anthelmintikům (Hounzangbe-Adote et al., 2005).

Jeden z faktorů přispívajících ke vzniku rezistence je léčba zvířete nižšími dávkami anthelmintik. Vznik rezistence v důsledku nedostatečné terapeutické dávky, je známý už dlouhou dobu. Tento problém býval velice častý v minulosti, při dávkování se často nedodržovala vhodná dávka a podceňovala se hmotnost zvířat. V současné době se klade důraz na správné dávkování, tudíž by tento faktor neměl hrát významnou roli ve vzniku rezistence. Výjimkou mohou být nekvalitní produkty, kdy jsou zvířatům nevědomky aplikovány nižší terapeutické dávky (Besier et al., 2016).

2.3.1 Mechanismy rezistence

Vznik rezistence je závažným problémem, proto je velmi nutné porozumět mechanismům rezistence helmintů na léčiva. Studie prokázaly rezistenci *H. contortus* vůči každé z hlavních chemických skupin anthelmintik (Kotze & Prichard, 2016).

2.3.1.1 Benzimidazoly

První, kteří popsali přímou souvislost s rezistencí benzimidazolů s jejich cílem (β -tubulinem), byli v roce 1986 Lacey a Prichard. Tito autoři pozorovali snížení vaznosti tritria na β -tubulin označených benzimidazolů u rezistentních typů *H. contortus*

v porovnání s těmi citlivými. Další studie se věnovala molekulární podstatě změny v přenosu genu, který kóduje izotyp 1 β -tubulinu z benzimidazol-senzitivního kmene *H. contortus* na benzimidazol-rezistentní kmen *Caenorhabditis elegans*. Tento gen poskytl benzimidazol-rezistentním helmintům citlivost vůči těmto léčivům. Nahrazení aminokyseliny tyrosinu fenylalaninem v pozici genu 200 β -tubulinu u *H. contortus* po mutaci *in vitro* vedlo ke ztrátě rezistence u tohoto kmene. I jiné mutace v izotypu 1 u *H. contortus* jsou spojeny s benzimidazolovou rezistencí. Dalším příkladem může být bodová mutace kodonu 167, kde dochází k náhradě fenylalaninu za tyrosin, a také bodovou mutaci na kodonu 198, u kterého nastala substituce alaninu kyselinou glutamovou. Po vyšetření všech genotypů, bylo zjištěno, že se na jedné alele nevyskytuje více jak jedna mutace, což poukazuje na teorii, že by mnohočetné mutace v těchto kodonech mohly být letální (Arsenopoulos et al., 2021; Harder, 2016; Stuchlíková et al., 2018).

2.3.1.2 Imidazothiazoly

Nejčastěji používané anthelmintikum z této skupiny je levamisol. Sangster et. al. studovali, které mechanismy rezistence se uplatňují u *H. contortus* při užívání levamisolu. Pozorovali reakce tohoto parazita *in vitro* po přidání acetylcholinu, což poukázalo na vztah imidazothiazolů s cholinergními receptory. Následující studie u této skupiny léčiv objevila sníženou afinitu levamisolu na nikotinové acetylcholinové receptory u dospělých *H. contortus*, u kterých se projevila rezistence na imidazothiazoly, v porovnání s těmi, které jsou na tato léčiva citlivé (Arsenopoulos et al., 2021; Kotze & Prichard, 2016; Sangster, Riley, et al., 1998). Z výše uvedených informací lze usuzovat, že odolnost tohoto parazita proti imidazothiazolům je založena na změnách acetylcholinových receptorů. Studie způsobu dědičnosti rezistence dokazuje, že režim rezistence na imidazothiazoly je polygenní (Arsenopoulos et al., 2021; Kotze & Prichard, 2016; Sangster, Redwin, et al., 1998).

Studie, které byly provedené v posledních letech objasnily mechanismus rozvoje rezistence z molekulárního hlediska. Dle výsledků těchto studií je příčina mutace v genech, které kódují podjednotky nikotinového acetylcholinového receptoru, což způsobí změnu afinity léčiva/receptoru. Konkrétní mutované geny, které byly zjištěny u rezistentních kmenů, jsou Hco-unc-63 a Hco-acr-8, zatímco u citlivých kmenů chyběly. Tyto geny kódují produkci proteinu, který se váže na nikotinové acetylcholinové

receptory, a tudíž zabraňují vazbě levamisolu na receptor (Arsenopoulos et al., 2021; Beech et al., 1994; Kotze & Prichard, 2016).

Boulin et al. došli k závěru, že pouze heterozygotní parazit, u kterého se vyskytuje jak mutovaný, tak nemutovaný protein, může odolat levamisolu. Na tuto informaci přišli v průběhu studie, kde byl zkoumán účinek Hco-unc-63 mutantního proteinu na schopnost levamisolu vázat se na nikotinové acetylcholinové receptory u citlivých parazitických kmenů (Arsenopoulos et al., 2021; Boulin et al., 2011).

Sarai et al. zjistili, že se vyskytuje pokles exprese všech čtyř typů genů Hco-unc-29 (Hco-unc-29,1; -29,2; -29,3; -29,4) u dospělců rezistentního kmene *H. contortus*. Zaměřili se na subpopulace tohoto kmene a vyzorovali vyšší rezistenci na imidazothiazol v subpopulacích, u kterých byla zjištěna snížená exprese genů, které kódují nikotinové acetylcholinové receptory, konkrétně Hco-unc-63a; -63b; -29,2; -29,4; -26 a -acr-8a (Arsenopoulos et al., 2021; Kotze & Prichard, 2016; Sarai et al., 2013).

Všechny navrhované mechanismy rezistence na imidazothiazoly jsou spojeny s hypofunkcí nikotinového acetylcholinového receptoru. Avšak existují pravděpodobně další, dosud neobjasněné mechanismy. Například po vyšetření dvou kmenů rezistentních na levamisol se našel zmutovaný gen nikotinového acetylcholinového receptoru pouze u jednoho rezistentního kmene. Ani Williamson et al. nedokázali prokázat mutaci genu nikotinového acetylcholinového receptoru u kmene *H. contortus* rezistentního na levamisol (Williamson et al., 2011). Naopak Sarai et al. identifikovali tuto mutaci nejen u tří rezistentních, ale i jednoho citlivého kmene tohoto parazita (Arsenopoulos et al., 2021; Kotze & Prichard, 2016; Sarai et al., 2013).

2.3.1.3 Makrocyclické laktony

I u makrocyclických laktonů byl též podrobně studován mechanismus rezistence. Studie Rohrera et al. vyloučila domněnku, že je tato rezistence způsobena změnami cílového místa v membráně, jelikož nebyly zjištěny rozdíly ve vazbě ivermektinu na glutamát-řízené chloridové kanály mezi rezistentními a citlivými kmeny (Kotze & Prichard, 2016; Rohrer et al., 1994).

Avšak při jiném pozorování, které prováděli Blackhall et al., byla pozorována zvýšená frekvence alely v α -podjednotce genu, který kóduje již výše zmíněné glutamát-

řízené chloridové kanály. Toto zvýšení se vyskytovalo u kmene *H. contortus*, který vykazoval rezistenci vůči ivermektinu a moxidektinu (Blackhall et al., 1998a). McCaver a jeho kolegové soustředili svou pozornost na aminokyselinové složení tohoto kanálu a objevili, že substituce specifických aminokyselin v kodonu L256 genu pro glutamát-řízené chloridové kanály vedla ke snížení vazby ivermektinu na buněčnou membránu (McCavera et al., 2009). Tato mutace však nebyla nalezena u kmenů rezistentních na makrocyclické laktony (Blackhall et al., 1998). Tyto dvě studie se shodují na tom, že mutace genů, které kódují receptor γ -aminomáselné kyseliny, může být spojena s rezistencí vůči této třídě anthelmintik, ale není jediným mechanismem, který se na rezistenci vůči avermektinům podílí (Arsenopoulos et al., 2021).

Několik studií poukazuje na roli efluxních transportérů (P-glykoproteinů) v rozvoji rezistence na makrocyclické laktony. Analýza objevila polymorfismy související s rezistencí v genech několika P-glykoproteinů. Zároveň byla popsána zvýšená exprese P-glykoproteinů u rezistentních kmenů. Expozice larev a dospělých jedinců makrocyclickým laktonům vedla k nadměrné expresi P-glykoproteinů. Některé inhibitory P-glykoproteinů mohou navýšit citlivost *H. contortus* k makrocyclickým laktonům, jak *in vivo*, tak i *in vitro* (Arsenopoulos et al., 2021; W. Blackhall, 1998; Lespine et al., 2012). Lifschitz et al. potvrdili výše uvedené informace ve své studii, kde došli k závěru, že inhibitory P-glykoproteinů mohou zvýšit účinnost makrocyclických laktonů proti *H. contortus* (Lifschitz et al., 2010).

2.4 Vývoj nových anthelmintik

Vlivem masivního podávání anthelmintik se účinnost anthelmintik snižuje, a proto je nutné vyvíjet nová léčiva (Nixon et al., 2020).

Existuje celá řada faktorů, procesů a překážek, které ovlivňují objevení a vývoj anthelmintik. Sloučenina, představující nové potenciální anthelmintikum, podléhá nesčetnému množství cyklů optimalizace z důvodu zlepšení účinnosti, bezpečnosti, farmakokinetiky a farmakodynamiky. Nakonec léčivo ještě musí projít regulačními předpisy, průběžnou farmakovalidací a dalšími podmínkami pro registraci (Nixon et al., 2020).

Pro vývoj anthelmintik se tradičně využívají empirické testy, které jsou prováděny na základě změny fenotypu helminta po účinku testované látky. Testy se zaměřují nejčastěji na motilitu, vývoj larev a letalitu. Výhodou tohoto přístupu je, že se účinnost nové látky zkoumá na více jedincích, nikoli pouze na jednom parazitovi. Avšak velkou nevýhodou se jeví, že helminti musí být izolováni z hostitele a následně je nutné je udržovat na živu. Některé druhy v určité životní fázi je velmi obtížné či téměř nemožné získat a udržovat je na živu. Tyto skutečnosti podstatně zvyšují náklady na objevení nového anthelmintika ve srovnání například s antibiotiky, u kterých testování na bakteriích vychází podstatně levněji (Nixon et al., 2020).

H. contortus se používá jako základní model a cílový organismus pro testování nových potenciálních léčiv proti hlísticím. Je to z důvodu jeho velikosti, plodnosti a poměrně nízké ceny jeho hostitele (ovce) ve srovnání s dobyt看kem. Při vývoji léčiv proti *H. contortus* jsou využívány tři hlavní přístupy: screening na larvách pro prvotní testování velkého počtu látek, studie *ex vivo* používající dospělé a studie *in vivo* za použití infikovaného zvířete (Geary, 2016).

Proces vývoje nového léčiva musí splnit řadu podmínek, které minimalizují riziko falešně negativního či falešně pozitivního výsledku. Falešně negativní výsledky jsou nepříjemné, jelikož by došlo k vyřazení potenciálně aktivní látky. Falešně pozitivní látky jsou v průběhu výzkumu přijatelné, jelikož v pozdějším stádiu testování dojde k jejich vyřazení. Optimální screeningové procesy vyřazují falešně pozitivní výsledky co nejdříve, aby proces byl co nejméně ekonomicky prodělečný (Geary, 2016).

Prvním krokem je testování chemických sloučenin z různých zdrojů. Testují se látky syntetické či přírodní, přičemž potenciálně účinným látkám se vystaví nejčastěji larvy, i když nejsou cílovým stádiem těchto léčiv. Důvodem je jejich snadnější dostupnost. K posouzení účinku látky na larvy se využívá měření motilit či pozorování dalšího vývoje larvy. Neaktivní látky jsou vyřazeny z dalších experimentů. Následně se využívají dospělci *H. contortus ex vivo* k posouzení anthelmintického účinku testované látky. Nejjednodušším testem je monitorování motility, a to buď vizuálně nebo pomocí automatizovaného systému. Další měření účinnosti zahrnuje monitorování hladiny ATP. Existují i další testy účinnosti, které jsou ovšem obtížnější a tím pádem i méně využívané (Geary, 2016).

Optimálním výsledkem je objevit léčivo, při současné minimální ekonomické náročnosti, které je vysoce účinné vůči cílovému parazitovi v daném hostiteli bez zjevné toxicity na hostitelský organismus. Sloučeniny, které splňují tato kritéria mohou přejít do klinických studií. Náklady na klinické studie jsou vysoké, z toho důvodu je nezbytné dále zkoumat pouze sloučeniny se zřejmým účinkem (Geary, 2016).

2.4.1 Nová anthelmintika

Jelikož se rezistence objevuje i u novějších léčiv, tak je důležité rozšiřovat škálu léčiv použitelných při léčbě hemonchózy. V současné době se využívají čtyři strategie pro nalezení nového anthelmintika (Zajíčková et al., 2020):

- První strategií je syntetizovat úplně nové chemické látky (NCEs), které jsou účinné proti parazitům. Velkou nevýhodou se jeví obtížnost, časová náročnost a celková komplikovanost vývoje nové sloučeniny.
- Druhou strategií je syntetizovat deriváty používaných anthelmintik nebo využít kombinace několika léčiv.
- Třetí strategií je využití léčiv, která jsou schválena k léčbě jiných zdravotních obtíží (změna indikace).
- Čtvrtou strategií je návrat k přírodním anthelmintikům z rostlinných zdrojů.

2.4.1.1 Nové sloučeniny

NCEs jsou nově syntetizované chemické sloučeniny, které ještě nebyly schváleny pro terapeutické použití. Syntéza nových sloučenin představuje klíčový směr ve vývoji léčiv, protože umožňuje najít léčivo s novým mechanismem účinku, s čímž souvisí i lepší účinnost u rezistentních kmenů ve srovnání se stávajícími léčivy (Zajíčková et al., 2020).

Objevování NCEs obvykle začíná identifikací potenciálních cílů léčiv, které vycházejí z detailních znalostí fyziologie a biochemie helmintů. Pro nalezení nových molekul jsou nyní využívány metody bioinformatické, genomické, proteomické a metody metabolické analýzy. Nicméně objev nových léčiv je komplikovaný, zdoluhavý a velmi nákladný (Zajíčková et al., 2020).

Následně vybrané NCEs podstupují rozsáhlé biologické hodnocení, aby se posoudila jejich účinnost proti helmintům. Toto posuzování vhodnosti obvykle zahrnuje *ex vivo* studie využívající kultivaci helmintů a *in vivo* studie, které využívají zvířecí modely parazitární infekce. Běžně využívané postupy testování účinnosti zahrnují test líhnutí vajíček, test vývoje larev, zkoumání motility, migrace a paralýzy. Nevýhodou se jeví fakt, že ne všechny výše zmíněné metody testují účinnost na dospělých stádiích, na která jsou anthelmintika převážně zaměřena. Z tohoto důvodu mohou mít potenciální léčiva sníženou účinnost v praxi (Zajíčková et al., 2020).

2.4.1.2 Modifikace stávajících léčiv a jejich kombinace

Syntéza nových anthelmintik s využitím derivátů známých léčiv se jeví jako rozumný způsob, jak vylepšit účinky a vlastnosti stávajících anthelmintik. Modifikace chemické struktury má za cíl překonat problémy, jakými jsou rezistence vůči léčivům, špatná biologická dostupnost a toxicita spojená s existujícími anthelmintiky (Zajíčková et al., 2020).

Pochopení mechanismu účinku stávajících léčiv na základě jejich struktury a bioaktivity pomáhá identifikovat klíčové strukturní rysy, které nesou anthelmintickou aktivitu, a optimalizovat tyto vlastnosti pro vývoj účinnějších a selektivnějších sloučenin. Příkladem může být skupina jedněch z nejpoužívanější anthelmintik-benzimidazoly. Benzimidazoly mají ovicidní a larvicidní účinky, ale jejich nevýhodou je, že jsou špatně rozpustné ve vodě. Proto bylo navrženo vylepšení, které spočívá v přidání soli

mebendazolu s anionem dusičnanu, čímž se zlepši rozpustnost této látky (Zajíčková et al., 2020).

Další slibnou strategií je využití kombinací dvou či více schválených léčiv ke zvýšení jejich účinnosti a oddálení rozvoje rezistence. Kombinací léčiv s různými mechanismy účinku nebo cíli v rámci parazita můžeme dosáhnout synergických účinků, které vedou k úmrtí parazita a k prodlouženému účinku léčiva. Příkladem je kombinace albendazolu s oxantelem pamoátu nebo ivermektinu a mebendazolu proti trichurióze (Zajíčková et al., 2020).

2.4.1.3 Využití léčiv z jiných indikačních tříd

Zajímavou možností se jeví využití léčiv, která byla schválena pro léčbu jiných onemocnění a jejich přezkoumání pro anthelmintickou aktivitu. Výhodou je dostupnost preklinických a klinických údajů, které sníží náklady a urychlí proces vývoje léčiva. Nevýhodou pro antiparazitární použití je, že parazitózy často vyžadují vyšší dávky léčiva, a proto je nutné k registraci opakovat studie toxicity pro vyšší koncentrace. Nejjednodušším rozšířením palety anthelmintik je využít v humánní medicíně ta anthelmintika, která se využívají ve veterinární medicíně, a naopak (Woods et al., 2007; Zajíčková et al., 2020).

Různé screeningové přístupy mohou být využity ve snaze o změnu účelu léčiva, včetně *in vitro* testů s použitím kultivace nematod, vysoce výkonného screeningu knihoven sloučenin a výpočetních metod pro predikci interakce léčiva a jeho cíle. Hledáček se může zaměřit na léčiva, která cílí na biologické procesy nezbytné pro přežití helmintů, jako je neurotransmise, svalová funkce nebo metabolické procesy v těle parazita (Zajíčková et al., 2020).

Příkladem látky, která byla původně využívaná pro jiné účely je trichlorfon. Trichlorfon je širokospektrální insekticid, u kterého se objevila anthelmintická aktivita. Navzdory slibným anthelmintickým účinkům má trichlorfon nepříznivé účinky na životní prostředí, proto je jeho použití diskutabilní (Fiel et al., 2011; Zajíčková et al., 2020).

Výhodou využití specifického mechanismu účinku těchto léčiv je, že budou použitelné i proti rezistentním kmenům, avšak mohou se objevit i potenciálně nepříznivé účinky nejenom pro hostitelský organismus, ale i pro jeho prostředí viz příklad výše (Zajíčková et al., 2020).

2.4.1.4 Rostlinné látky

Rostliny se již od starověky používaly k léčbě lidí i zvířat, proto návrat k přírodním látkám představuje další možnost léčby parazitóz (Akhtar et al., 2000). Po staletí byla tato možnost nejvíce používána, avšak v důsledku rozšíření syntetických léčiv, byla odstrčena do ústraní. Přírodní produkty nabízejí výhodu obrovského a do značné míry nevyužitého rezervoáru chemické diverzity a poskytují příležitosti pro objevení nových anthelmintických sloučenin s jedinečnými mechanismy účinku (Zajíčková et al., 2020).

Rostlinné produkty působí proti parazitární infekci dvěma mechanismy. Prvním je přímá interakce aktivních rostlinných látek s parazitem, a druhým je podpora imunitního systému, takže se hostitel parazitovi snáze ubrání (Zajíčková et al., 2020).

Bioaktivní látky rostlin s anthelmintickým účinkem můžeme zařadit do 3 hlavních skupin: terpeny, fenoly a sloučeniny dusíku. Tymol a karvakrol, látky ze skupiny terpenů, interagují s tyraminovým receptorem, který je zásadní pro krmení hlístů. Steroidní alkaloidy a oligoglykosidy ovlivňují vznik dusičnanů a množství cukru, které se dostane z žaludku do střeva. Nízká hladina cukru ve střevě snižuje viabilitu parazita. Areolin, piperidinový alkaloid, způsobuje inhibici acetylcholinových receptorů, což vede k paralýze parazita (Zajíčková et al., 2020).

2.5 Metody testování účinnosti anthelmintik

2.5.1 Stanovení ATP

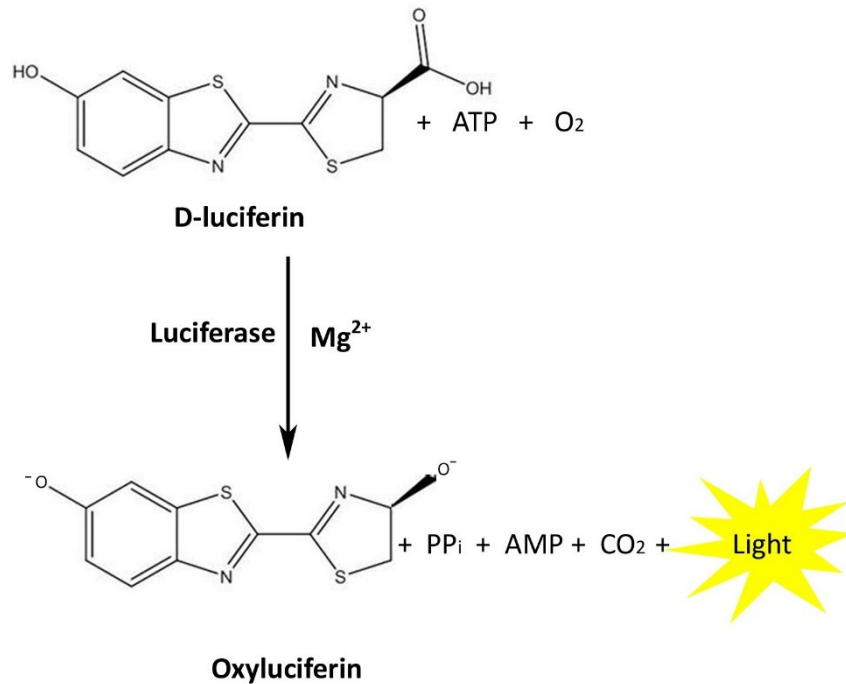
Bioluminiscenční reakce se využívají pro genové testy, detekci interakcí protein-protein, HTS (= high-throughput screening, česky vysoce výkonný screening) při objevování nových léčiv, kontrolu hygieny, analýzu znečištění v ekosystémech, *in vivo* zobrazování u malých savců a další (Syed & Anderson, 2021).

Ačkoli má každý bioluminiscenční druh hmyzu odlišný enzym luciferázy, všechny sdílejí stejný substrát s názvem d-luciferin. D-luciferin se vyskytuje zhruba u 40 různých druhů světlušek, kovaříků a u larev brouka z čeledi *Phengodidae* (Syed & Anderson, 2021).

Aktivace d-luciferinu před oxidací pomocí ATP je jedinečnou vlastností bioluminiscence d-luciferinu, kterou nesdílí s ostatními luciferiny. Tato schopnost dává systému d-luciferin/luciferáza řadu výhod, kterou jiné bioluminiscenční systémy nemají. Například d-luciferin vyžaduje aktivaci ve formě adenylace, díky čemuž je méně náchylný k autooxidaci a je stabilnější v roztoku, což snižuje chemiluminiscenci pozadí (Syed & Anderson, 2021).

ATP jako marker životaschopnosti se vytváří výhradně v živých buňkách (Bonora et al., 2012). Je nezbytný pro všechny anabolické procesy, procesy pohyblivé kontrakce, fosforylace a aktivního transportu (Bellini et al., 2019; Zajíčková et al., 2021).

Bioluminiscenční ATP test je založen na principu enzymatické reakce katalyzované luciferázou, což je enzym, který spouští přeměnu ATP na fotony emitující světlo. Luciferáza katalyzuje oxidaci d-luciferinu na oxyluciferin, za současného vzniku difosfátu, AMP, oxidu uhličitého a současné emitace fotonů (světla), jak můžeme vidět na následujícím obrázku 11, který shrnuje tuto chemickou reakci. Různé páry luciferin-luciferáza mají různé vlnové délky emise světla, a proto jsou vhodné pro různé aplikace. Existuje více než 30 známých bioluminiscenčních systémů, avšak v současné době jich je blíže prozkoumáno pouze 11 (Syed & Anderson, 2021). Výsledná intenzita naměřené bioluminiscence je přímo úměrná koncentraci intracelulárního ATP, které poukazuje na metabolicky aktivní buňky, a zároveň závisí na množství luciferázy přítomné v testu (McElroy & Green, 1956; Zajíčková et al., 2021).



Obrázek 11: Přeměna d-luciferinu na oxyluciferin

Zdroj: převzato z <https://blog.gbiosciences.com/hubfs/luc-reaction-webpage.jpg>

2.5.1.1 Princip měření ATP

Nezbytným kofaktorem celé chemické reakce je Mg-ATP komplex. Každý ATP kit je tvořen vyváženým koktejlem enzymů, kofaktorů, pufrů a extraktantů (Syed & Anderson, 2021). Jakmile jsou reagenty smíchány, dojde k určitému časovému zpoždění (0,25 ms), než lze pozorovat emisi světla, po kterém následuje světelné maximum, v literatuře se udává přibližná hodnota na 300 ms. Po tomto jevu následuje rychlý pokles světelné energie a poté pomalá trvalá emise světla. Tento jev se nazývá kinetika výbuchu. Předpokládá se, že pokles světelného výkonu je dán inaktivací enzymu nebo spotřebou významné části ATP, přičemž je koncentrace ATP nízká ve srovnání s koncentrací luciferázy. Inaktivace luciferázy může nastat i v případě, že je luciferáza navázána na povrchu nebo v případě, že se v měřeném roztoku vyskytuje její inhibitor, jako je oxyluciferin. Oxyluciferin je produkt reakce nebo kontaminace l-luciferinem či dehydroluciferinem v přípravku d-luciferázy. Inaktivaci enzymu můžeme zabránit použitím vysoce čisté d-luciferázy či přidáním stabilizačních látek jako je hovězí sérový

albumin (BSA), neutrální detergenty a osmolyty pro protein, díky čemu dostaneme stabilní světelnou odpověď (Syed & Anderson, 2021).

Ve většině testů se k měřeným vzorkům přidává fixní množství d-luciferinu, které převyšuje hladiny ATP. Důvodem je, že při vysoké koncentraci luciferázy získáme maximální světelnou odpověď úměrnou množství luciferázy, jelikož se vyčerpá reakce prvního řádu. Pokud je koncentrace luciferázy nízká, tak se ATP vyčerpává pomaleji, čímž docílíme stabilnější emise světla, která je úměrná koncentraci ATP. Když je koncentrace ATP výrazně pod K_m enzymu (koncentrace ATP menší než 0,1 nM/l), tak je rychlost reakce a světelný výkon úměrný koncentraci ATP při nízké K_m . Tento princip je užitečný pro monitorování tvorby a degradace ATP, včetně kinetických a metabolických studií nebo pro enzymové testy (Syed & Anderson, 2021).

K normalizaci naměřených hodnot ATP pomocí bioluminiscenčního testu se využívá vztahování na celkové množství proteinů. Pro stanovení proteinů je možné použít například metodu s využitím kyseliny bicinchoninové (BCA). Tento test kombinuje biuretovou reakci, redukci Cu^{2+} na Cu^+ proteinem v alkalickém prostředí, s vysoce citlivou a selektivní kolorimetrickou detekcí měďnatého kationtu pomocí kyseliny bicinchoninové. V biuretové reakci peptidy, které obsahují tři nebo více aminokyselinových zbytků, vytváří fialový chelátový komplex dvou molekul kyseliny bicinchoninové s měďnatými ionty v alkalickém prostředí. Fialové zbarvení se měří při vlnové délce 562 nm (Sapan et al., 1999; Thermo Fisher Scientific, n.d.).

2.5.2 Test líhnutí vajíček (EHT)

Tato jednoduchá, spolehlivá a finančně dostupná metoda se často využívá k hodnocení účinnosti benzimidazolových anthelmintik u hlístic. Tuto metodu lze využít i pro testování ovicidního účinku potenciálních anthelmintik (Ceballos et al., 2019; Tandon & Kaplan, 2004).

Základním principem této metody je inkubovat vajíčka s koncentrační řadou anthelmintika, a sledovat množství vylíhnutých larev za stanovený čas (Ceballos et al., 2019). Vajíčka se izolují z čerstvé stolice proséváním pomocí speciálních sít, centrifugací a flotací v sacharózovém roztoku. Získaná vajíčka se promývají a mikroskopicky se kontrolují, aby se potvrdilo, že ještě nenastalo líhnutí. Poté se vajíčka inkubují se zkoumaným anthelmintikem (Demeler et al., 2012). Po 48hodinové inkubaci

se do každé jamky přidává Lugolův roztok, který zastaví další případné líhnutí vajíček, a spočítá se procento vajíček a vylíhnutých larev (Bizimenyera et al., 2006; Demeler et al., 2012).

2.5.3 Test vývoje larev (LDT)

Test vývoje larev, je jeden ze způsobů, jak lze měřit účinnost anthelmintik. Vajíčka jsou kultivována za přítomnosti zkoumaného anthelmintika a lyofilizovaných bakterií *E. coli*, které slouží jako zdroj výživy pro larvy. Po ukončení inkubace se počítá, kolik v jamkách zůstalo vajíček a kolik vajíček se vyvinulo v larvy L1/L2 a larvy L3. LDT je spolehlivý, rychlý a levný, proto se často používá pro určení rezistence na anthelmintika (Gill et al., 1995; Taylor et al., 2009).

Tento test se provádí na destičce, která obsahuje destilovanou vodu, zkoumané léčivo, růstové médium a zkoumaného parazita. Destička se nechá inkubovat 6-8 dnů, do doby, než se v kontrole vyvinou larvy až do L3 stádia, při teplotě okolo 25-27 °C (Demeler et al., 2012). Počty vajíček a larev jsou počítány pod světelným mikroskopem po dobarvení Lugolovým roztokem. Vypočítá se podíl nevyvinutých larev (vajíčka, L1/L2 a L3) přítomných v každé koncentraci léčiva, tím dostaneme údaje pro odhad koncentrace, která je potřebná k inhibici vývoje 50 % přítomných larev (Demeler et al., 2012).

Existuje i modifikace LDT. Experiment se provádí na mikrotitrační destičce, ve které jsou vajíčka hlístic přidána do agarové matrice, která obsahuje zkoumané anthelmintikum (Taylor et al., 2009).

2.5.4 Test migrace larev (LMIA)

V tomto testu se zjišťuje inhibiční účinek anthelmintika či testované látky na migraci larev L3. Larvy L3 se snadněji získávají i uchovávají na rozdíl od dospělých jedinců (Demeler, 2005).

Paralýza migrace vlivem účinku anthelmintik se vyhodnocuje pod světelným mikroskopem. Avšak tento test se jeví jako velmi subjektivní a nereprodukovatelný, proto se v současné době vyvíjejí programy, které by migraci hodnotily objektivně (Demeler, 2005). Pro objektivní hodnocení motility larev L3 se využívá test, který spočívá v inhibici migrace larev buď z agarových bloků, které jsou překryté síty,

nebo existuje i test bez agaru (Demeler, 2005). Hodnotí se opláštěné nebo odpláštěné larvy L3, které byly inkubovány v různých koncentracích léčiv a poté se nechaly migrovat přes síta. Živé larvy jsou využity jako negativní kontroly a jako pozitivní kontroly se použijí buď larvy usmrčené ve vodní lázni nebo larvy inkubované v 5% DMSO či v levamisolu. Larvy se nechají migrovat 24 h a pouze živé aktivní larvy projdou sítím. Po 24 hodinách se do jamek přenesou migrující larvy z vrchní části síta a nepohyblivé larvy, aby se mohly následně spočítat. (Demeler, 2005). Výsledkem je procento inhibovaných larev (Wagland et al., 1992).

2.5.5 Testování motility

Principem testu je inkubovat určitý počet larev nebo dospělců v médiu se zkoumanou látkou a sledovat jejich motilitu. Odečet motility se doporučuje v čase 0 h, 12 h a 24 h. Existují verze tohoto testu, kde je celkový čas zkoumání motility delší, případně kdy se motilita měří častěji, avšak vždy záleží na typu testu (Demeler et al., 2012).

Pro měření motility dospělců a larev lze použít přístroj, který využívá mikroprocesorovou technologii. Princip měření je založen na změně odrazu světla při pohybu parazita v roztoku a tím i změně přijímaných signálů (Taylor, 1990). Číselné vyjádření změny těchto signálů se označuje jako index motility. Mrtví helminti mají nulový index motility. Výhodou též je, že tato metoda dokáže odlišit velmi aktivního parazita od toho méně aktivního (Demeler et al., 2012).

2.5.6 Sledování počtu vajíček v trusu infikovaných zvířat (FECRT)

FECRT je *in vivo* test, který poskytuje odhad anthelmintické účinnosti léčiva porovnáním počtu vajíček v trusu infikovaných zvířat před a po léčbě (Kotze et al., 2020). Nutno podotknout, že výsledky tohoto testu nemusí odhadnout anthelmintickou účinnost přesně, jelikož produkce vajíček ne vždy přesně koreluje se skutečným počtem dospělých parazitů. Po léčbě benzimidazoly se trus doporučuje odebírat 10-14 dní. Každý typ anthelmintika má jiné doporučené časové rozmezí pro odběr trusu (Taylor et al., 2009).

2.5.7 Molekulární diagnostika

Pro diagnostiku hemonchózy lze využít i několik molekulárních metod. Mezi tyto metody patří Southern blotting a repetitivní DNA hybridizační sondy v kombinaci se Southern bloty, avšak jejich nízká specifita a citlivost přispěla k jejich nahrazení polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Nicméně i PCR má svá omezení. Velkým problémem u vajíček parazitů patří zisk dostatečného množství čisté DNA bez PCR inhibitorů (Arsenopoulos et al., 2021).

Kapková digitální PCR (ddPCR) byla vyvinuta, aby překonala výše uvedené problémy u PCR. DdPCR je vhodná pro detekci a kvantifikaci hlavních rodů helmintů, které parazitují na ovcích. Navíc lze tuto metodu použít u zkoumaného materiálu, který obsahuje několik druhů helmintů a v larválních kulturách, které byly shromážděny z trusu. Zdá se, že ddPCR by mohla překonat omezení, která se vyskytují u konvenční PCR, a může být využita jako doplněk aplikací založených na konvenčních metodách počítání vajíček (Arsenopoulos et al., 2021).

2.5.8 Testování hepatotoxicity

Játra mají zásadní roli pro metabolismus léčiv a jsou hlavním cílem toxických účinků léčiv. Je to dáno tím, že se podílejí na metabolické eliminaci většiny léčiv. Proto je testování hepatotoxicity u všech potenciálních léčiv včetně anthelmintik velmi důležité (Gomez-Lechon et al., 2010).

K testování hepatotoxických účinků se využívají játra, která se odeberou zvířeti (potkanovi, ovci) ihned po jeho usmrcení. Játra se umístí do studeného média. Játra se nařežou na ultratenké plátky a nechají se preinkubovat v médiu s výživnými látkami. Následně jsou přemístěny do média s testovanými anthelminiky. Řezy se takto inkubují 24 hodin při 37 °C. Po ukončení inkubace se řezy odeberou, opláchnou a nakládá se s nimi dále. Poté se u těchto jaterních řezů změří ATP jako marker viability. Stanovení množství proteinů se následně využije pro normalizaci výsledků měření ATP (Pavičić et al., 2023; Zajíčková et al., 2021).

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo testování anthelmintické účinnosti a hepatotoxicity nových derivátů kyseliny benzhydroxamové OMK1 a OMK2 pomocí vybraných laboratorních testů s využitím několika vývojových stádií citlivých i rezistentních kmenů *Haemonchus contortus* a precizních tkáňových řezů z ovčích jater.

Dílčími cíli bylo:

- 1) Získat vajíčka, larvy a dospělé H. contortus.
- 2) Zjistit vliv OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček H. contortus.
- 3) Sledovat vliv OMK1 a OMK2 na motilitu a viabilitu larev H. contortus.
- 4) Sledovat vliv OMK1 a OMK2 na motilitu a viabilitu dospělců H. contortus.
- 5) Připravit precizní řezy z ovčích jater a zjistit, zda OMK1 a OMK2 ovlivňují jejich viabilitu.

4 Experimentální část

4.1 Používané materiály a přístroje

4.1.1 Přístroje

- Baterka
- Centrifuga (Thermo, Biofuge Stratos; Eppendorf, Centrifuge 5810 R)
- Fotoaparát Sony
- Homogenizátor (MP Biomedicals, FastPrep®-24; Biobase)
- Kamera u mikroskopu Andor Zyla 5,5 sCMOS
- Magnetická míchačka
- Mikroskop Nikon Eclipse Ti
- Multifunkční modulární reader SPARK, TECAN
- Teploměr
- Termostat, s CO₂, HERAcell, Heraeus
- Thermomixer comfort, Eppendorf
- Ultra-Low Temperature Freezer, Innova C760, New Brunswick
- Vařič
- Vortex V-1plus, Biosan

4.1.2 Pomůcky

- Akvárium
- Alobal
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Černé 96-jamkové destičky, Costar
- Destičky 12-; 24-; 96-jamkové
- GAMA-U destičky 96-jamkové
- Gáza
- Homogenizační kuličky (zirkonové Silibeads) - velikosti 1,0mm:1,4 mm:2,0mm v poměru 1:1:0,5
- Hrnc
- Hustoměr
- Kráječ jater Krumdieck tissue slicer
- Kultivační lahve

- Laboratorní nádobí (Simax)
- Leukopor
- Míchadla
- Nůžky
- Plastová folie
- Plastové centrifugační zkumavky (Eppendorf)
- Síta s 25; 100 a 250 μ m oky
- Skřipce
- Tácy
- Vařečka
- Vývěva
- Železné tyčinky

4.1.3 Chemikálie

- 100% vodní Lugolovův roztok
- 5% FBS (=fetální hovězí sérum)
- Agar
- Albendazol (ABZ)
- ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche
 - Obsahuje Luciferazu, ATP standard
- Cukr
- Destilovaná voda
- D-glukóza (M_r 180,16 g/mol)
- DMSO
- EBSS (s obsahem CaCl₂, MgCl₂, Invitrogenu)
- EDTA 2 mM (M_r 372,24 g/mol)
- Gentamycin o koncentraci 50 μ g/ml
- Hco médium
- Hydrocortison 21-hemisukcinát 0,1 mM
- Chlornan sodný 15%
- Insulin 1 μ M
- KCl pufr (0,154 M) obsahující Tris-HCl (50 mM; pH 7,4)
- Levamisol (LEV)

- L-methionin 0,5 mM
- Luciferaza, CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay Promega,
- NaOH 5 M
- OMK1 a OMK2
- OMK207
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™)
 - Obsahuje 0,2% BSA, roztok A
(NaHCO_3 , Na_2CO_3 , BCA v 0,1 M NaOH), roztok B
(4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- Redestilovaná voda
- RPMI médium (s obsahem L-glutaminu, Invitrogenu)
- SONOP (Sonification Solution): Ethanol (70% v/v) + 2 mM EDTA
- Suchý led
- Tris-HCl 100 nM (M_r 121,14 g/mol)
- Ultračistá voda (ddH₂O; připravena systémem Milli-Q, Millipore, Bedford, MA USA)

4.1.4 Biologický materiál

- Dospělci *H. controtus* ISE, IRE
- Larvy *H. controtus* ISE, WR
- Vajíčka *H. controtus* ISE, WR
- Játra ovce domácí

4.2 Metodika práce

4.2.1 Příprava roztoků

4.2.1.1 Tris/EDTA pufr

Pro přípravu Tris/EDTA pufru bylo smícháno 100 mM Tris-HCl a 2 mM EDTA pufr, který má pH v rozmezí 7,6-8,0.

Pro přípravu 1 litru tohoto pufru byl rozpuštěno 12 g Tris, o molekulární hmotnosti 121,14 g/mol a 0,74 g EDTA, o molekulární hmotnosti 372,24 g/mol, v 600 ml redestilované vody. pH bylo upraveno na námi požadovanou hodnotu – 6 M HCl, objem byl doplněn redestilovanou vodou, tak aby se výsledný objem rovnal 1 litru.

4.2.1.2 SONOP (Sonification solution)

Pro přípravu SONOP byl smíchán 70% ethanol a 2 mM EDTA, o molekulární hmotnosti 372,24 g/mol a pH 10,9.

Příprava tohoto roztoku byla započata rozpuštěním EDTA v redestilované vodě, pH roztoku bylo upraveno na požadovanou hodnotu a následně byl roztok doplněn 96% ethanolem do požadovaného objemu. Takto připravený roztok byl uchováván v lednici.

4.2.1.3 Příprava roztoku luciferázy

Luciferáza je firmou Roche dodávána v lyofilizovaném stavu, proto bylo nutné ji před jejím použitím správně naředit. Obsah lahvičky luciferázy byl rozpuštěn v 10 ml redestilované vody. Rozpuštění obsahu lahvičky bylo podpořeno jejím opatrným překlápěním. Po rozpuštění byla lahvička ponechána 5 minut stát, po uplynutí této doby již bylo možno roztok používat k měření.

Rozpuštěná luciferáza byla uchovávána v mrazničce při -20 °C. Zmraženou luciferázu pro potřeby měření bylo nutné vyndat z mrazničky a nechat ji vytemperovat při laboratorní teplotě 30-60 minut, dle potřeby.

4.2.1.4 Pracovní roztok C pro stanovení koncentrace proteinů

Pracovní roztok C byl připraven smícháním komerčně dodaného roztoku A, který byl složen z $NaHCO_3$, Na_2CO_3 , bicinchoninové kyseliny rozpuštěné v 0,1 M NaOH, a komerčně dodaného roztoku B, který obsahoval 4% $Cu_2SO_4 \cdot 6 H_2O$, v poměru 50:1.

4.2.1.5 Flotační roztok

Flotační roztok byl připraven ve dvoulitrové kádince, kam bylo nalito 500-600 ml destilované vody, která byla zahřáta na 45 °C. Do zahřáté vody bylo postupně za stálého míchání přidáváno přibližně 0,5 kg cukru, který se v ohřáté vodě rozpustil. Roztok byl průběžně kontrolován pomocí hustoměru. Cukr byl postupně přidáván až bylo dosaženo hustoty $1,27 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

4.2.1.6 Fyziologický roztok

Na přípravu fyziologického roztoku, 0,9% NaCl, pro izolaci dospělců, bylo nutné do plastové nádoby odvážit 81 g NaCl a následně dolít teplou vodu do 9 l.

4.2.1.7 Suplementovaný pufr EBSS

Pufr EBSS (1500 ml), který obsahoval $CaCl_2$, $MgCl_2$, byl doplněn 6,75 g D-glukózy (M_r 180,16 g/mol), aby byl vytvořen roztok o koncentraci 25 mM, který byl dále využit pro přípravu jaterních řezů.

4.2.1.8 Suplementované médium RPMI

K RPMI médiu (1000 ml), které obsahovalo L-glutamin, bylo přidáno 50 ml 5% FBS, 0,075 g 0,5 mM L-methioninu, 0,006 g 1 μ M insulinu, 0,048 g 0,1 mM hydrokortison 21-hemisukcinátu a 1 ml gentamycinu o koncentraci 50 μ g/ml.

4.2.2 Zisk biologického materiálu

4.2.2.1 Infikace ovcí

Ovce byly perorálně infikovány roztokem L3 larev. Noc před nakažením byly larvy ponechány migrovat ze síta do kónických skleněných nádob. Sedimentované larvy byly naředěny na koncentraci 1000 L3/ml. Výsledná koncentrace larev byla ověřena

pod mikroskopem. Jedna ovce byla infikována 6000-8000 larev. Každým kmenem (ISE, IRE, WR) *H. contortus* byly infikovány 2 ovce.

4.2.2.2 Izolace vajíček z trusu

Od infikovaných ovcí, 4 týdny po nakažení, byl sbírán jejich trus pro získání vajíček a larev (Pavičić et al., 2023). Kolem řitního otvoru ovce byly pomocí svorek k vlně připevněny sáčky, které jímaly trus. Sáčky bylo nutné nejméně jednou za den měnit. Líhnutí vajíček během sběru trusu bylo zamezeno nízkou teplotou cca 10 °C, proto množství larev bylo zanedbatelné (Pavičić et al., 2023). Exkrementy byly přivezeny v chlazených boxech do laboratoře, kde z nich byla pomocí 3 sítí izolována vajíčka.

Získaný trus byl smíchán s vodou a rozmixován do kašovitě hmoty. Suspenze trusu byla pasírována přes 3 síta s různými průměry ok (250, 100 a 25 µm). Zbylý obsah na sítu byl několikrát promyt vodou. Vajíčka zachycená na posledním sítu (s průměrem ok 25 µm), byla důkladně promyta a následně přenesena do centrifugačních plastových zkumavek s vodou. Následně byla centrifugována po dobu 3 minut při 1600 rpm.

Po centrifugaci byl supernatant slit a nahrazen Sheatherovým flotačním roztokem (nasyčený sacharózový roztok o hustotě 1,27 g.cm⁻³). Roztok byl dolit do ¾ centrifugační zkumavky, zamíchán a dolit flotačním roztokem. Následně byl celý obsah znovu zcentrifugován. Vzniklá horní světlá vrstva vajíček byla odebrána a předcházející krok byl zopakován.

Vrchní vrstva s vajíčky byla odebrána do 15 ml centrifugační plastové zkumavky, doplněna flotačním roztokem a centrifugována 3 minuty při 1000 rpm. Vajíčka byla přečištěna opakovaným promýváním vodou a centrifugací 3 min při 1600 rpm. V posledním kroku byl odebrán veškerý supernatant a k vajíčkům byly přidány 2 ml studené vody. Koncentrace vajíček byla stanovena počítáním pod mikroskopem.

4.2.2.3 Kultivace L3 larev z trusu

Čerstvý ovčí trus s vajíčky byl rozložen na tácu a překryt plastovou fólií. Takto překrytý trus byl inkubován při 27 °C 4-8 dní. Po dokončení inkubace byly vylíhlé

larvy smyty z fólie do kónických nádob. Takto vykultivované larvy byly uchovávány v chladničce při 10 °C.

V případě, že na folii nebyl nalezen dostatečný počet larev, byl trus podroben dvojnásobnému promytí vodou. Následně došlo k jeho promíchání a slítí do litrových kónických nádob přes síto s oky o velikosti 100 µm. Larvy byly ponechány v klidu po dobu 10-30 minut, aby došlo k jejich usazení na dně nádoby. Poté byly larvy odebrány ze dna nádoby pipetou a přeneseny na síto s oky o velikosti 20 µm, které bylo ponořeno do mísy s vodou. V případě, že larvy nebyly dostatečně čisté, došlo k jejich opětovnému přecedění přes síto s oky o velikosti 100 µm.

Usazené larvy na sítě s oky o průměru 20 µm byly přelity do kónické nádoby, kde byly ponechány sedimentovat ke dnu. Sedimentované larvy byly přeneseny do kultivačních lahví, do kterých byla dolita voda. Kultivační lahve s pootevřenými víčky byly následně umístěny do chladu.

V případě, že byly larvy ponechány v chladu delší dobu, došlo k jejich filtraci s cílem oddělení živých larev od neživých. Celý obsah kultivačních lahví byl vylit na síto s oky o velikosti 20 µm a larvy byly ponechány k sedimentaci po dobu přibližně 4 hodin. Voda z nádoby byla přelita do kónických nádob a ponechána k usazení.

4.2.2.4 Izolace dospělců

Po sedmi týdnech od infestace byly ovce usmrceny a z jejich žaludků byli izolováni dospělí jedinci *H. contortus* metodou agarové kultivace dle Van Wyka (Van Wyk et al., 1980). Před izolací byl připraven fyziologický roztok F1/1 a agar. Do 500 ml studené vody bylo přidáno 30 g agarů a zamícháno, poté bylo přilito 1,5 l horké vody a za stálého míchání přivedeno k varu. Do uvařeného agarů byl vložen teploměr a agar byl zchlazen na 48 °C. Hrnc s agarem a míchátkem byl umístěn na magnetickou míchačku a překryt alobalem. Teplota byla udržována na 48 °C. Den předem byl do 4/5 akvária nalit fyziologický roztok. Akvárium bylo překryto alobalem a inkubováno na 38 °C, včetně zbylého fyziologického roztoku.

Dále byly nachystány tácy s gázou, která z jedné strany přesahovala o cca 15 cm. Z delší strany gázy byly navinuty kovové tyčinky uchycené kovovými skřípci. Gáza byla upevněna skřípci, čímž se zabránilo jejímu smotávání, poté byla navlhčena fyziologickým roztokem a nadbytečný roztok byl z tácu odstraněn.

Ovčí slez byl rozstřížen a přebytečný žaludeční obsah byl odstraněn. Rozstřížený slez byl vložen do kádinky s F1/1 roztokem a paraziti byli jemně odstraněni ze žaludeční stěny. F1/1 roztokem byly opláchnuty žaludeční záhyby a celý žaludek byl dočištěn pro maximální zisk parazitů. Kádinka se získanými parazity byla vložena do inkubátoru.

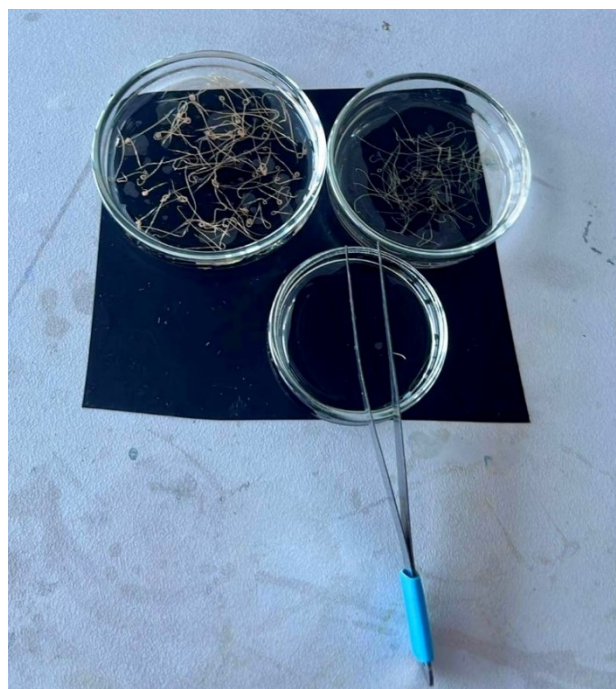
Po sedimentaci bylo odebráno co nejvíce tekutiny (250-400 ml) a do kádinky byl přidán agar v poměru 1:1. Po promíchání byl obsah kádinky vylit na předem připravené tácy s gázou.

Vzniklé agarové závěsy byly vloženy do akvária s F1/1 roztokem, tak aby se nedotýkaly dna, ani sebe samých. Byly upevněny leukoplastem.

Akvárium bylo opatrně dolito F1/1 roztokem, tak aby byly všechny závěsy ponořeny. Čistota agarů byla zkontrolována světlem z baterky a poté byli dospělí paraziti postupně odsávání a přemístění k třídění.

Dospělí jedinci byli dle morfologických znaků rozděleni na samice a samce a vloženi do kádinek s PBS při teplotě 37 °C. Pro třídění bylo použito: černé podkladové papíry, Petriho misky, pinzety, stereolupy, laboratorní kádinky, stolní termostaty a PBS.

Roztřídění paraziti byli umístěni do destiček s 1 ml PBS a inkubováni při 37 °C.



Obrázek 12: Třídění dospělců

Zdroj: vlastní

4.2.2.5 Příprava precizních jaterních řezů

Po usmrcení ovcí a vypreparování jejich jater byla tato játra vložena do chladného probublávaného EBSS s D-glukózou.

Krouživým pohybem byly z jater vykrojeny válečky za pomoci vykrajovače s průměrem 8 mm. Tyto válečky bez roztřepených okrajů byly nařezány na řezy o šířce cca 200-250 μm pomocí speciálního kráječe Krumdieck tissue slicer.

4.2.3 Test líhnutí vajíček

EHT test byl proveden dle uvedené publikace (Várady et al., 2007). Cílem experimentu bylo posoudit ovicidní účinky OMK derivátů v porovnání s albendazolem (ABZ).

Do mikrotitrační destičky s 96 jamkami byl napipetován 1 μl roztoku OMK1 nebo OMK2 v DMSO a 199 μl vodného roztoku s vajíčky. Požadovaná koncentrace vajíček v jamce činila 60 vajíček v 1 ml, k čemuž byl roztok s vajíčky před pipetováním naředěn. Kontrola koncentrace vajíček probíhala na podložním sklíčku mikroskopu.

OMK1 a OMK2 byly pipetovány do řady vedle sebe v koncentracích 0,01; 0,1; 1 μM . Současně byla na destičku přidána pozitivní kontrola (ABZ 2 mM), negativní kontrola (0,5% DMSO) a látka OMK207 (4 mM). Všechny vzorky byly testovány v triplikátech uspořádaných pod sebou. Pro zamezení odpaření byla do okolních (krajních) jamek pipetována voda v objemu 280 μl .

Takto připravené destičky byly inkubovány v termostatu při teplotě 27 °C po dobu 48 hodin. Po ukončení inkubace bylo do každé jamky s vajíčky přidáno 5 μl 100% Lugolova roztoku.

Následně byla pod mikroskopem spočítána nevylihnutá vajíčka a larvy L1.

4.2.4 Stanovení účinnosti OMK1 a OMK2 u larev

4.2.4.1 Inkubace larev

Na stanovení anthelmintické účinnosti námi zkoumaných léčiv u larev bylo zapotřebí získat odpláštěné larvy (=xL3). Larvy L3 se inkubovaly 20 minut při 38 °C, 10 % CO_2 a s 0,15% chlornanem sodným. Následovalo 5x promytí destilovanou vodou

(předehřátou na 37 °C) a centrifugace při 1600 rpm po dobu 3 minut. Suspenze s larvami byla připravena v koncentraci 20 xL3/10 µl a ověřena pomocí mikroskopu.

Z připravené suspenze larev bylo odebráno 198 µl suspenze do jamek 96-jamkové destičky. Byly přidány 2 µl zkoumaných látek (OMK1, 2), pozitivní (10 µM LEV) a negativní (1% DMSO) kontroly. Destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 10 % CO₂ po dobu 72 h.

Po uplynutí 72 h byly vzorky sesbírány do mikrozkuvek, a buď byly zmrazeny nebo bylo ihned měřeno ATP a bílkovina.

4.2.4.2 Měření ATP

Před zahájením měření ATP byla centrifuga vychlazená na 4 °C, čímž se zabránilo degradaci ATP. Dále bylo nutno rozmrazit roztoky luciferázy a standardu ATP pro další práci s nimi.

Vzorky v mikrozkuvkách byly umístěny do chladicího stojánu a byly k nim přisypány 3/4 odměrky homogenizačních kuliček pro zajištění homogenní směsi. Homogenizace byla provedena po dobu 2x30 sekund dle předem nastaveného programu pro homogenizaci larev. Po homogenizaci byly vzorky vráceny do chladicího stojánu a následně byly centrifugovány 10 minut při 4 °C a 13 200 rpm.

Během centrifugace vzorků byl rozmražený standard ATP naředěn dle následující tabulky 1 pro přípravu kalibračních roztoků.

Tabulka 1: Kalibrační řada ATP pro xL3 a dospělce

Ředění	V [µl]	V Tris/EDTA [µl]	c ATP [nM]
A	10 µl ATP standard	990	165 000
C1	10 (A)	990	1 650
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

Z každého kalibračního roztoku bylo v duplikátech odpipetováno 50 µl do černé 96-jamkové destičky. Následně bylo na destičku přidáno 5 µl supernatantu a 45 µl pufru Tris/EDTA v duplikátech dle rozpisu.

Připravená destička byla umístěna do zapnutého přístroje Spark s aktivovaným programem pro měření ATP. Těsně před měřením bylo do každé jamky pomocí multikanálové pipety přidáno 50 µl luciferázy v pořadí směru měření. Následně byla změřena luminiscence.

Pro vyhodnocení účinnosti byly výsledné hodnoty ATP normalizovány na obsah proteinů ve vzorcích. Z tohoto důvodu byla ve vzorcích také změřena koncentrace proteinů.

4.2.4.3 Stanovení koncentrace proteinů

Vzorky byly umístěny do koncentrátoru s teplotou 45 °C na dobu 6-8 hodin. Po vyschnutí vzorků do nich bylo přidáno 40 µl 5 M NaOH, obsah byl důkladně promíchán a inkubován při 37 °C, 800 rpm po dobu 30 minut. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 160 µl redestilované vody a vše znovu promícháno. U takto připravených vzorků byla stanovena koncentrace proteinů.

Byly připraveny roztoky dle tabulky 2 pro přípravu kalibrační řady. Zkumavka 1 byla vytvořena smícháním 250 µl BSA z kitu s 250 µl 2 M NaOH.

Tabulka 2: Kalibrační řada pro bílkovinu u xL3

Ředění BSA xL3	Koncentrace [µg/ml]	0,1% roztok BSA v 1 M NaOH (= zkumavka 1) [µl]	1 M NaOH (=zkumavka 2) [µl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Kalibrační řada byla vytvořena odpipetováním 10 µl kalibračních roztoků v duplikátech do 96-jamkové GAMA-U destičky. Do jamek bylo dále přidáno 10 µl vzorků v duplikátech. Do každé jamky bylo pomocí multikanálové pipety přidáno 200 µl pracovního roztoku C a destička byla inkubována 30 minut při 60 °C a 350 rpm v Termomixeru. Po inkubační době byla změřena absorbance vzorků na přístroji Spark při vlnové délce 562 nm.

4.2.5 Stanovení účinnosti OMK1 a OMK2 u dospělců

4.2.5.1 Inkubace dospělých stádií

Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 990 μl Hco média a následně přidáno 10 μl 1% DMSO, levamisolu (LEV) v koncentraci 10 μM a testovaných látek: OMK1 a OMK2 v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . Do takto připravených roztoků byli vloženi dospělci *H. contortus*. Destička byla inkubována po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C a 10 % CO_2 .

Po uplynutí inkubační doby byli červi opláchnuti v PBS pufru, jemně osušeni a přeneseni do 2 ml mikrozkušavek s uzávěrem. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 100 μl SONOP a vzorky byly ihned zmrazeny na suchém ledu. Následně byly vzorky uchovávány při teplotě -80 °C v hlubokomrazícím boxu.

4.2.5.2 Měření ATP

Stanovení ATP u dospělců probíhalo analogicky jako u larev stádia xL3. Jediným rozdílem byl krok před homogenizací, kdy do vzorku kromě homogenizačních kuliček bylo přidáno 1 400 μl vychlazeného Tris/EDTA pufru. Zbývající kroky postupu se shodovaly s měřením ATP u larev.

4.2.5.3 Stanovení koncentrace proteinů

Po doměření ATP byl ihned stanoven obsah proteinů ve vzorcích. Koncentrace proteinů se stanovuje v supernatantu, proto bylo nutné před měřením vzorky zcentrifugovat.

Pro stanovení proteinů byly nejprve připraveny roztoky dle tabulky 3, viz níže, pro vytvoření kalibrační řady. Z kalibračních roztoků i ze vzorků (supernatantů) bylo pipetováno 10 μl v duplikátech do 96-jamkové U-GAMA destičky.

Tabulka 3: Kalibrační řada pro bílkovinu u dospělců

Ředění BSA 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 bylo do každé jamky přidáno 200 µl pracovního roztoku C pomocí multikanálové pipety. Destička byla inkubována 30 minut při teplotě 37 °C a 350 rpm. Po inkubaci byla destička vložena do spektrofotometru Spark, kde byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

4.2.6 Stanovení motility

4.2.6.1 Stanovení motility u xL3

Larvy stádia xL3 byly inkubovány s testovanými látkami, pozitivními a negativními kontrolami dle postupu popsaného v podkapitole 4.2.4.1. Po uplynutí 72 hodin byla mikrotitrační destička přemístěna pod mikroskop s kamerou. Pro zajištění kvalitního záznamu motility bylo během natáčení zhasnuto a teplota byla udržována na 37 °C, aby byla zaručena optimální pohyblivost larev. Video o délce 10 sekund byla pořízena kamerou s frekvencí snímků 20 fps.

Záznam videí probíhal pomocí mikroskopu Nikon Eclipse Ti se zvětšením 4x a kamery Andor Zyla 5,5 sCMOS s využitím softwaru NIS-Elements Imaging Software. Následně byla pořízená videa analyzována.

4.2.6.2 Stanovení motility u dospělých stádií

Pro stanovení motility u dospělých hlístů byl zvolen odlišný postup sledování ve srovnání s larvami stádia xL3. Dospělí jedinci byli umístěni do 24-jamkových mikrotitračních destiček s 990 µl Hco média a 10 µl pozitivní (LEV), negativní (DMSO) kontroly a zkoumaných látek (OMK1 a 2). V době, kdy destičky nebyly natáčeny, byly uchovávány v termostatu při teplotě 37 °C a 10 % CO₂.



Obrázek 13: Fotoaparát pro natáčení motility

Zdroj: vlastní

Motilita byla snímána fotoaparátem Sony s videokamerou viz obrázek 13 v časech $t_0, t_1, t_2, t_3, t_8, t_{16}, t_{22}, t_{26}$ a t_{40} . Během natáčení bylo v místnosti rozsvíceno pro dosažení kvalitního a jednotného obrazu. Záznam motility byl natáčen po dobu alespoň 10 sekund. Pořízená videa byla následně analyzována.

4.2.7 Stanovení účinku OMK1 a OMK2 na jaterní řezy

4.2.7.1 Přípravná fáze

Do 12-jamkových mikrotitračních destiček bylo do každé jamky pipetováno 1,5 ml suplementovaného RPMI média bez testovaných látek. V těchto jamkách byly opláchnuty jaterní řezy a byly zde ponechány k preinkubaci před vložením do testované látky.

Do dalších 12-jamkových destiček bylo pipetováno suplementované RPMI médium s testovanými látkami v dostatečném množství paralelních vzorků.

Připravený pufr, média a rozložený kráječ byl umístěn do chladicí místnosti v dostatečném časovém předstihu.

Vychlazený EBSS pufr obsahující glukózu byl probubláván 60 min při 95 % O_2 a 5 % CO_2 . Předpřipravené destičky s médii byly vloženy, 30-60 min

před samotným experimentem, do inkubátoru. Následně byl sestaven kráječ, naplněn pufrům a byla otestována jeho funkčnost.

Dále byl nachystán box s ledem, ve kterém byly umístěné kádinky obsahující probubláný EBSS, a další potřebné pomůcky jako nůžky a pinzety. Na ták s ledem byly umístěny Petriho misky s filtračním papírem pro vykrajované válečky. Tímto krokem byla přípravná fáze ukončena.

4.2.7.2 Inkubace jaterních řezů

Každý řez byl preinkubován po dobu 30 min v jedné z jamek na destičce v suplementovaném RPMI médiu bez testovaných látek. Během preinkubace byly opláchnuty nekrotické a jinak poškozené buňky. Po 30 min byly řezy přeneseny do média s testovanou látkou a inkubovány v atmosféře 95 % O_2 a 5 % CO_2 po dobu 24 h dle zvolených časových intervalů.

Po uplynutí 24 h byly řezy vyjmuty a krátce omyty v 0,154 M KCl pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl. Médium, ve kterém byly řezy inkubovány, bylo též odebráno a uschováno pro pozdější analýzu.

Řezy po oplachu byly zhomogenizovány v Tris-KCl pufru a zcentrifugovány při 4 °C po dobu 20 min a při 9 000 g. Tímto postupem byla získána frakce S9, jejíž supernatant byl odebrán a skladován při -20 °C.

4.2.7.3 Měření ATP a koncentrace proteinů

Těsně před samotným stanovením aktivity byl supernatant S9 frakce centrifugován při 105 000 g po dobu 60 min pro získání cytosolu a mikrosomů. Z 5 μ l supernatantu bylo měřeno ATP dle postupu popsaného v podkapitole 4.2.4.2. stanovení proteinů proběhlo dle postupu v podkapitole 4.2.4.3.

Jedinou odlišností bylo, že jako pozitivní kontrola byl použit APAP (paracetamol) a jako negativní kontrola byl použit DMSO. Koncentrace testovaných látek byly stále stejné jako v předešlých pokusech, tedy 0,01; 0,1; 1 mM.

4.2.8 Statistická analýza dat

Data byla analyzována pomocí statistického testu one-way ANOVA v softwaru GraphPad Prism 10. Tato metoda byla použita k porovnání průměrů dat z více skupin a ke zjištění, zda mezi nimi existovaly statistické rozdíly. Statisticky významná data byla na grafu označena symbolem hvězdičky. Toto označení slouží k rychlému a přehlednému rozlišení statisticky významných dat od statisticky nevýznamných dat.

5 Výsledky

5.1 Vliv OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček

5.1.1 ISE kmen

EHT byl použit pro sledování potenciálního ovicidního účinku OMK1 a OMK2 u ISE kmene *H. contortus*. Výsledky byly vyjádřeny pomocí sloupcového grafu pro každou látku zvlášť. Sloupcový graf znázorňuje poměr vylíhnutých larev ku nevylíhnutým vajíčkům udaný v procentech vztažených ke kontrole (kontrola představovala 100 %). Jako pozitivní kontrola byly při testování využity látky s prokázaným účinkem (OMK207 a ABZ) pro porovnání účinnosti. Jako negativní kontrola (k) byly použity hodnoty získané u vajíček inkubovaných pouze s rozpouštědlem (0,5% DMSO) testovaných látek. Testované látky byly použity v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . V pozitivních kontrolách byla koncentrace OMK207 20 μM a ABZ 0,1 μM .

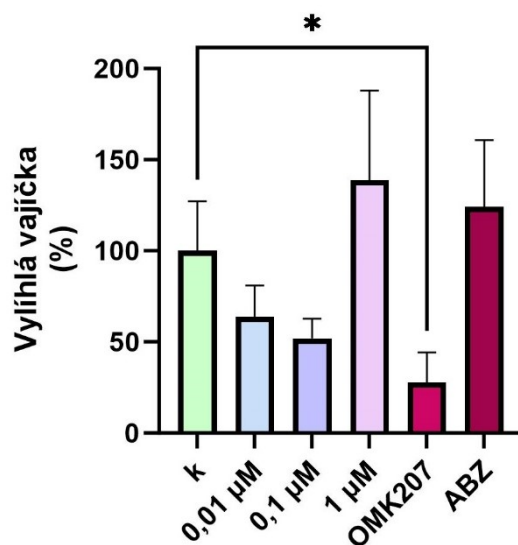
Získaná data (průměr naměřených hodnot \pm směrodatná odchylka ze tří replikátů) jsou uvedena v tabulce 4 (pro OMK1) a tabulce 5 (pro OMK2) a byla vynesena do grafů (obrázek 14 a 15).

Tabulka 4: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček pro ISE kmen

ISE	kontrola	OMK1			OMK207	ABZ
	DMSO 0,5 %	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	0,1 μM
Průměr (%)	100,00	63,77	73,49	92,59	27,81	88,99
SD (%)	22,31	14,00	31,16	34,72	13,48	25,89

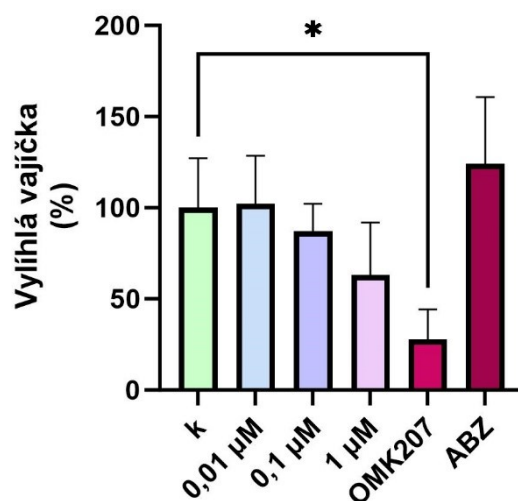
Tabulka 5: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček pro ISE kmen

ISE	kontrola	OMK2			OMK207	ABZ
	DMSO 0,5 %	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	0,1 μM
Průměr (%)	100,00	68,06	87,04	51,59	27,81	88,99
SD (%)	22,31	18,75	12,44	14,88	13,48	25,89



Obrázek 14: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček u ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$*



Obrázek 15: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček u ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$*

Výsledky ukázaly, že ani jedna z testovaných látek (OMK1 viz obrázek 14, OMK2 viz obrázek 15) neměla statisticky významný vliv na líhnutí vajíček. Statisticky významný vliv na líhnutí vajíček měla pouze pozitivní kontrola OMK207. U pozitivní kontroly ABZ nebyl pozorován ovicidní účinek, pravděpodobně z důvodu použití příliš nízké koncentrace ABZ.

5.1.2 WR kmen

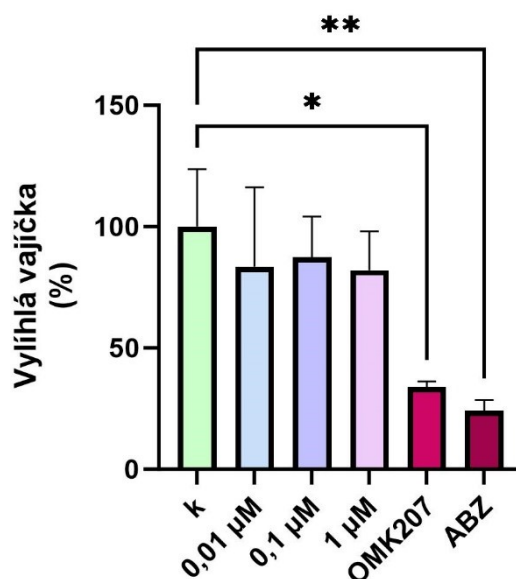
EHT byl využit pro sledování účinku OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček WR kmene *H. contortus*. Poměr vylíhnutých larev k nevylíhnutým vajíčkům byl vztažen ke kontrolní skupině, která byla definována jako 100 %. Tyto hodnoty jsou prezentovány v tabulce 6 a obrázku 16 pro OMK1 a v tabulce 7 a obrázku 17 pro OMK2. Pro porovnání účinnosti testovaných látek byly do experimentu zahrnuty i látky s prokázaným efektem (OMK207, ABZ), které sloužily jako pozitivní kontrola. Každý experiment byl proveden v triplikátech, ze kterých byl následně spočítán průměr a směrodatná odchylka.

Tabulka 6: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček pro WR kmen

WR	kontrola	OMK1			OMK207	ABZ
Koncentrace	DMSO 0,5 %	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	10 μM
Průměr (%)	100,00	83,58	87,39	82,11	31,53	24,24
SD (%)	19,39	26,64	13,69	13,02	15,00	3,56

Tabulka 7: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček pro WR kmen

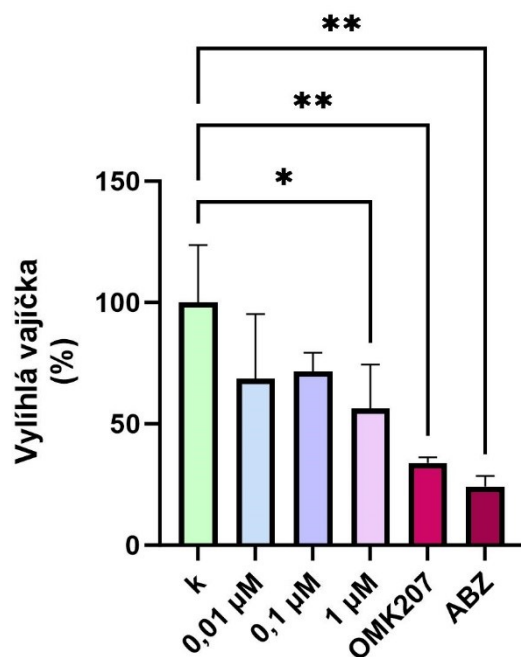
WR	kontrola	OMK2			OMK207	ABZ
Koncentrace	DMSO 0,5 %	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	20 μM	10 μM
Průměr (%)	100,00	68,53	71,58	56,33	31,53	24,24
SD (%)	19,39	21,78	6,29	14,76	15,00	3,56



Obrázek 16: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček u WR kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Výsledky naměřené u vajíček inkubovaných pouze s rozpouštědlem testovaných látek (DMSO o koncentraci 0,5 %) byly využity jako negativní kontrola (k). Testované látky byly použity v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . V pozitivních kontrolách byl OMK207 použit v koncentraci 20 μM a ABZ 10 μM .



Obrázek 17: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček u WR kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$*

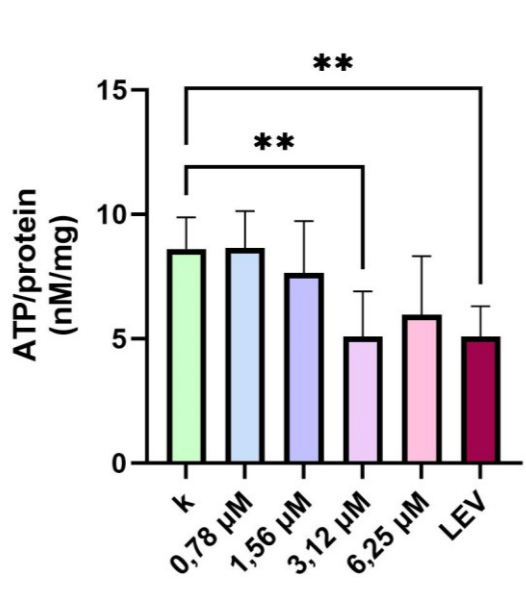
Na základě provedených experimentů na vajíčkách WR kmene byla ovicidní aktivita OMK2 prokázána při koncentraci 1 μM . Avšak u látky OMK1 ve všech testovaných koncentracích ovicidní aktivita nebyla pozorována. Významné snížení líhnutí vajíček bylo zaznamenáno u pozitivní kontroly OMK207 a ABZ.

5.2 Vliv OMK1 a OMK2 na viabilitu a motilitu xL3 larev

5.2.1 ISE kmen

Metoda luminiscenční detekce ATP byla využita pro sledování poklesu viability larev xL3 ISE kmene vlivem látek OMK1 a OMK2. Zkoumané látky byly testovány ve 4 koncentracích (0,78; 1,56; 3,12 a 6,25 μM). Larvy inkubované pouze s rozpouštědlem testovaných látek (1 % roztok DMSO) sloužily jako negativní kontrola (k). Jako pozitivní kontrola byl zvolen LEV (10 μM), u kterého už byl dříve prokázán účinek na snížení viability xL3 *H. contortus*.

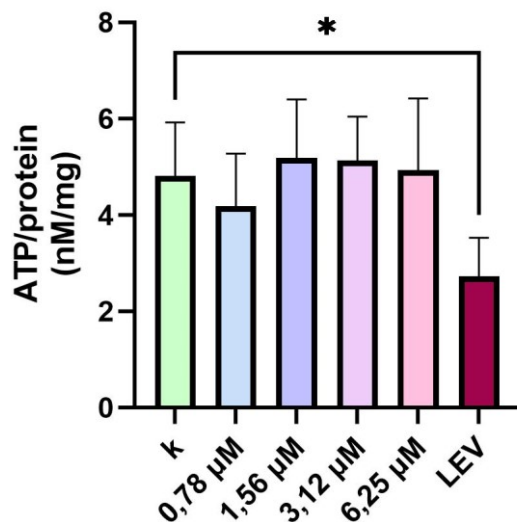
Výsledné hodnoty ATP byly vztaheny k množství bílkoviny ve vzorcích. Vzorky byly stanovovány ve 12 replikátech, ze kterých byl spočítán průměr a jejich směrodatná odchylka viz obrázek 18 a obrázek 19.



Obrázek 18: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$

Statisticky významný pokles viability larev xL3 nastal u látky OMK1 při koncentraci 3,12 μM a u pozitivní kontroly LEV. Ostatní koncentrace OMK1 se jeví neúčinné na xL3 ISE kmene.

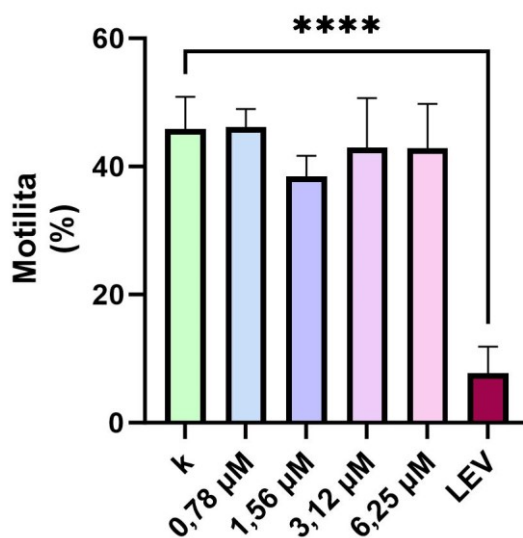


Obrázek 19: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$*

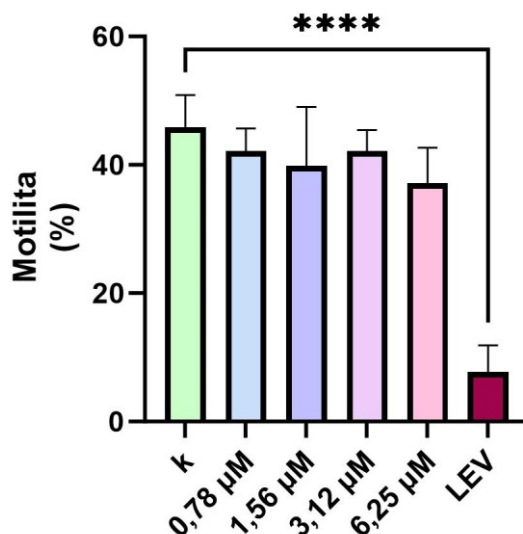
Statisticky významný pokles viability byl zaznamenán pouze u vzorků inkubovaných s LEV, tudíž se všechny použité koncentrace OMK2 jeví jako neúčinné.

Motilita larev xL3 byla měřena v tetraplikátech po 72 hodinách od počátku experimentu. Tato data byla zprůměrována a byla u nich vypočtena směrodatná odchylka.



Obrázek 20: Vliv OMK1 na motilitu xL3 ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) **** $P \leq 0,0001$*



Obrázek 21: Vliv OMK2 na motilitu xL3 ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) **** $P \leq 0,0001$*

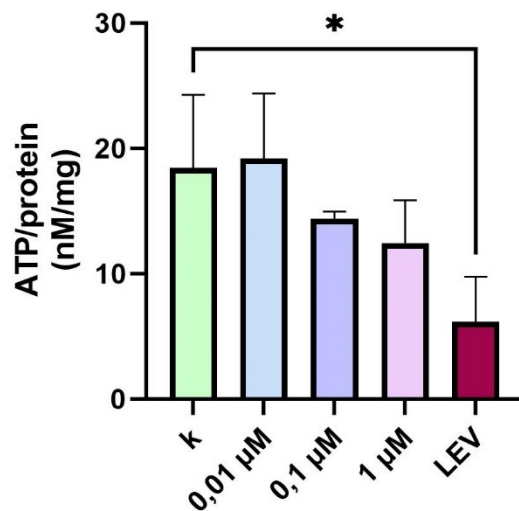
Výsledky jsou znázorněny na obrázku 20 (pro OMK1) a obrázku 21 (pro OMK2).

V rámci experimentu nebyl zaznamenán relevantní pokles hodnot motilit po inkubaci xL3 v OMK1 a OMK2. Z tohoto hlediska se léčiva nejeví jako účinná. Statisticky významný pokles motility byl naměřen pouze u vzorků inkubovaných s LEV.

Vzhledem k zjištění velmi omezené rozpustnosti derivátů OMK ve vodě byla provedena opakovaná analýza účinnosti OMK1 a OMK2 u xL3 larev. Pro testované látky byly zvoleny následující koncentrace: 0,01; 0,1 a 1 μM. Jako negativní kontrola (k) byl použit DMSO (1 %) a jako pozitivní kontrola LEV (10 μM).

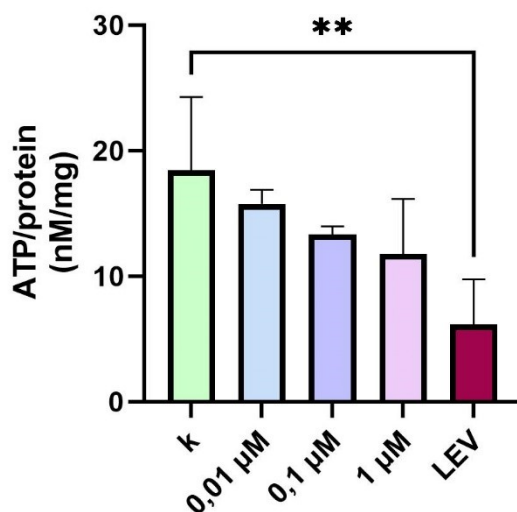
Vzorky byly zhotoveny v tetraplikátech. Z naměřených dat byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Tato data byla vynesena do sloupcových grafů prezentovaných na obrázcích 22 (OMK1) a 23 (OMK2).

Statistická analýza dat prokázala, že látky OMK1 a OMK2 nemají v testovaných koncentracích statisticky významný vliv na viabilitu larev xL3 ISE kmene. Statisticky významné snížení viability bylo pozorováno pouze u vzorků s LEV.



Obrázek 22: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene

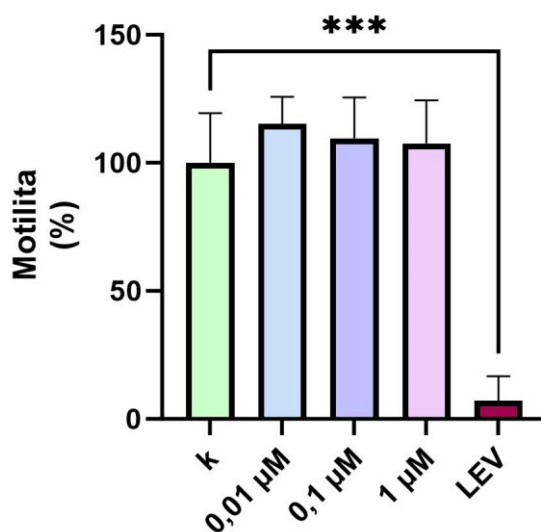
*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$*



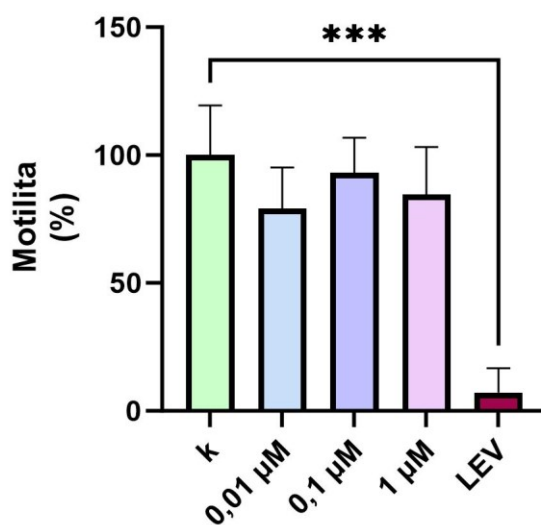
Obrázek 23: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$*

Motilita larev xL3 ISE kmene byla měřena v tetraplikátech pro každou testovanou látku. Poměr pohyblivých larev k celkovému počtu larev byl vyjádřen v procentech. Z naměřených dat byl vypočten průměrný poměr pohyblivosti a směrodatná odchylka. Výsledky jsou prezentovány na obrázku 24 (OMK1) a obrázku 25 (OMK2).



Obrázek 24: Vliv OMK1 na motilitu u xL3 ISE kmene
*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) *** $P \leq 0,001$*



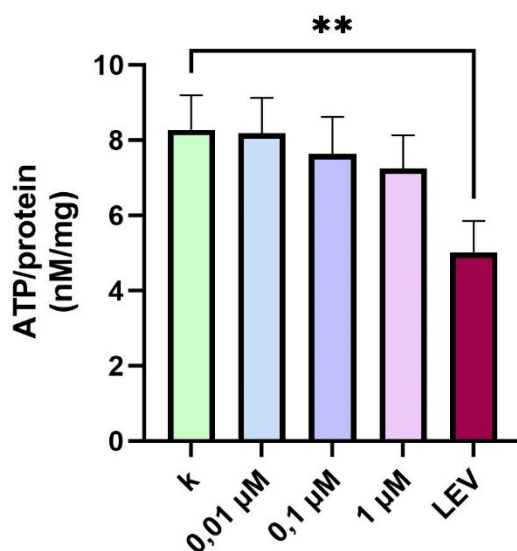
Obrázek 25: Vliv OMK2 na motilitu u xL3 ISE kmene
*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) *** $P \leq 0,001$*

Na základě provedených testů sledujících vliv OMK1 a OMK2 na motilitu u larev xL3 ISE kmene lze konstatovat, že testované deriváty v žádné z testovaných koncentrací

neovlivňují motilitu larev. Jediná látka, která prokazatelně snížila motilitu larev, byl LEV, jak je patrné z výše uvedených obrázků.

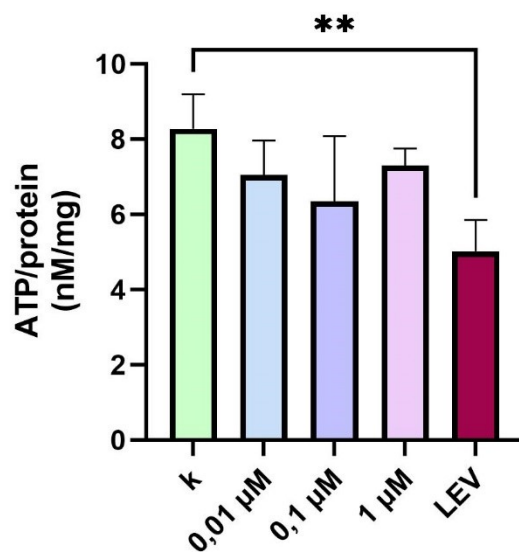
5.2.2 WR kmen

Larvy xL3 kmene WR byly inkubovány s deriváty OMK1 a OMK2 a po inkubaci byla v larvách stanovena koncentrace ATP a koncentrace proteinů. Látky OMK1 a OMK2 byly testovány v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . Jako negativní kontrola byly použity larvy inkubované pouze s 1% DMSO (k), v pozitivní kontrole byly larvy inkubované v LEV 10 μM . Vzorky byly analyzovány ve 12 replikátech pro každou testovanou látku. Z naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.



Obrázek 26: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 WR kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$*

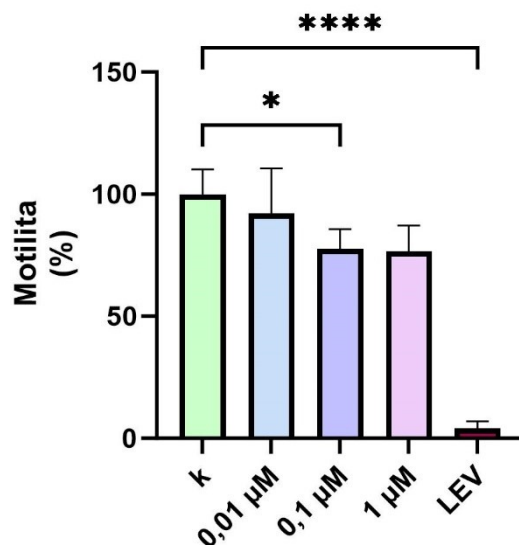


Obrázek 27: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 WR kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$*

Statistická analýza dat prokázala, že žádná z testovaných látek (OMK1 obrázek 26 a OMK2 obrázek 27) v žádné z testovaných koncentrací neměla významný vliv na viabilitu larev WR kmene. Naproti tomu u vzorků inkubovaných s LEV došlo k očekávanému a statisticky významnému snížení viability larev.

Motilita larev byla hodnocena v tetraplikátech pro každou testovanou látku. Bylo vypočítáno procento pohybujících se larev v poměru k celkovému počtu larev. Z naměřených dat byl vyčíslen průměr a směrodatná odchylka. Na základě těchto dat byly vytvořeny následující grafy.

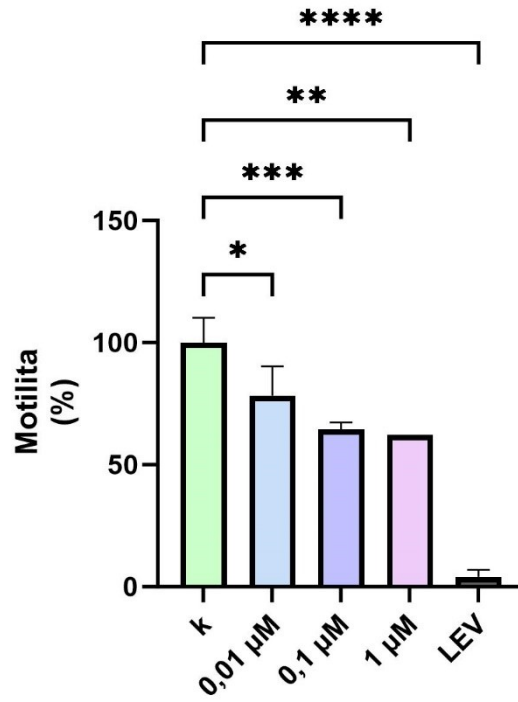


Obrázek 28: Vliv OMK1 na motilitu xL3 u WR kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$*

Statistický významné snížení motility nastalo u larev inkubovaných s OMK1 (obrázek 28) v koncentraci 0,1 μM . Látka OMK1 se tedy jeví jako potenciálně účinná proti larvám xL3 u WR kmene.

Inkubace larev s OMK2 (obrázek 29) ve všech testovaných koncentracích vedla ke statisticky významnému snížení motility larev. Na základě těchto výsledků se OMK2 jeví jako účinná látka proti larvám xL3 WR kmene.



Obrázek 29: Vliv OMK2 na motilitu xL3 u WR kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$;
 **** $P \leq 0,0001$

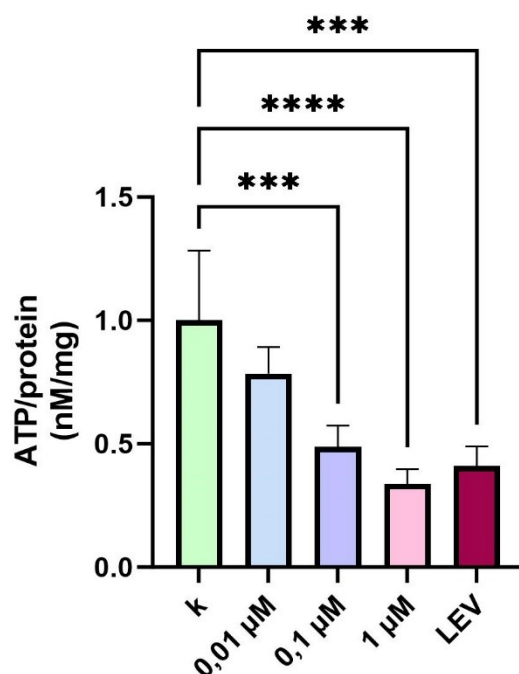
5.3 Vliv *OMK1* a *OMK2* na viabilitu dospělců

Dospělci *H. contortus* byli inkubováni s látkami *OMK1* a *OMK2* po dobu 48 hodin. Po inkubaci byli dospělci sesbíráni a bylo v nich pomocí luminiscenční metody stanoveno ATP a následně změřen obsah proteinů metodou BCA. Měření probíhalo v duplikátech, z nichž byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Koncentrace zkoumaných látek byly 0,01; 0,1 a 1 μM . Jako negativní kontrola (k) byl vždy použit 1% DMSO a jako pozitivní kontrola LEV o koncentraci 10 μM .

Získaná data (koncentrace ATP normalizována na množství proteinů) byla následně vynesena do grafů.

5.3.1 ISE kmen

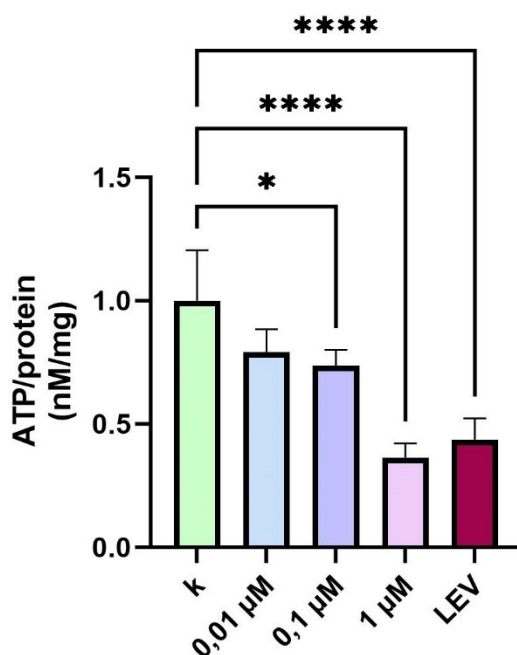
Výsledky experimentů provedených s *OMK1* na samicích ISE kmene jsou prezentovány na obrázku 30. Na základě výsledků lze říct, že *OMK1* v koncentracích 0,1 a 1 μM snižuje viabilitu u dospělých samic ISE kmene.



Obrázek 30: Vliv *OMK1* na hladinu ATP u samic ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$

Výsledky experimentů s OMK1 provedených na samcích ISE kmene jsou prezentovány na obrázku 31. Na základě provedených experimentů lze říct, že látka OMK1 statisticky významně snižuje viabilitu dospělých samců *H. contortus* ISE kmene při koncentracích 0,1 a 1 μM .

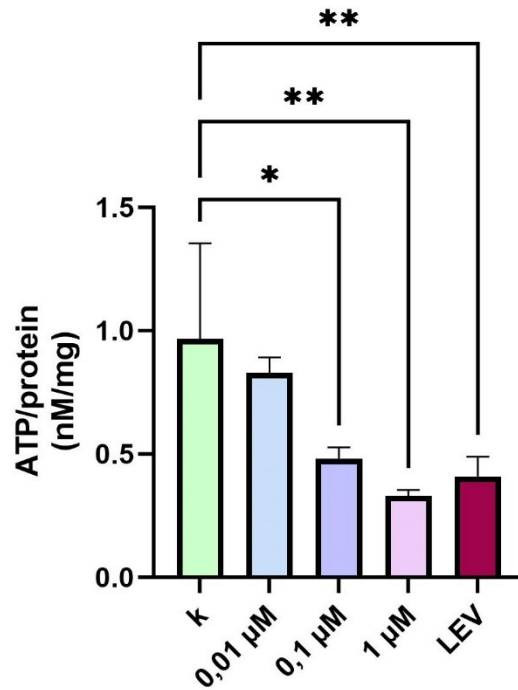


Obrázek 31: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samců ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$*

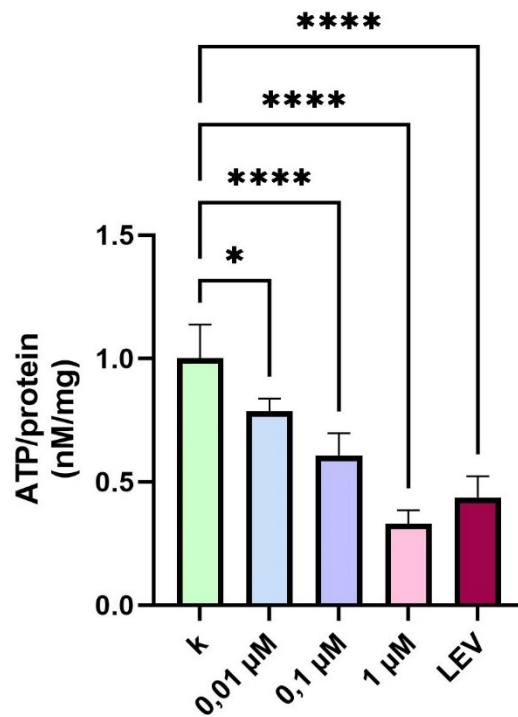
Výsledky experimentů provedených s OMK2 na samicích ISE kmene jsou prezentovány na obrázku 32. Z výsledků měření vyplývá, že OMK2 při koncentracích 0,1 a 1 μM snižuje hladinu ATP u samic.

Výsledky experimentů provedených s OMK2 na samcích ISE kmene jsou prezentovány na obrázku 33. U samců ISE kmene došlo k poklesu hladiny ATP při všech měřených koncentracích látky OMK2 (0,01; 0,1 a 1 μM).



Obrázek 32: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samic ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$



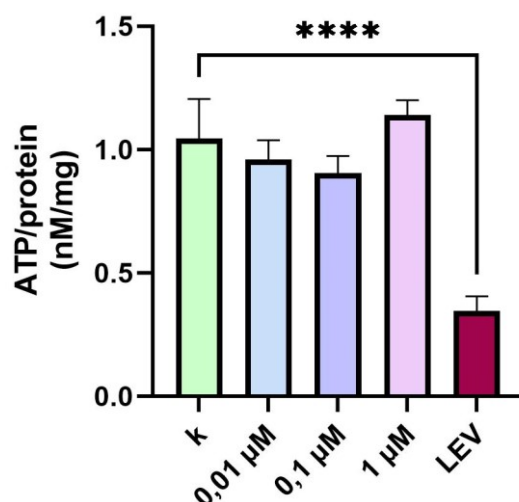
Obrázek 33: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samců ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; **** $P \leq 0,0001$

5.3.2 IRE kmen

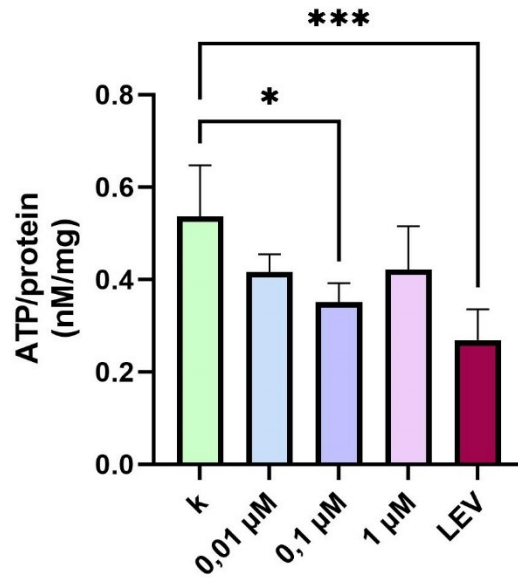
Výsledky experimentů provedených s OMK1 na samicích a samcích IRE kmene jsou prezentovány na obrázku 34 a 35. U samic IRE kmene nebyl pozorován statisticky významný pokles viability vlivem látky OMK1 v žádné z testovaných koncentrací. Jedinou látkou, u které byl pozorován statisticky významný pokles ATP, byl LEV, který byl v experimentu použit jako pozitivní kontrola.

U samců kmene IRE nastalo statisticky významné snížení viability při koncentraci látky OMK1 0,1 μM . V případě koncentrací 0,01 a 1 μM nebyl pozorován statisticky významný účinek na viabilitu samců kmene IRE.



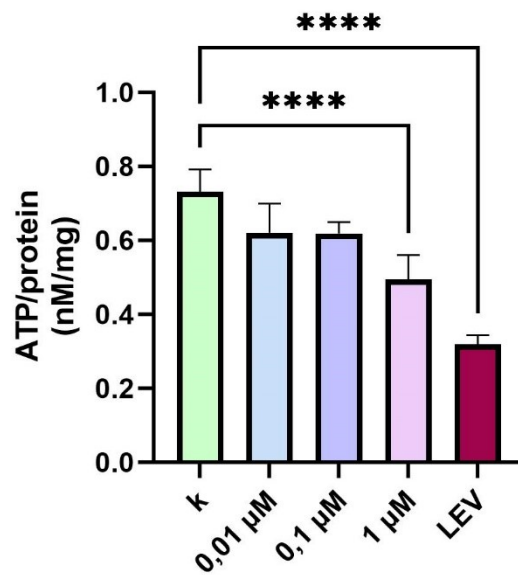
Obrázek 34: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samic IRE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) **** $P \leq 0,0001$*



Obrázek 35: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samců IRE kmene

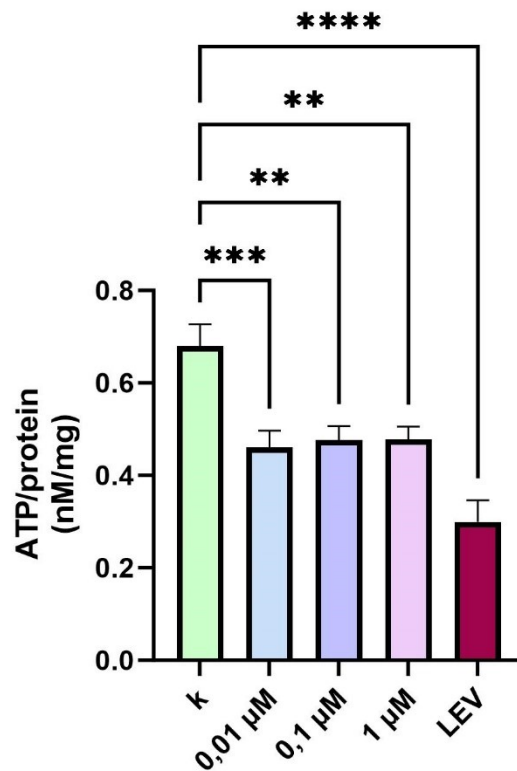
Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$



Obrázek 36: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samic IRE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) **** $P \leq 0,0001$

Výsledky experimentů provedených s látkou OMK2 na samicích a samcích IRE kmene jsou prezentovány na obrázku 36 a 37. V rámci hodnocení vlivu látky OMK2 na viabilitu samic IRE kmene byly statisticky významné výsledky pozorovány pouze při koncentraci 1 μ M. V případě samců IRE kmene došlo k signifikantnímu poklesu viability vlivem všech testovaných koncentrací OMK2.



Obrázek 37: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samců IRE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$;

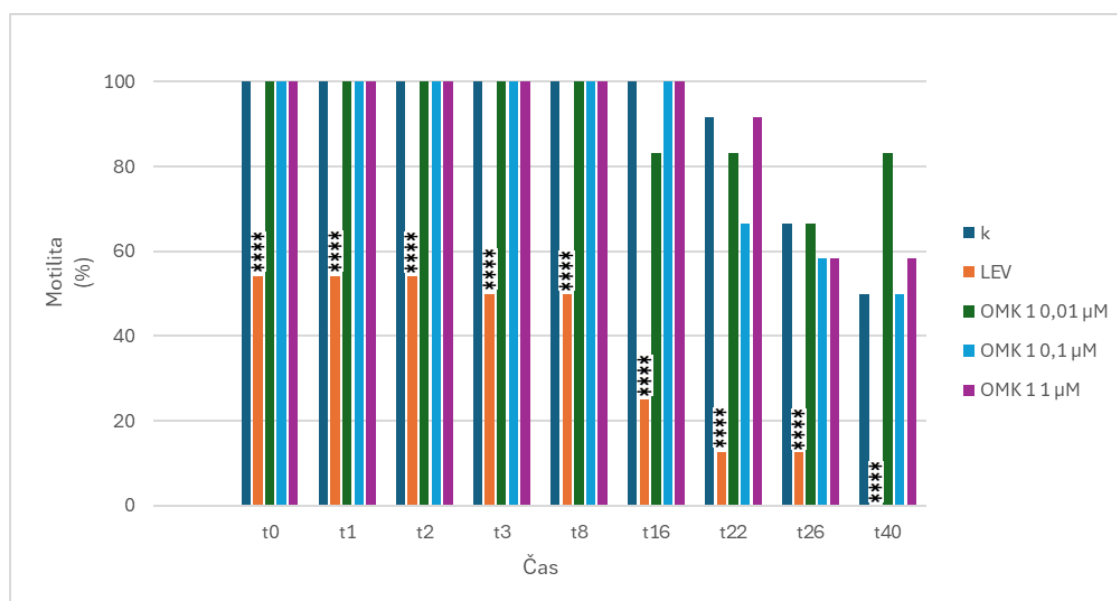
**** $P \leq 0,0001$

5.4 Vliv *OMK1* a *OMK2* na motilitu dospělců

Analýza motilit byla provedena v 6 replikátech pro každou testovanou koncentraci, a to odděleně pro samce a samice. Motilita byla odečtena v časech $t_1, t_2, t_3, t_8, t_{16}, t_{22}, t_{26}$ a t_{40} . Z každé jamky byl spočítán poměr pohyblivých červů ku celkovému počtu červů vyjádřený v procentech. Následně byla data ze všech 6 replikátů zprůměrována.

5.4.1 Samice ISE kmene

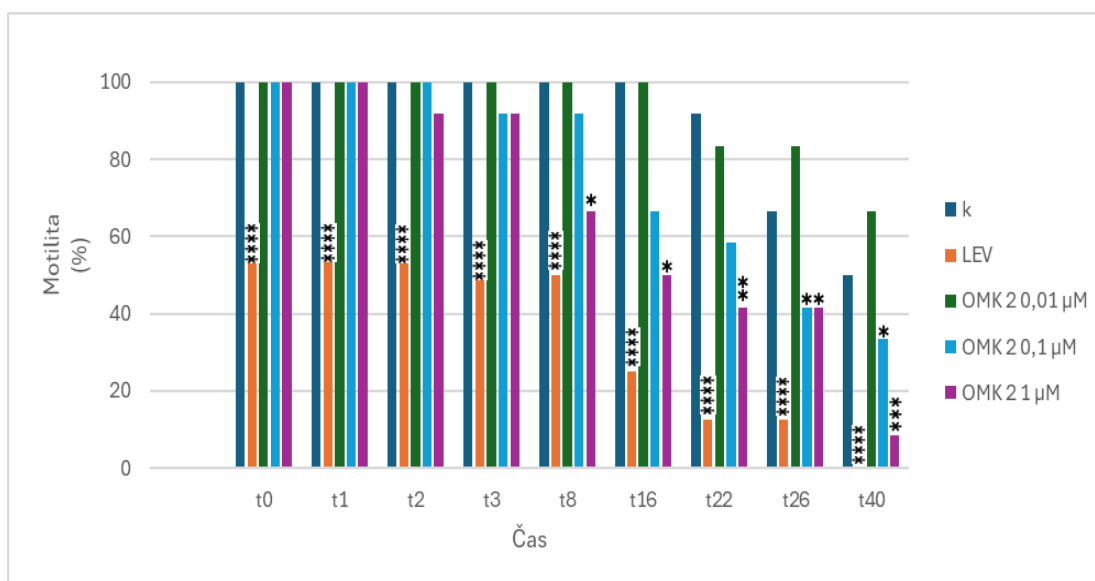
Experiment byl proveden za účelem hodnocení vlivu látek *OMK1* a *OMK2* na motilitu samic kmene ISE. Látky byly testovány v koncentracích 0,01; 0,1 a 1 μM . Jako negativní kontrola (k) byl použit 1% DMSO a jako pozitivní kontrola byl použit 10 μM LEV.



Obrázek 38: Vliv *OMK1* na motilitu samic ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) **** $P \leq 0,0001$*

Obrázek 38 prezentuje záznam měření průběžné motility samic inkubovaných v *OMK1*. Za dobu 40 hodin nenastalo významné snížení motility u derivátu *OMK2* v žádné měřené koncentraci (0,01; 0,1 a 1 μM). Z tohoto důvodu se látka *OMK1* jeví jako neúčinná pro samice ISE kmene.



Obrázek 39: Vliv OMK2 na motilitu samic ISE kmene

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$*

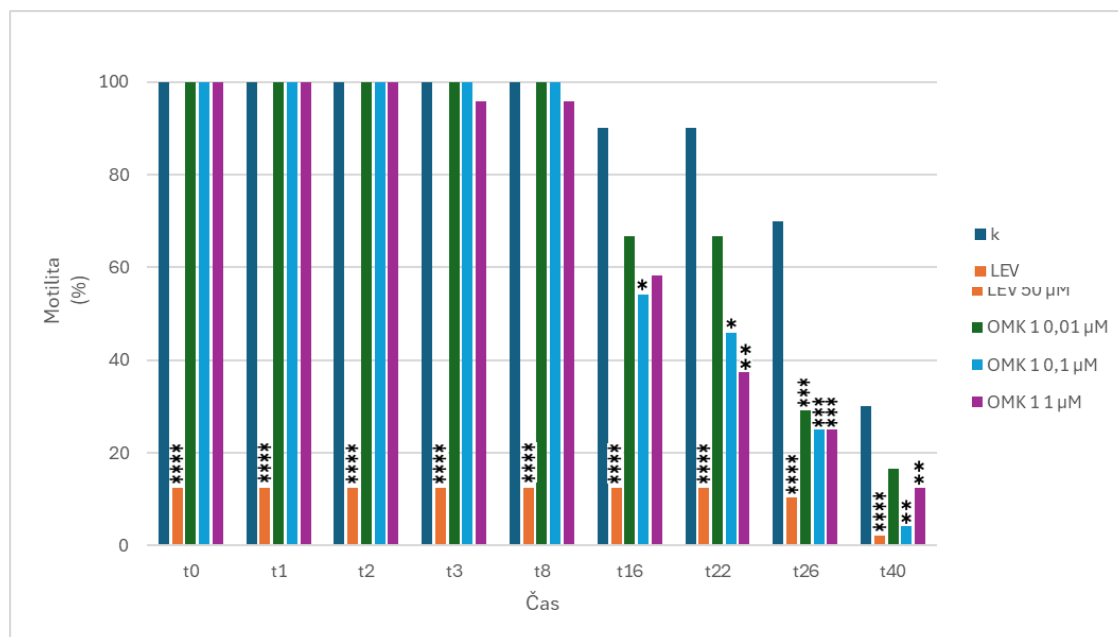
U látky OMK2 bylo prokázáno snížení motility v čase t8 u koncentrace 1 μM , v čase t26 byl zaznamenán pokles i u koncentrace 0,1 μM . Data z průběžného měření jsou zaznamenána na obrázku 39. U OMK2 bylo prokázáno snížení pohyblivosti při koncentracích 0,1 a 1 μM u samic ISE kmene.

5.4.2 Samci ISE kmene

V rámci experimentu byl hodnocen vliv látek OMK1 a OMK2 na motilitu samců kmene ISE. K posouzení vlivu obou látek byly použity tři různé koncentrace: 0,01; 0,1 a 1 μM . Pro srovnání účinků OMK1 a OMK2 byla zahrnuta negativní kontrola (k) v podobě 1% DMSO a pozitivní kontrola v podobě 10 μM LEV.

Experimentální postup zahrnoval expozici samců kmene ISE testovaným látkám v daných koncentracích po specifikovanou dobu. Následně byla hodnocena motilita samců pomocí sledování pohybu jednotlivých samců. Vyhodnocená data byla statisticky analyzována za účelem kvantifikace vlivu OMK1 a OMK2 na motilitu samců v porovnání s negativní kontrolou.

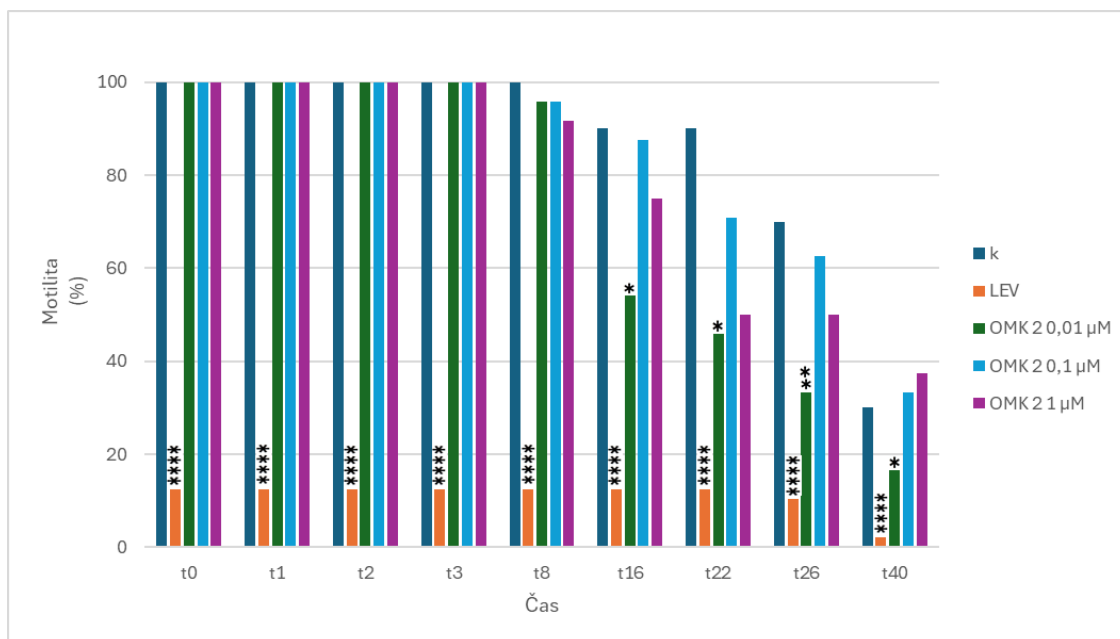
Účinek na snížení motility byl u látky OMK1 zaznamenán v čase t16 u koncentrace 0,1 μM . V čase t22 došlo k signifikantnímu snížení hodnoty motility u samců při koncentraci 1 μM , v čase 26 bylo toto snížení sledováno u všech koncentrací viz obrázek 40. Látka OMK1 se jeví jako účinná ve všech testovaných koncentracích u samců ISE kmene.



Obrázek 40: Vliv OMK1 na motilitu samců ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$

Poslední měření motility v určených časových bodech, bylo provedeno pro látku OMK2 u samců ISE kmene. Od t16 až do ukončení experimentu byl sledován pokles motility v koncentraci 0,01 μM . Jelikož došlo ke statisticky významnému poklesu motility při koncentraci 0,01 μM , tak se jeví tato látka jako účinná viz obrázek 41.



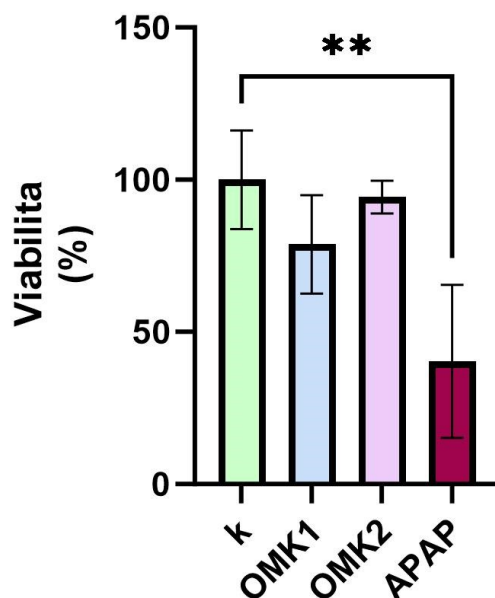
Obrázek 41: Vliv OMK2 na motilitu samců ISE kmene

Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; **** $P \leq 0,0001$

5.5 Vliv *OMK1* a *OMK2* na viabilitu jaterní řezů

Vliv látek *OMK1* a *OMK2* na hepatocyty byl hodnocen v koncentraci 1 μM . Negativní kontrolou (*k*) byl 1% DMSO a pozitivní kontrolou byl APAP v koncentraci 1 μM . Vzorky byly připraveny v pěti replikátech, z nichž byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka (SD).

Z obrázku 42 je patrné, že látky *OMK1* a *OMK2* v koncentraci 1 μM nemají statisticky významný vliv na snížení životaschopnosti hepatocytů. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že v testované koncentraci nejsou tyto látky hepatotoxické.



Obrázek 42: Vliv *OMK1* a *OMK2* na viabilitu jaterních řezů

*Statisticky významný rozdíl oproti kontrole (k) ** $P \leq 0,01$*

6 Diskuse

Helmintózy představují celosvětový problém, který ohrožuje zdraví lidí i zvířat. Paraziti, jako je *H. contortus*, způsobují značné ekonomické ztráty v chovu malých přežvýkavců jako jsou ovce a kozy. Zvládnutí helmintóz vyžaduje komplexní přístup zahrnující prevenci, diagnostiku, léčbu a kontrolu.

V posledních desetiletích narůstá u helmintů výskyt rezistence vůči existujícím anthelmintikům, což představuje vážnou hrozbu pro kontrolu helmintóz. Nalezení nových a účinných léčiv je nezbytné pro udržení účinnosti léčby a zajištění zdraví zvířat i lidí. Pochopení jejich mechanismu účinku i mechanismu vývoje rezistence u helmintů je klíčové pro vývoj nových a účinných léčiv v boji proti tomuto onemocnění.

Cílem této diplomové práce bylo studovat anthelmintickou účinnost a hepatotoxicitu nových derivátů kyseliny benzhydroxamové OMK1 a OMK2 pomocí vybraných laboratorních testů s využitím několika vývojových stádií citlivých i rezistentních kmenů *Haemonchus contortus* a precizních tkáňových řezů z ovčích jater.

Prvním úkolem pro splnění těchto cílů bylo získat potřebný biologický materiál, konkrétně vajíčka, larvy a dospělé parazity *H. contortus*. Toho bylo dosaženo nakažením ovčí tímto parazitem. Výzkum s parazity a hostitelskými zvířaty s sebou nese řadu etických otázek, které je nutné důkladně zvážit a zodpovědně řešit. Všechny kroky výzkumu by měly být prováděny s maximálním ohledem na minimalizaci bolesti a utrpení zvířat. Se zvířaty by mělo být dobře zacházeno a měla by jim být poskytnuta adekvátní péče včetně krmení a dohledu veterináře. Výzkum by měl probíhat pod záštitou etické komise, která posoudí jeho etické aspekty a schválí jeho provedení. Dodržování etických standardů, transparentnost a zodpovědné provedení výzkumu jsou nezbytné pro zajištění eticky korektního a věrohodného výzkumu. (Díaz et al., 2021).

Nejprve byl sledován účinek OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček *H. contortus*. Výsledky ukázaly, že OMK1 nemá ovicidní účinek na vajíčka *H. contortus*. Látka OMK2 při koncentraci 1 μM ovicidní účinek vykazovala. Je důležité zdůraznit, že anthelmintika musí být účinná hlavně proti dospělým stádiím *H. contortus*, protože dospělci poškozují zdraví ovcí. Ovicidní účinek je však jistým benefitem, protože inhibicí líhnutí vajíček lze zabránit šíření parazita v chovech ovcí a snížit tak riziko reinfekce.

Výsledky testování vlivu OMK1 a OMK2 na odpláštěné larvy xL3 *H. contortus* jsou nejednoznačné. V prvním testu sledující vliv derivátů na viabilitu se koncentrace 3,12 μM OMK1 jevila jako účinná na xL3 ISE kmene, ale v testech motility, se neprokázala žádná anthelmintická aktivita. To může naznačovat náhodný pozitivní výsledek v prvním testu, ovlivněný jinými faktory, jako je variabilita v aktivitě parazitů nebo drobné odchylky v experimentálních podmínkách. U kmene WR sice nenastalo statisticky významné snížení viability xL3 larev po expozici OMK1 a OMK2, ale došlo ke statisticky významnému snížení motility. Během testování látek OMK1 i OMK2 v koncentracích vyšších než 1 μM byl zjištěn problém s velmi omezenou rozpustností ve vodném prostředí a s jejich krystalizací. To mohlo ovlivnit výsledky některých testů, a to jak vlivu na viabilitu, tak i na motilitu. Krystalizace mohla vést k nerovnoměrnému rozložení účinných látek v testovacím médiu a k podhodnocení jejich skutečného účinku. Proto byly v dalších experimentech použity pouze nižší koncentrace a pro další výzkum by bylo vhodné látky modifikovat tak, aby se zlepšila jejich rozpustnost. Vzhledem k nejednoznačným výsledkům bude pro komplexní posouzení anthelmintického potenciálu OMK1 a OMK2 proti xL3 larvám *H. contortus* nezbytné experimenty zopakovat.

Nejdůležitějším výsledkem našich experimentů je zjištění slibné anthelmintické aktivity derivátů OMK1 i OMK2 proti dospělcům *H. contortus*. Po expozici samců i samic kmene ISE látkou OMK1 v koncentracích 0,1 a 1 μM došlo ke statisticky významnému snížení viability u obou pohlaví. Tyto výsledky naznačují, že OMK1 má účinek proti dospělcům *H. contortus* kmene ISE. U kmene IRE výsledky nebyly tak jednoznačné. U samic nenastalo statisticky významné snížení viability vlivem OMK1 v žádné z testovaných koncentrací, zatímco u samců se snížení viability projevilo pouze u OMK1 v koncentraci 0,1 μM . Slibná anthelmintická aktivita látky OMK2 se jeví u obou kmenů (ISE i IRE) a obou pohlaví. U samců ISE kmene byla OMK2 účinná ve všech testovaných koncentracích (0,01; 0,1 a 1 μM), zatímco u samic ISE kmene se snížení viability projevilo vlivem OMK2 v koncentraci 0,1 a 1 μM . U samic IRE kmene nastalo statisticky významné snížení viability pouze u koncentrace 1 μM , zatímco u samců IRE kmene došlo k poklesu viability ve všech testovaných koncentracích. Tyto výsledky naznačují, že OMK2 má slibný anthelmintický účinek proti dospělcům *H. contortus* u obou kmenů a obou pohlaví.

Stanovení viability u dospělců pomocí měření ATP bylo doplněno též sledováním jejich motility. K dispozici byli pouze dospělci kmene ISE. Látka OMK1 statisticky významně nesnižovala motilitu u samic ISE kmene. U samců ISE došlo k poklesu motility v čase t8 u koncentrace 0,1 μM a ke statisticky významnému snížení v čase t26 u obou testovaných koncentrací (0,1 a 1 μM). Tyto výsledky naznačují, že OMK1 ovlivňuje motilitu samců. Látka OMK2 ovlivnila motilitu samic i samců ISE kmene. U samic došlo k poklesu motility v čase t8 u koncentrace 1 μM a v čase t26 nastalo statisticky významné snížení motility i u koncentrace 0,1 μM . U ISE samců látka OMK2 ovlivnila motilitu v čase t16 u koncentrace 0,01 μM . Tyto výsledky naznačují, že OMK2 ovlivňuje motilitu dospělců *H. contortus*.

Výsledky sledování motility v čase ukázaly, že i u kontrolní skupiny dochází k postupnému snižování motility dospělců *H. contortus*. V čase t16 bylo pozorováno mírné snížení motility a v čase t40 nastalo snížení motility téměř o 50 %. To naznačuje, že testované médium a podmínky experimentu nejsou ideální pro dlouhodobou inkubaci dospělých parazitů. Z tohoto důvodu by bylo vhodné zkrátit dobu experimentu. Zkrácením inkubační doby by se minimalizoval vliv suboptimálních podmínek na motilitu parazitů a zpřesnila by se data ohledně vlivu testovaných látek na motilitu. Inkubační doba 24 h by mohla být dostatečná pro provedení tohoto experimentu. Pro prodloužení životaschopnosti dospělých parazitů a zlepšení jejich motility během experimentu by mohlo být vhodné optimalizovat testované médium a životní podmínky. To by mohlo zahrnovat úpravu složení média, teploty, pH a dalších faktorů. U dospělců inkubovaných v testovaných látkách může být obtížné odlišit usmrcené jedince od paralyzovaných. Pro přesnější hodnocení motility by mohlo být použito vyhodnocování pomocí softwaru.

Pro odhalení případné hepatotoxicity látek OMK1 a OMK2 byly připraveny precizní řezy z ovčích jater a inkubovány s testovanými látkami po dobu 24 hodin. Výsledky experimentu ukázaly, že látky OMK1 a OMK2 v koncentraci 1 μM nemají toxický vliv na ovčí játra. To naznačuje, že v této koncentraci jsou tyto látky z hlediska hepatotoxicity bezpečné. Je důležité zdůraznit, že toto tvrzení platí pouze pro koncentraci 1 μM , neboť vyšší koncentrace nemohly být testovány vzhledem k omezené rozpustnosti. Pro posouzení celkové bezpečnosti OMK1 a OMK2 je nutný další výzkum, který by zahrnoval testy toxicity i v jiných orgánech a ve vyšších koncentracích

Výsledky této diplomové práce naznačují, že OMK1 a OMK2 mají slibný potenciál jako anthelmintika proti *H. contortus*. Obě tyto látky prokázaly během experimentů anthelmintickou aktivitu. OMK2 se ukázala jako obzvláště slibná s nižšími koncentracemi potřebnými k eliminaci parazita. I když dosavadní výsledky ukazují slibný potenciál OMK1 a OMK2 jako anthelmintik, pro plné posouzení jejich terapeutické hodnoty je nutný další komplexní výzkum.

Pro budoucnost léčby helmintóz je velmi důležité neustále hledat a vyvíjet nová léčiva. V současné době se kromě látek OMK1 a OMK2 testuje například derivát chinolinu ABX464, který působí jako účinný nematocid, avšak tato látka ještě musí projít řadou optimalizací (Shanley et al., 2024). Dále se zkoumá účinnost nových benzimidazolových derivátů BZD31, BZD46, BZD56 a BZD59 jako potenciálních anthelmintik. Obzvláště sloučeniny BZD31 a BZD59 se jeví jako slibné látky (Valderas-García et al., 2024). Další nově syntetizovanou látkou je derivát chinolin-6-karboxylové kyseliny II-1. U látky II-1 byly prokázány ovicidní a larvicidní účinky proti GIT parazitům (Kołodziej et al., 2023). Vývoj nových anthelmintik je klíčovým bodem v boji proti helmintózám a udržení zdraví přežvýkavců. Neustálé objevování a testování slibných látek otevírá cestu k inovativním léčivům s potenciálem kontrolovat helmintózy a chránit zdraví zvířat.

7 Závěr

- 1) V rámci přípravy experimentů se úspěšně podařilo získat vajíčka, larvy a dospělé *H. contortus*.
- 2) Při testování vlivu sloučenin OMK1 a OMK2 na líhnutí vajíček parazita *H. contortus* nebyl u látky OMK1 v testovaných koncentracích prokázán ovicidní účinek. U látky OMK2 byl ovicidní účinek prokázán v koncentraci 1 μ M.
- 3) Vliv testovaných látek (OMK1 a OMK2) na viabilitu a motilitu xL3 byl nejednoznačný.
- 4) Slibná anthelmintická aktivita se jeví u obou látek OMK1 a OMK2 u dospělců *H. contortus*. Účinky OMK1 byly výraznější u ISE kmene, kde došlo ke snížení viability u obou pohlaví než u IRE kmene. Statisticky významné účinky u IRE kmene nastaly pouze u samců, u samic nikoli. Látkou OMK1 byla ovlivněna pouze motilita ISE samců, u ISE samic nebylo zaznamenáno statisticky významné snížení motility. Látkou OMK2 byla snížena viabilita u obou pohlaví ISE i IRE kmene. OMK2 se proto jeví jako více účinná látka, jelikož ovlivňovala viabilitu IRE samic na rozdíl od OMK1. S tímto tvrzením korespondují i výsledky motility, kdy látka OMK2 snižovala motilitu u obou pohlaví ISE kmene.
- 5) Na základě provedených testů na precizních jaterních řezech nebyl prokázán negativní vliv látek OMK1 a OMK2 na viabilitu hepatocytů. Z tohoto důvodu, lze tvrdit že tyto sloučeniny nejsou hepatotoxické a nepoškozují jaterní buňky při koncentraci 1 μ M.

8 Seznam zkratek

ABX464 – derivát chinolinu

ABZ – albendazol

AMP – adenosinmonofosfát

ANOVA – analýza variance

APAP – paracetamol

ATP – adenosintrifosfát

BCA – kyselina bicinchoninová

BSA – hovězí sérový albumin

BZD31, BZD46, BZD56 a BZD59 – benzimidazolové deriváty

$CaCl_2$ – chlorid vápenatý

$CuSO_4 \cdot 6 H_2O$ – síran měďnatý hexahydrát

ddH₂O – ultračistá voda

ddPCR – kapková digitální PCR

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E. coli – *Escherichia coli*

EBSS – english balanced salt solution (vyvážený sodný roztok typu EBSS)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EHT – test líhnutí vajíček

F1/1 roztok – fyziologický roztok

FBS – fetální hovězí sérum

FECRT – sledování počtu vajíček v trusu infikovaných zvířat

GIT – gastrointestinální trakt

H. contortus – *Haemonchus contortus*

HTS – vysoce výkonný screening (anglicky high-throughput screening)

II-1 - derivát chinolin-6-karboxylové kyseliny

IRE – kmen rezistentní vůči benzimidazolovým anthelmintikům

ISE – kmen citlivý vůči anthelmintikům

k – negativní kontrola

KCl – chlorid draselný

K_m – Michaelisova konstanta

L1 – larvy prvního stádia

L2 – larvy druhého stádia
L3 – larvy třetího stádia
L4 – larvy čtvrtého stádia
L5 – stádium časně dospělosti
LDT – test vývoje larev
LEV – levamisol
LMIA – test migrace larev
 $MgCl_2$ – chlorid hořečnatý
NaCl – chlorid sodný
 Na_2CO_3 – uhličitá sodný
 $NaHCO_3$ – hydrogenuhličitan sodný
NaOH – hydroxid sodný
NCEs – nově syntetizované chemické sloučeniny
OMK1 – derivát kyseliny benzhydroxamové 1
OMK2 – derivát kyseliny benzhydroxamové 2
OMK207 – derivát kyseliny benzhydroxamové 207
PBS – fosfátový pufovaný roztok
pCO₂ – parciální tlak oxidu uhličitého
PCR – polymerázová řetězová reakce
pH – potenciální vodíkový index
pO₂ – parciální tlak kyslíku
RPMI médium – roswell park memorial institute médium
SONOP – sonifikovaný roztok
TRIS-HCl – Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WR – multirezistentní kmen
xL3 – odpláštěné larvy

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Vajíčka <i>Haemonchus contortus</i>	3
Obrázek 2: Morfologie samice, její pohlavní ústrojí	3
Obrázek 3: Morfologie samce, bursa	4
Obrázek 4: Životní cyklus <i>H. contortus</i>	5
Obrázek: 5 Struktura thiabendazolu	11
Obrázek 6: Struktura levamisolu	12
Obrázek 7: Struktura ivermektinu.....	13
Obrázek 8: Struktura klosantelu	14
Obrázek 9: Struktura monepantelu	15
Obrázek 10: Struktura derquantelu	16
Obrázek 11: Přeměna d-luciferinu na oxyluciferin.....	28
Obrázek 12: Třídění dospělců.....	41
Obrázek 13: Fotoaparát pro natáčení motility	47
Obrázek 14: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček u ISE kmene	51
Obrázek 15: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček u ISE kmene	51
Obrázek 16: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček u WR kmene	52
Obrázek 17: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček u WR kmene	53
Obrázek 18: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene.....	54
Obrázek 19: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene.....	55
Obrázek 20: Vliv OMK1 na motilitu xL3 ISE kmene.....	55
Obrázek 21: Vliv OMK2 na motilitu xL3 ISE kmene.....	56
Obrázek 22: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene	57
Obrázek 23: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 ISE kmene.....	57
Obrázek 24: Vliv OMK1 na motilitu u xL3 ISE kmene.....	58
Obrázek 25: Vliv OMK2 na motilitu u xL3 ISE kmene.....	58
Obrázek 26: Vliv OMK1 na hladinu ATP u xL3 WR kmene	59
Obrázek 27: Vliv OMK2 na hladinu ATP u xL3 WR kmene	60
Obrázek 28: Vliv OMK1 na motilitu xL3 u WR kmene	61
Obrázek 29: Vliv OMK2 na motilitu xL3 u WR kmene	62
Obrázek 30: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samic ISE kmene	63
Obrázek 31: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samců ISE kmene	64
Obrázek 32: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samic ISE kmene	65

Obrázek 33: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samců ISE kmene	65
Obrázek 34: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samic IRE kmene.....	66
Obrázek 35: Vliv OMK1 na hladinu ATP u samců IRE kmene.....	67
Obrázek 36: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samic IRE kmene.....	67
Obrázek 37: Vliv OMK2 na hladinu ATP u samců IRE kmene.....	68
Obrázek 38: Vliv OMK1 na motilitu samic ISE kmene	69
Obrázek 39: Vliv OMK2 na motilitu samic ISE kmene	70
Obrázek 40: Vliv OMK1 na motilitu samců ISE kmene	71
Obrázek 41: Vliv OMK2 na motilitu samců ISE kmene	72
Obrázek 42: Vliv OMK1 a OMK2 na viabilitu jaterních řezů	73

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Kalibrační řada ATP pro xL3 a dospěléce	43
Tabulka 2: Kalibrační řada pro bílkovinu u xL3	44
Tabulka 3: Kalibrační řada pro bílkovinu u dospělců.....	46
Tabulka 4: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček pro ISE kmen.....	50
Tabulka 5: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček pro ISE kmen.....	50
Tabulka 6: Vliv OMK1 na líhnutí vajíček pro WR kmen	52
Tabulka 7: Vliv OMK2 na líhnutí vajíček pro WR kmen	52

11 Použitá literatura

- Adduci, I., Sajovitz, F., Hinney, B., Lichtmannsperger, K., Joachim, A., Wittek, T., & Yan, S. (2022). Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals*, *12*(18), 2339. <https://doi.org/10.3390/ani12182339>
- Akhtar, M. S., Iqbal, Z., Khan, M. N., & Lateef, M. (2000). Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo–Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Research*, *38*(2), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00163-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00163-2)
- Arsenopoulos, K. V., Fthenakis, G. C., Katsarou, E. I., & Papadopoulos, E. (2021). Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*, *11*(2), 363. <https://doi.org/10.3390/ani11020363>
- Baltrušis, P., Halvarsson, P., & Höglund, J. (2018). Exploring benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* by next generation sequencing and droplet digital PCR. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *8*(3), 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.09.003>
- Beech, R. N., Prichard, R. K., & Scott, M. E. (1994). Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, *138*(1), 103–110. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.1.103>
- Bellini, Yiu, Nozdrin, & Papalois. (2019). The Effect of Preservation Temperature on Liver, Kidney, and Pancreas Tissue ATP in Animal and Preclinical Human Models. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(9), 1421. <https://doi.org/10.3390/jcm8091421>
- Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In *Advances in Parasitology* (Vol. 93, pp. 181–238). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>
- Bizimenyera, E. S., Githiori, J. B., Eloff, J. N., & Swan, G. E. (2006). In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, *142*(3–4), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.013>
- Blackhall, W. (1998). Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *95*(2), 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00087-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00087-5)

- Blackhall, W. J., Pouliot, J.-F., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (1998a). Haemonchus contortus: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin- and Moxidectin-Selected Strains. *Experimental Parasitology*, *90*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4316>
- Blackhall, W. J., Pouliot, J.-F., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (1998b). Haemonchus contortus: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin- and Moxidectin-Selected Strains. *Experimental Parasitology*, *90*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4316>
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, *8*(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
- Boulin, T., Fauvin, A., Charvet, C., Cortet, J., Cabaret, J., Bessereau, J.-L., & Neveu, C. (2011). Functional reconstitution of Haemonchus contortus acetylcholine receptors in Xenopus oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology*, *164*(5), 1421–1432. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01420.x>
- Ceballos, L., Canton, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L., & Martinez-Valladares, M. (2019). The egg hatch test: A useful tool for albendazole resistance diagnosis in Fasciola hepatica. *Veterinary Parasitology*, *271*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.001>
- Comans-Pérez, R. J., Sánchez, J. E., Al-Ani, L. K. T., González-Cortázar, M., Castañeda-Ramírez, G. S., Mendoza-de Gives, P., Sánchez-García, A. D., Millán-Orozco, J., & Aguilar-Marcelino, L. (2021). Biological control of sheep nematode Haemonchus contortus using edible mushrooms. *Biological Control*, *152*, 104420. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104420>
- Demeler, J. (2005). *The physiological site of action and the site of resistance to the macrocyclic lactone anthelmintics in sheep parasitic trichostrongyloid nematodes*. Tierärztliche Hochschule.
- Demeler, J., Kleinschmidt, N., Küttler, U., Koopmann, R., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitology International*, *61*(4), 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.06.003>
- Díaz, L., Zambrano-González, E., Flores, M. E., Contreras, M., Crispín, J. C., Alemán, G., Bravo, C., Armenta-Espinosa, A., Valdés, V. J., Tovar, A., Gamba, G., Barrios-Payán, J., & Bobadilla, N. A. (2021). Ethical

Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Revista de Investigaci³on Cl³inica*, 73(4). <https://doi.org/10.24875/RIC.20000380>

- Dobšíková R, Šířoká Z, & Blahov J. (2012). FARMAKOLOGIE V PRODUKCI POTRAVIN. In *FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE stav veřejnho veterinrnho lkařství a toxikologie*. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO . <https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Farmakologie-v-produkci-potravin>
- Ehsan, M., Hu, R.-S., Liang, Q.-L., Hou, J.-L., Song, X., Yan, R., Zhu, X.-Q., & Li, X. (2020). Advances in the Development of Anti-Haemonchus contortus Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines*, 8(3), 555. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030555>
- Emery, D. L., Hunt, P. W., & Le Jambre, L. F. (2016). Haemonchus contortus: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46(12), 755–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>
- Fiel, C., Guzmán, M., Steffan, P., Rodríguez, E., Prieto, O., & Bhushan, C. (2011). The Efficacy of Trichlorphon and Naphthalophos against Multiple Anthelmintic-Resistant Nematodes of Naturally Infected Sheep in Argentina. *Parasitology Research*, 109(S1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2410-8>
- Flay, K. J., Hill, F. I., & Muguiro, D. H. (2022). A Review: Haemonchus contortus Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. *Animals*, 12(10), 1238. <https://doi.org/10.3390/ani12101238>
- Geary, T. G. (2016). *Haemonchus contortus: Applications in Drug Discovery* (pp. 429–463). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.013>
- Gill, J. H., Redwin, J. M., Van Wyk, J. A., & Lacey, E. (1995). Avermectin inhibition of larval development in Haemonchus contortus — Effects of ivermectin resistance. *International Journal for Parasitology*, 25(4), 463–470. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00087-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00087-5)
- Gomez-Lechon, M. J., Lahoz, A., Gombau, L., Castell, J. V., & Donato, M. T. (2010). In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 16(17), 1963–1977. <https://doi.org/10.2174/138161210791208910>
- Harder, A. (2016). *The Biochemistry of Haemonchus contortus and Other Parasitic Nematodes* (pp. 69–94). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.010>
- Hounzangbe-Adote, M. S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., & Hoste, H. (2005). In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the

parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, 78(2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.05.009>

- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20(10), 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kołodziej, P., Wujec, M., Doligalska, M., Makuch-Kocka, A., Khylyuk, D., Bogucki, J., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmarz, M., Studzińska, M., Tomczuk, K., Kocki, M., Reszka-Kocka, P., Granica, S., Typek, R., Dawidowicz, A. L., Kocki, J., & Bogucka-Kocka, A. (2023). Synthesis and anthelmintic activity of novel thiosemicarbazide and 1,2,4-triazole derivatives: In vitro, in vivo, and in silico study. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.07.004>
- Kotze, A. C., Gilleard, J. S., Doyle, S. R., & Prichard, R. K. (2020). Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005>
- Kotze, A. C., & Prichard, R. K. (2016). *Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus* (Vol. 93, pp. 397–428). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>
- Lanusse, C. E., Alvarez, L. I., & Lifschitz, A. L. (2016). *Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using Haemonchus contortus as a Model Nematode* (pp. 465–518). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.014>
- Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., & Prichard, R. K. (2012). P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 2, 58–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.10.001>
- Lifschitz, A., Entrocasso, C., Alvarez, L., Lloberas, M., Ballent, M., Manazza, G., Virkel, G., Borda, B., & Lanusse, C. (2010). Interference with P-glycoprotein improves ivermectin activity against adult resistant nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172(3–4), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.039>
- Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Wirtherle, N. C., Nicholas, D. R., Cox, G. G., & Conder, G. A. (2011). Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Veterinary Parasitology*, 181(2–4), 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.008>
- Ljungström, S., Melville, L., Skuce, P. J., & Höglund, J. (2018). Comparison of Four Diagnostic Methods for Detection and Relative Quantification of

- Haemonchus contortus Eggs in Feces Samples. *Frontiers in Veterinary Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00239>
- Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154(1), 11–34. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X)
- McCavera, S., Rogers, A. T., Yates, D. M., Woods, D. J., & Wolstenholme, A. J. (2009). An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology*, 75(6), 1347–1355. <https://doi.org/10.1124/mol.108.053363>
- McElroy, W. D., & Green, A. (1956). Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 64(2), 257–271. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(56\)90268-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(56)90268-5)
- Naeem, M., Iqbal, Z., & Roohi, N. (2021). Ovine haemonchosis: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 19. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02439-8>
- Nisbet, A. J., Meeusen, E. N., González, J. F., & Piedrafita, D. M. (2016). *Immunity to Haemonchus contortus and Vaccine Development* (pp. 353–396). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.011>
- Nixon, S. A., Welz, C., Woods, D. J., Costa-Junior, L., Zamanian, M., & Martin, R. J. (2020). Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.07.001>
- Nnadi, P. A., Kamalu, T. N., & Onah, D. N. (2009). The effect of dietary protein on the productivity of West African Dwarf (WAD) goats infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 161(3–4), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.014>
- Partridge, F. A., Forman, R., Bataille, C. J. R., Wynne, G. M., Nick, M., Russell, A. J., Else, K. J., & Sattelle, D. B. (2020). Anthelmintic drug discovery: target identification, screening methods and the role of open science. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16, 1203–1224. <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.105>
- Pavičić, A., Zajíčková, M., Šadibolová, M., Svobodová, G., Matoušková, P., Szotáková, B., Langhansová, L., Maršík, P., & Skálová, L. (2023). Anthelmintic activity of European fern extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research*, 54(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01192-8>
- Preston, J. M., & Allonby, E. W. (1979). The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection in Kenya. *Research*

- in Veterinary Science*, 26(2), 134–139. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32905-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32905-9)
- Prichard, R. K., & Geary, T. G. (2008). Fresh hope to can the worms. *Nature*, 452(7184), 157–158. <https://doi.org/10.1038/452157a>
- Rohrer, S. P., Birzin, E. T., Eary, C. H., Schaeffer, J. M., & Shoop, W. L. (1994). Ivermectin binding sites in sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *The Journal of Parasitology*, 80(3), 493–497.
- Sangster, N. C., Redwin, J. M., & Bjorn, H. (1998). Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in an isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 28(3), 503–510. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00194-X)
- Sangster, N. C., Riley, F. L., & Wiley, L. J. (1998). Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 28(5), 707–717. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00033-2)
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L., & Price, N. C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29(2), 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00538.x>
- Sarai, R. S., Kopp, S. R., Coleman, G. T., & Kotze, A. C. (2013). Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.01.002>
- Shanley, H. T., Taki, A. C., Nguyen, N., Wang, T., Byrne, J. J., Ang, C.-S., Leeming, M. G., Nie, S., Williamson, N., Zheng, Y., Young, N. D., Korhonen, P. K., Hofmann, A., Chang, B. C. H., Wells, T. N. C., Häberli, C., Keiser, J., Jabbar, A., Sleebs, B. E., & Gasser, R. B. (2024). Structure-activity relationship and target investigation of 2-aryl quinolines with nematocidal activity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 24, 100522. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2024.100522>
- Stuchlíková, L. R., Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., Sztóáková, B., Sečkařová, A., Dimunová, D., Nguyen, L. T., Várady, M., & Skálová, L. (2018). Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>

- Syed, A. J., & Anderson, J. C. (2021). Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews*, *50*(9), 5668–5705. <https://doi.org/10.1039/D0CS01492C>
- Tandon, R., & Kaplan, R. M. (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Veterinary Parasitology*, *121*(1–2), 125–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.016>
- Taylor, M. A. (1990). A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science*, *49*(2), 198–202. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31077-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31077-4)
- Taylor, M. A., Learmount, J., Lunn, E., Morgan, C., & Craig, B. H. (2009). Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. *Small Ruminant Research*, *86*(1–3), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.020>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Protein assay technical handbook*. Retrieved February 28, 2024, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/protein-assay-technical-handbook.pdf>
- Valderas-García, E., Castilla-Gómez de Agüero, V., González del Palacio, L., Galli, G., Escala, N., Ruiz-Somacarrera, M., González-Warleta, M., del Olmo, E., Balaña-Fouce, R., & Martínez-Valladares, M. (2024). New benzimidazole derivative compounds with in vitro fasciolicidal properties. *Parasites & Vectors*, *17*(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06224-6>
- Van Wyk, J. A., Gerber, H. M., & Groeneveld, H. T. (1980). *A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large scale application*.
- Várady, M., Čudeková, P., & Čorba, J. (2007). In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. *Veterinary Parasitology*, *149*(1–2), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.011>
- Veglia, F. (1916). *The Anatomy and Life-History of the Haemonchus Contortas (Rud)*. . <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/10471/p0347-0403.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wagland, B. M., Jones, W. O., Hribar, L., Bendixsen, T., & Emery, D. L. (1992). A new simplified assay for larval migration inhibition. *International Journal for Parasitology*, *22*(8), 1183–1185. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90040-R](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90040-R)

- Wendt, G. R., Collins, J. N., Pei, J., Pearson, M. S., Bennett, H. M., Loukas, A., Berriman, M., Grishin, N. V., & Collins, J. J. (2018). Flatworm-specific transcriptional regulators promote the specification of tegumental progenitors in *Schistosoma mansoni*. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33221>
- Widiarso, B. P., Kurniasih, K., Prastowo, J., & Nurcahyo, W. (2018). Morphology and morphometry of *Haemonchus contortus* exposed to *Gigantochloa apus* crude aqueous extract. *Veterinary World*, 11(7), 921–925. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.921-925>
- Williamson, S. M., Storey, B., Howell, S., Harper, K. M., Kaplan, R. M., & Wolstenholme, A. J. (2011). Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 180(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.09.003>
- Woods, D. J., Lauret, C., & Geary, T. (2007). Anthelmintic discovery and development in the animal health industry. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(sup1), S25–S33. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.S1.S25>
- Zajíčková, M., Nguyen, L. T., Skálová, L., Raisová Stuchlíková, L., & Matoušková, P. (2020). Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Drug Discovery Today*, 25(2), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.12.007>
- Zajíčková, M., Prchal, L., Navrátilová, M., Vodvářková, N., Matoušková, P., Vokřál, I., Nguyen, L. T., & Skálová, L. (2021). Sertraline as a new potential anthelmintic against *Haemonchus contortus*: toxicity, efficacy, and biotransformation. *Veterinary Research*, 52(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-01012-x>