



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Studium nematocidní aktivity
vybraných fytohormonů na
*Caenorhabditis elegans***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Zuzana Špulerová
Studijní program:	1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Alena Kadlecová
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, PhD.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Zuzana Špulerová
Název práce:	Studium nematocidní aktivity vybraných fytohormonů na <i>Caenorhabditis elegans</i>
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Alena Kadlecová
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Podle odhadů Světové zdravotnické organizace je více než třetina lidí na Zemi nakažena parazitickými hlísticemi. Infekcí jsou zasaženi zejména obyvatelé chudých států Jižní Ameriky, Východní Asie a Afriky. Tyto organismy způsobují také velké škody v zemědělství. Stávající antihelmintika nejsou univerzálně účinná a k některým si navíc hlístice rychle vytvářejí rezistenci. Proto je potřeba hledat nové aktivní látky pro kontrolu těchto parazitů. Pro tyto účely se ve výzkumu standardně využívá modelová hlístice <i>Caenorhabditis elegans</i> (hád'átko obecné). Cílem této práce bylo zoptimalizovat jednoduchou metodu pro stanovení akutní toxicity látek pro <i>C. elegans</i>. Pomocí této metody byla následně otestována série rostlinných hormonů a jejich derivátů.
Klíčová slova:	<i>Caenorhabditis elegans</i> , hlístice, antihelmintika, parazité, fytohormony
Počet stran:	64
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Zuzana Špulerová
Title of thesis:	A study of nematicidal effect of phytohormones on <i>Caenorhabditis elegans</i>
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Alena Kadlecová
The year of presentation:	2016
Abstract:	According to the World Health Organisation, more than a quarter of people on Earth are infected by parasitic helminths. Infections are prevalent mostly in poor countries of Africa, East Asia and South America. Nematodes also cause significant losses in agriculture. Existing antihelminthics are not universally effective and the worms are quickly developing resistance to them. That is why it is necessary to look for new active compounds. For these purposes researches frequently use the model nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> . In this thesis we optimised a rapid method for evaluating compounds' acute toxicity to <i>C. elegans</i> and then used this method to test the activity of several hundred phytohormones and their derivatives.
Keywords:	<i>Caenorhabditis elegans</i> , nematodes, anthelmintics, parasites, phytohormones
Number of pages:	64
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem, které jsem vytvořila sama. Všechny zdroje, které jsem použila při zpracování této práce, jsou řádně citovány a uvedeny v odkazech.

V Olomouci dne

Zuzana Špulerová

Chtěla bych poděkovat pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za přátelské prostředí během vykonávání praktické části práce. Děkuji své vedoucí práce Mgr. Aleně Kadlecové, která mi byla vždy ochotně nápomocná společně s Mgr. Jiřím Vollerem, Ph.D.

Obsah

1	Cíle práce	9
2	Úvod	10
3	Současný stav řešené problematiky	11
3.1	Parazitismus	11
3.2	Helmintologie	13
3.2.1	Kmen: Hlísti (Nemathelminthes)	14
3.3	Vybraní zástupci parazitických hlístic	15
3.3.1	Škrkavka dětská (<i>Ascaris lumbricoides</i>)	15
3.3.2	Roup dětský (<i>Enterobius vermicularis</i>)	17
3.3.3	Tenkohlavec lidský (<i>Trichuris trichiura</i>)	18
3.3.4	Měchovec lidský (<i>Ancylostoma duodenale</i>)	19
3.3.5	Vlasovec mizní (<i>Wuchereria bancrofti</i>)	20
3.3.6	Vlasovec kožní (<i>Onchocerca volvulus</i>)	21
3.4	Epidemiologická situace ve světě	22
3.5	Antihelmintika a nematocidy	23
3.5.1	Vybrané skupiny antihelmintik podle chemické struktury	24
3.5.2	Benzimidazoly – mebendazol, albendazol	24
3.5.3	Imidazothiazoly – levamisol, pyrantel	27
3.5.4	Makrocyclické laktony – ivermectin, abamectin	29
3.5.5	Další používaná antihelmintika	31
3.6	Rezistence	33
3.6.1	Mechanismy rezistence u nejčastěji používaných antihelmintik . . .	33
3.6.2	Důsledky rezistence	34
3.7	Rostlinná výroba	35
3.8	<i>Caenorhabditis elegans</i> jako modelový organismus	36
3.9	Screening látek na <i>Caenorhabditis elegans</i>	38

4	Materiál	40
4.1	Materiál	40
4.2	Média	40
4.3	Testované látky	43
5	Metody	45
5.1	Příprava bakteriální suspenze <i>Escherichia coli</i>	45
5.2	Sklizení háďátek z misek	46
5.3	Příprava testovaných látek	46
5.4	Nasazení háďátek na desku	46
5.5	Otrava háďátek testovanými látkami	47
5.6	Ověření aktivity látek na <i>Caenorhabditis elegans</i>	48
6	Výsledky	49
6.0.1	Optimalizace metodiky a výběr pozitivních kontrol	49
6.0.2	Akutní toxicita vybraných rostlinných hormonů pro <i>Caenorhabditis elegans</i>	55
7	Diskuze	56
8	Závěr	59

Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
LRR	Laboratoř růstových regulátorů
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše o problematice parazitujících hlístic, využití *Caenorhabditis elegans* jako modelového organismu při hledání nových nematocidních látek a objasnění problematiky rezistence.

V praktické části byla v rámci optimalizačních experimentů zavedena jednoduchá a rychlá metoda pro screening akutní toxicity látek. Z několika antihelmintik, běžně využívaných k léčbě člověka, byly vybrány dvě, které sloužily jako pozitivní kontrola. Metoda byla navržena tak, aby bylo možné použít běžné laboratorní vybavení a aby spotřeba testovaných látek byla minimální. Následně byla otestována nematocidní aktivita 17 přírodních cytokininů a několika set vybraných derivátů.

2 Úvod

Parazitující hlístice mají velké dopady nejen na lidské zdraví, ale způsobují také mimořádné škody v zemědělství - při chovu hospodářských zvířat i na pěstovaných plodinách. I když je k dispozici množství účinných preparátů s antihelmintickou aktivitou, dochází postupem času k vzniku rezistence hlístic k používaným látkám.

Caenorhabditis elegans (dále v textu *C. elegans*) je běžně se vyskytující půdní hlístice. Díky své malé velikosti, schopnosti rychlé reprodukce a nenáročné kultivaci v laboratorních podmínkách představuje i přes neparazitický způsob života vhodný a často využívaný modelový objekt při testování antihelmintického potenciálu nových látek.

Laboratoř růstových regulátorů v Olomouci, ve které jsem vykonávala experimentální část práce, disponuje velkou knihovnou rostlinných hormonů. Aktuálně je v knihovně přes 5000 látek odvozených od fytohormonů, především cytokininů a stále se syntetizují další. Pořád, že tyto látky plní nejen svou primární regulační funkci u rostlin, ale vykazují zajímavé biochemické účinky také v živočišných systémech, rozhodli jsme se zavést jednoduchou a zároveň rychlou metodu screeningu jejich nematocidní aktivity. To umožní rychlé vytypování perspektivních kandidátů na v budoucnu využitelná antihelmintika, respektive zajištění vstupních dat pro posouzení vztahu mezi chemickou strukturou testovaných látek a jejich nematocidní aktivitou.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Parazitismus

Parazitismus je životní strategie, kterou využívají organismy na všech úrovních systému, ať už se jedná o bakterie, bezobratlé nebo obratlovce. Organismy využívající tento nejčastější způsob života jsou zároveň původci nejrozšířenějších a nejdůležitějších infekčních chorob na Zemi. [1] Největší prevalence chorob způsobených parazity je v subtropických a tropických oblastech. Další typy vztahů mezi organismy jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Neexistuje však jediná definice pojmu „parazit“, protože vztahů mezi hostitelem a parazitem je mnoho. Nejrozšířenější je v současnosti definice, že parazit je „organismus získávající živiny z jednoho či několika málo hostitelů, kterým obvykle škodí, ale nemusí je zabít.“ [1] Pro parazita tento vztah musí být výhodný. K jeho životnímu cyklu je zapotřebí existence hostitele, proto hovoříme o parazitismu jako o odvozené životní strategii.

Podle prostorového umístění rozlišujeme ektoparazity, kteří se nacházejí vně těla hostitele a endoparazity, nacházející se uvnitř. Vnitřní parazité se mohou nacházet v orgánech, v krvi nebo mohou být lokalizováni v kůži a podkoží. Ektoparazité patřící mezi helminty se u člověka nevyskytují.

Podle počtu hostitelů, které parazitující organismus během svého života využívá pro svůj úspěšný životní cyklus, je dělíme na jedno-hostitelové neboli monoxenní a více-hostitelové neboli heteroxenní.

Pokud je pro parazita vztah s hostitelem nezbytný pro přežití, jedná se o obligátního parazita. V opačném případě, kdy parazit hostitele využívá jen za určitých životních podmínek a jeho přežití na něm není závislé, mluvíme o fakultativním parazitovi.

Definitivní hostitel je organismus, ve kterém probíhá sexuální část cyklu parazita. V mezihostiteli se parazit nerozmnožuje, nebo dochází pouze k asexuálnímu množení.

Z ekologického hlediska má existence parazitů své výhody i nevýhody. Mezi pozitiva patří schopnost regulace volně žijících druhů a zabránění jejich přemnožení a spotřebování zásob živin v daném ekosystému. Tím, že ovlivňují mortalitu, udržují rovnováhu. Jelikož je množství parazitujících hlístic v podílu biomasy veliký, spolupracují na koloběhu a rozkladu látek. Nákaza parazitem má pro hostitele řadu negativních důsledků. Mezi ně patří zhoršení

zdravotního stavu, v extrémním případě vedoucí až ke smrti, a nebo jiné změny ve fenotypu, které vedou ke zvýšení pravděpodobnosti přenosu. Změnou ve fenotypu mohou být např. novotvary u rostlin tzv. hálky, případně změna chování zvířete, která podporuje přenos parazita. Infikovaná zvířata se např. nemohou rozmnožovat, napadené rostliny mají menší výnosnost apod.

Vědní obor parazitologie se klasicky rozděluje na tři hlavní části : protozoologie, lékařská entomologie a helmintologie. Právě helmintologie je část, která bude v této práci podrobněji rozebrána. [2, 1]

Tab. 1: Typy vztahů mezi organismy

Typ vztahu	Definice
Amensalismus	Vztah, kdy organismus má negativní vliv na druhý organismus aniž by jím byl ovlivňován.
Komensalismus	Vztah, kdy organismus má kladný vliv na druhý organismus aniž by jím byl ovlivňován.
Kompetice	Konkurence dvou organismů o stejný zdroj živin.
Mutualismus	Jedná se o druh symbiózy, kdy je vztah dvou organismů prospěšný pro obě dvě strany.
Neutralismus	Organismy na sebe nijak nepůsobí a neovlivňují se.
Parazitismus	Vztah, kdy jeden z organismů má užitek z druhého.
Predace	Pozření části nebo celého organismu jiným organismem.

3.2 Helmintologie

Helmintologie (někdy také nematodologie) je věda zkoumající hlístice. Mezi hlístice patří i *C. elegans*, na které se již dříve hledaly látky s nematocidní aktivitou. Protože je *C. elegans* blízce příbuzná parazitujícím hlísticím, s určitou pravděpodobností při nálezu aktivní látky proti *C. elegans* bude tato látka účinná i proti parazitujícím druhům.

Do skupiny helmintů patří celá řada variabilních organismů. Přes jejich různorodost je společným znakem bilatelární souměrnost těla. V rámci ontogeneze nemají pouze vývojové stádium vajíčko, larva a dospělec, ale nacházíme zde i mnoho typů larev jednoho organismu. Helminti jsou protostomní (prvoústí) živočichové což značí, že jejich prvoústa vývojem nezánikla, ale slouží jako ústní otvor. Jejich těla jsou dokonale přizpůsobena k interakci s hostitelem, popřípadě meziphostitelem. Parazitující organismus musí být schopen například proniknout do těla hostitele, což se může uskutečnit přes kůži nebo požitím hostitelem. Penetrace se řídí dle receptorů na těle helminta a specifických látek na těle hostitele. Po proniknutí na parazita začne reagovat imunitní systém hostitele. Na tuto situaci se parazité adaptovali. Jeden z používaných mechanismů je zabudování molekul produkovaných hostitelem do těla parazita, takže není imunitním systémem rozeznán jako cizorodá látka. Jiný způsob maskování může být obměna povrchových antigenů.

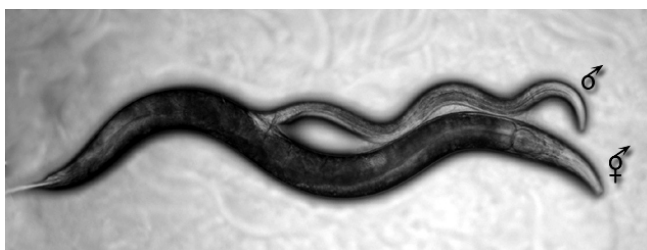
Infekce zmíněnou skupinou organismů jsou na Zemi velmi časté a proto se tímto problémem věda aktivně zabývá. Jen škrkavkami je nakaženo kolem miliardy lidí a tenkohlavec *Trichuris trichiura* parazituje na další miliardě obyvatel. Vybraná onemocnění budou podrobněji rozebrána v dalších kapitolách. [2, 3]

3.2.1 Kmen: Hlísti (Nemathelminthes)

Hlísti jsou gonochoristé s protáhlým, dvouvrstvým tělem. Velikost se pohybuje od několika milimetrů až po několik decimetrů. Tělo je nečláňované, tvaru nitkovitého nebo vřetenovitého. Většinu druhů najdeme ve vlhké půdě a vodním prostředí. Spousta však alespoň část vývojového cyklu tráví uvnitř těla hostitele, a proto se jejich tělo během evoluce adaptovalo hned několika způsoby. Je to například vylučování kutikuly pokožkou, která chrání jejich tělo před trávicími enzymy hostitele. Během života se kutikulární vrstva několikrát svléká. Pod kutikulou je uložena pokožka a v podkožním svalovém vaku je uložena podélná svalovina. Celá tato soustava dodává hlísticím pevnost a zároveň pružnost.[3, 4]

Hlísti nedisponují cévní a dýchací soustavou. Oběhová soustava je u nich kompenzována pseudocoelem. Jedná se o tělní dutinu vyplněnou tekutinou. Je označována jako nepravá tělní dutina. Trávicí soustava je trubicovitá s vyvinutým řitním a ústním otvorem, který je často opatřen kutikulárními zuby nebo jinou podobnou strukturou. V pseudocoelu není pevně uložena. Vylučování je zprostředkované pomocí protonefridií. Nervová soustava je složena z obhltnového prstence, ze kterého vybíhají vzájemně propojené a spárované podélné provazce. [3, 4]

Vyskytuje se zde pohlavní dimorfismus, kdy samice (nebo hermafrodit, jako je to u *C. elegans*) je obvykle větší než samec. Samci mají nepárová varlata a chámovod. Samičí pohlavní orgány jsou tvořeny trubicovitými vaječníky, vejcovody, dělohou, vagínou a vulvou. U hlístic se objevuje eutelie. Jedná se o jev, kdy mají organismy konstantní počet buněk u stejných vývojových stádií. Počet buněk se během ontogeneze mění, ale jakmile organismus dospěje, buňky se přestanou dělit a pouze zvětšují svojí velikost.[3, 4]



Obr. 1: Pohlavní dimorfismus u hlístice *C. elegans*

Obrázek upraven a převzat z: <http://www.wormatlas.org>

3.3 Vybraní zástupci parazitických hlístic

V této kapitole budou blíže rozebrána některá onemocnění způsobená parazitickými hlísticemi. Mezi hlístice patří asi 20 000 dosud známých druhů. [4] Patří mezi ně druhy volně žijící, parazitující na rostlinách a obratlovcích včetně člověka.[3, 4] Člověka infikuje okolo 60 druhů hlístic. ¹ Dále v textu se zaměřuji na 6 nejrozšířenějších a s největším dopadem na lidské zdraví. ²

3.3.1 Škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*)

Škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) (obr.č.2) patří do čeledi *Ascaridae* (škrkavkovití) a do podčeledi *ascaridinae*. [2, 1] Má na svědomí onemocnění zvané askarióza, které je celosvětově rozšířené a hlísticí nejčastěji způsobované onemocnění. Nejčastěji se projevuje průjmami, střevními potížemi, plicní embolií nebo dalšími příznaky, které jsou popsány níže.[1]

Škrkavka má 10 až 30 cm dlouhé, válcovité tělo, které je na obou koncích mírně zašpičatělé. Patří mezi geohelmintry, to znamená, že jejich životní cyklus probíhá bez meziphostitele, jinými slovy jejich vývoj je přímý. Jako hostitele využívá savce. Kolem ústního otvoru jsou tři po okrajích zoubkaté pysky, zvané labie. Nacházejí se zde i smyslové papily. Ústní otvor pokračuje svalnatým jícnem, který přechází v trubicovité střevo končící análním otvorem. Tak jako celý kmen hlístice, i škrkavky mají pseudocoelom naplněný tekutinou.

Nákaza probíhá perorálně, pozřením infekčních vajíček například z potravin. Škrkavky mají tkáňovou fázi vývoje. Larvy v tenkém střevě hostitele dorůstají larvální fáze L3, ty se pak uvolní a penetrují přes stěnu střeva do krevního řečiště. Tzv. střevní fáze se projevuje poruchami trávení, které je způsobené mechanickým kontaktem střevní sliznice s larvami a jimi vyloučených toxických metabolitů.

Mezi lehčí projevy patří průjem, střevní potíže, nechutenství. V těžších případech může dojít k protržení střevní stěny. Krevním oběhem se larvy dostávají do jater. Tato fáze se projevuje záněty a poškozením orgánu. Z jater putují larvy oběhovým systémem do plic. V této fázi se nákaza projevuje kašlem, záněty nebo plicní embolií. Z plic se pomocí kašle larvy škrkavek dostávají do úst, kde jsou pozřeny a v tenkém střevě dokončují svůj vývoj

¹<http://emedicine.medscape.com/article/224011-overview>

²<http://www.who.int/en/>

přes larvální stádium L4 až k dospělci. Dospělci žijí 18-20 měsíců a mají vysokou spotřebu glykogenu na úkor hostitele.[1]

Produkce vajíček je enormní. Uvádí se až 200 tisíc za jeden den.[1]. Vajíčka mají silný obal a za optimálních podmínek dokáží ve vnějším prostředí zůstat infekční 5 až 12 let. Pokud ale nejsou ve vlhkém prostředí, vyschnou a přežijí jenom několik dní. Ideální podmínky pro embryogenezi jsou v rozmezí 28 – 32 °C, optimální je vlhké a okysličené prostředí. Za takových podmínek embryogeneze trvá 18 dní. Pokud podmínky nejsou ideální, trvá déle.[1]

Počet úmrtí se ročně pohybuje okolo 60 000 lidí. V ohrožení na životě jsou zejména děti. Problém je řešen osvětou v hygieně, tepelným upravením potravin, zamezením kontaktu s půdou, zavedením vhodné likvidace výkalů a podobně.³



Obr. 2: *Ascaris lumbricoides*, dospělá samice

Obrázek převzat z: <http://www.cdc.gov/>

³<http://www.who.int/en/>

3.3.2 Roup dětský (*Enterobius vermicularis*)

Roup dětský (*Enterobius vermicularis*) je 3-12 mm dlouhá hlístice s kosmopolitním rozšířením. Způsobuje onemocnění zvané oxyurióza, neboli též enterobióza. Jedná se o nejčastější parazitární infekci v České republice způsobenou helminty. [5]

Zástupce tohoto druhu je zachycen na obrázku č. 3. Hlístice řádu *Oxyurida* bývají úzce hostitelsky specifické. Cílovou skupinou je člověk, zejména mladší děti, u kterých dochází ke snazšímu šíření zvláště při zařazení do kolektivu. Nejčastěji roup parazituje v tlustém střevě a přenáší se pomocí vajíček, které samice klade v perianálním prostoru. Protože jsou vajíčka lehká, jsou snadno roznášena pomocí vzduchu. Díky špatným hygienickým návykům u dětí dochází často k reinfekcím.[2]

Onemocnění nemusí mít patrné příznaky, protože roup dětský nemá vysokou patogenitu. Nejtypičtějším znakem je anální pruritus, zejména v noci, kdy samice kladou vajíčka. Případné patologické změny se projevují v trávicím traktu a v oblasti kolem konečníku. V nejtěžších případech dochází k úbytku hmotnosti, průjmům nebo bolesti břicha.[6]



Obr. 3: Roup dětský (*Enterobius vermicularis*)

Obrázek převzat z: <http://sydney.edu.au/>

3.3.3 Tenkohlavec lidský (*Trichuris trichiura*)

Tenkohlavec lidský je hlístice s tenkým tělem, které může dosahovat délky až 80 mm. Způsobuje jedno z nejčastějších střevních onemocnění způsobené parazity, trichuriózu, která má nejčetnější zastoupení zejména v tropech a subtropích. [1] Avšak ani v České republice není jeho výskyt vzácností. ⁴ Uvádí se, že celosvětový počet napadených osob tímto parazitem se pohybuje okolo 800-900 miliónů.[7] ⁵

Tento parazit je zachycen na obrázku č. 4. Samice, které jsou poněkud větší než samci, jsou schopné naklást denně až 14 000 vajíček. Vývoj tenkohlavce je přímý a vajíčka dokážou v půdě přežít za vhodných podmínek i několik let. Nákaza probíhá konzumací zeleniny nebo vody kontaminované vajíčky. Po pozření vajíček se v tenkém střevě líhnou larvy, které později putují do tlustého střeva, kde se zavrtávají do střevní sliznice. To vede k jeho poškození a k zánětům. Mezi další klinické projevy patří zvracení, bolest, nechutenství nebo chronické průjemy.[1]

K léčbě trichuriózy se používá mebendazol nebo albendazol. [8, 7]



Obr. 4: Tenkohlavec lidský (*Trichuris trichiura*), samice

Obrázek převzat z: <http://sydney.edu.au/>

⁴<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2002/04/11.pdf>

⁵<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr60/en/index1.html>

3.3.4 Měchovec lidský (*Ancylostoma duodenale*)

Měchovec lidský je střevní parazit způsobující onemocnění zvané ankylostomóza. Původce této nemoci je vyobrazen na obrázku č. 5. Tento parazit je rozšířen zejména v tropických a subtropických oblastech.[1]

Samci dosahují délky 8-11 mm a samice 10-13 mm. Tito parazité žijí i více než 2 roky. Samice je schopna za jeden den naklást 25-30 tisíc vajíček. Za příznivých vlhkých podmínek embryogeneze trvá 1-2 dny, poté se vyvíjejí z vajíček larvy. Nákaza, zprostředkovaná larvami, hrozí při přímém kontaktu s lidskou pokožkou. Larvy po kontaktu s kůží do ní pronikají a dostávají se do krve. Z ní migrují přes srdce do plic a následně do trávicího ústrojí, kde dokončují svůj vývoj.

Objevují se kožní příznaky, při průniku larev do plic vznikají krvácivé ranky. V tenkém střevě larvy způsobují také lokální poranění při přichycení se na stěnu sliznice, navíc zde sajou krev, která jim pravděpodobně slouží jako zdroj kyslíku. Onemocnění má typické příznaky anémie, mezi které patří například hypoalbuminémie.

Ankylostomóza se léčí pomocí mebendazolu, tiabendazolu nebo pyrantelu. Účinnost ivermectinu nebyla prokázána.

Prevence spočívá, tak jako i u ostatních zmíněných parazitů, v dodržování základů hygieny, zamezení hnojení fekáliemi a zabezpečení nekontaminované pitné vody. [1]



Obr. 5: Měchovec lidský (*Ancylostoma duodenale*)

Obrázek převzat z: <http://sydney.edu.au/>

3.3.5 Vlasovec mizní (*Wuchereria bancrofti*)

Wuchererióza, Bancroftova filarióza, lymfatická filariáza, elefantiáza. To jsou názvy pro jedno a totéž onemocnění, způsobené vlasovcem mizním. Jedná se o tropickou nemoc, která je přenášena komáry.[1]

Přenašeči této nemoci je okolo 70 druhů komárů. Nejčastěji se jedná o komáry rodu *Anopheles*, *Aedes* nebo *Culex*. Nákaza člověka probíhá při sání komára, během kterého larvy aktivně putují sosákem do kůže hostitele. Komár se nakazí opět tím, že bude parazitovat na nakaženém člověku.[1] ⁶

V počáteční fázi onemocnění se objevují záněty nebo zpomalení oběhu lymfatického systému. Když se larvy přemění na dospělé, dochází kolem nich k hromadění buněčných struktur a následně se poškozuje endotel cév. To má za následek poruchy v cirkulaci lymfy a její následnou kumulaci v uzlinách, která se projevuje typickými edémy a zvětšením postižené části těla.[1] Světová zdravotnická organizace (WHO) k lednu roku 2016 odhaduje 25 miliónů případů genitálního postižení a více než 15 miliónů lidí trpících lymfoedémem. WHO tuto závažnou situaci řeší preventivní léčbou za použití albendazolu v kombinaci s ivermectinem nebo diethylkarbamazinem citrátem. Cílem je zredukovat u nakažených osob počet larev v těle a zabránit tak jejich šíření na komáry. ⁷



Obr. 6: Vlasovec mizní (*Wuchereria bancrofti*)

Obrázek převzat z: <http://sydney.edu.au/>

⁶<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>

⁷viz 4

3.3.6 Vlasovec kožní (*Onchocerca volvulus*)

Vlasovec kožní je hlístice parazitující primárně na člověku a způsobuje onemocnění zvané onchocerkóza, neboli „říční slepota“.[1]

Nákaza je vázána na přenašeče, kterou je v tomto případě muchnička rodu *Simulium*. Nakažená muchnička přenáší kousnutím infekční embrya, která se v lidském těle vyvíjejí v larvy (mikrofilárie), které dále migrují nejčastěji do pokožky, očí a mizních uzlin. Mezi symptomy patří silné svědění kůže, boule a po čase se může projevit i slepota. Klinické projevy jsou způsobené larvami, které se pohybují v podkoží a způsobují zde záněty. [1] ⁸

Zatím nejsou léky, které by preventivně bránily nákaze tímto parazitem. U lidí se osvědčil k léčbě onchocerkózy ivermectin. [1] ⁹

Délka života dospělých vlasovců se pohybuje v rozmezí 15-20 let, proto i léčba tohoto onemocnění musí trvat přibližně stejnou dobu.[1] ¹⁰



Obr. 7: Vlasovec kožní (*Onchocerca volvulus*)

Obrázek převzat z: <http://sydney.edu.au/>

⁸<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs374/en/>

⁹Viz 6

¹⁰<http://www.parazitologie.cz/akce/doc/sbornik/sbornik.pdf>

3.4 Epidemiologická situace ve světě

WHO uvádí k roku 2015 údaj o přibližně 2 miliardách hlísticemi infikovaných osob na světě, což představuje zhruba 24% světové populace. Nejvíce se to týká oblastí s nižším hygienickým standardem, kde se půda kontaminuje lidskými výkaly a hlístice se tak mohou rychle šířit prostřednictvím vajíček. Proto mezi ohrožené lokality patří státy například Afriky, Číny nebo východní Asie, kde chybí dostatečná infrastruktura a kanalizace, nejčastěji z finančních důvodů. Díky absenci těchto infekcí v evropských zemích, si laická veřejnost mnohdy neuvědomuje rozsah nákazy v globálním měřítku. Asi nejzávažnější následky má nákaza parazitickými hlísticemi u dětí. Podle WHO v oblastech s vysokým výskytem a rizikem přenosu hlístic, žije přes 270 milionů dětí předškolního věku a více než 600 milionů dětí školního věku. Tato čísla by měla přiblížit realitu a závažnost těchto nákaz.

Celosvětová situace se začala razantně řešit od roku 2001, což zahrnuje pravidelné podávání léků nebo sociální podporu a vzdělání ohledně hygieny. Tato informační osvěta je soustředěna hlavně do škol, protože se zde vyskytují cílové skupiny. V roce 2013 bylo anti-helmintiky ošetřeno 368 milionů dětí. WHO doporučuje léčbu albendazolem a mebendazolem. Jejím globálním cílem do roku 2020 je radikální snížení výskytu helmintóz u dětí. Nejčastějšími parazity je *Ascaris lumbricoides*, česky škrkavka dětská, *Trichuris trichiura* (tenkohlavec lidský) a *Necator americanus* (měchovec americký).¹¹

¹¹<http://www.who.int/en/>

3.5 Antihelmintika a nematocidy

Helminti způsobují řadu nemocí, proto se věda snaží podrobněji pochopit tyto organismy z molekulárního a biochemického hlediska. Účelem bádání je vývoj antihelmintik, která budou účinná a zároveň pro člověka netoxická.

Mezi používané látky patří například niklosamid, diethylkarbamazin nebo ivermectin. I přes současný výzkum v poslední době nebyla uvedena na trh nová antihelmintika pro humánní léčbu. Naposledy se jednalo o albendazol, praziquantel a ivermectin. Tato léčiva byla však uvedena na trh před několika desetiletími. Když se k tomuto faktu přičte i vzrůstající rezistence červů na farmakologické přípravky, vyplývá důležitost dalšího výzkumu. [7]

Antihelmintika můžeme rozdělit do různých skupin na základě několika charakteristik. Některá působí pouze na jednu skupinu helmintů, jiná současně na více skupin. Taková označujeme jako širokospektrá antihelmintika. Také záleží, jestli je přípravek určen proti helmintům ve střevech anebo ve tkáni. Podle účinku můžeme léčiva rozdělit na vermicide, která parazita usmrtí a vermifuga, která způsobí paralýzu. Farmaka se rozdělují i podle chemické struktury a složení. Nejčastěji využívaná jsou v současné době léčiva patřící do těchto tří skupin – benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony. Léčiva způsobují u parazitů kontrakci svalů, paralýzu, narušují metabolické procesy nebo nervovou signalizaci helmintů, jiné zabraňují např. oxidativní fosforylaci v mitochondriích. [1]

Antihelmintika se nepoužívají jenom pro léčbu již infikovaných osob, ale také jako prevence proti lidským helmintozám. Ročně je za pomoci WHO distribuováno mnoho léků, jejichž úlohou je snížit počet nakažených osob. Nutností je přihlížet k tomu, za jakých okolností a životních podmínek je lék podáván. Prevence, postupy a úspěšnost léčby u schistosom nebo odstranění lymfatické filariózy bude jiná ve státech západní Evropy, než v chudých státech, kde kvůli nedostatku financí není zajištěna dodávka pitné vody a vytvořena vodní vodohospodářská infrastruktura. Úplné vymýcení onemocnění je velice obtížné a nákladné časově i finančně. Problematika prevence nález pomocí chemoterapeutik je přehledně shrnuta v článku od Lorenza Savioliho z roku 2014 – Preventive Anthelmintic Chemotherapy – Expanding the Armamentarium.[9]

3.5.1 Vybrané skupiny antihelmintik podle chemické struktury

Jak již bylo řečeno, antihelmintika se mohou dělit mimo jiné podle své chemické struktury. Mezi 3 skupiny nejčastěji používaných antihelmintik patří benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony. V jednotlivých podkapitolách jsou blíže rozebráni zástupci nejčastěji užívaní v léčbě. V experimentální části jsme pozitivní kontrolu vybírali právě z těchto antihelmintik.

3.5.2 Benzimidazoly – mebendazol, albendazol

Benzimidazoly jsou organické sloučeniny, které mají ve své struktuře benzenový kruh, který je připojený na imidazolovém kruhu. Tento kruh obsahuje 4 atomy uhlíku, atom dusíku a 2 dvojně vazby.¹²

Tyto látky působí ve střevech hlístice, proto je důležité, aby se antihelmintikum dostalo do trávicího traktu parazita. Tělo hlístice má charakteristický počet buněk pro určité vývojové stádium. Proto nejsou tkáně schopny při poškození regenerace. Střevo hlístic je tvořeno z jediné vrstvy buněk a antihelmintika účinkují tak, že tento orgán nenávratně poškozuje.[10]

Benzimidazoly u *C. elegans* způsobují vymizení mikrotubulů svým navázáním na protein zvaný β -tubulin, který je důležitou součástí cytoskeletu buňky.[11] Cytoskelet představuje mimo jiné oporný systém buňky, proto narušení jeho stavby a tvorby vede k defektům, které se projevují paralýzou nebo zpomaleným růstem. [12] Benzimidazoly mají mnohem vyšší afinitu k β -tubulinu u parazitů, než k β -tubulinu u jiných živočichů. Proto se tímto lékem mohou ošetřít zvířata, aniž by to na ně mělo negativní vliv. [13] Informace týkající se letálních účinků vyvolaných benzimidazolovými antihelmintiky ve střevě hád'átek shrnuje článek od Douglase P. Jasmera a kolektivu.[10]

Mezi zástupce patří mebendazol, syntetický benzimidazolový derivát. Toto antihelmintikum je schopné blokovat vychytávání glukózy, buňky tedy nemohou zpracovat volně dostupnou glukózu a začnou čerpat energii ze zásob uložených ve formě glykogenu. Pokles glykogenu a neschopnost využití glukózy způsobí sníženou tvorbu ATP. ATP je však nutné pro

¹²<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

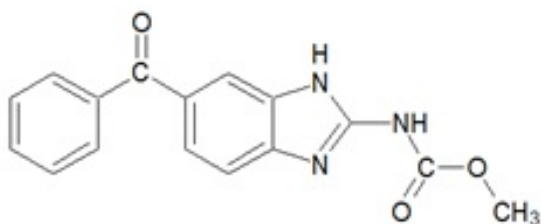
přežití organismu. K této poruše využívání glukózy dochází právě narušením buněk střeva skrz β -tubulin, který byl zmíněn výše.¹³

Mebendazol má příjemnou chuť a tak se jako lék podává ve formě žvýkacích tablet. Obsah mebendazolu v jedné tabletě je 100 mg. Mezi příznaky předávkování patří horečka, svědění, bolesti hlavy, vypadávání vlasů.¹⁴

Tab. 2: Chemické vlastnosti mebendazolu

Generické názvy	Vermox, Telmin, Pantelmin
Sumární vzorec	$C_{16}H_{13}N_3O_3$
Molární hmotnost	295,2927 g/mol
Rozpustnost	Téměř nerozpustný ve vodě, ethanolu, chloroformu nebo etheru. V kyselině mravenčí je rozpustný.
Vzhled látky	Amorfní prášek žlutavé až bílé barvy.
Teplota tání	288,5 °C

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



Obr. 8: Strukturní vzorec mebendazolu

¹³Viz 11

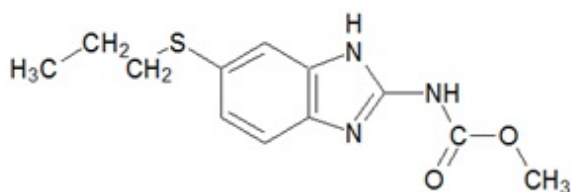
¹⁴Viz 11

Dalším zástupcem je syntetický benzimidazolový derivát, albendazol. Mechanismus účinku je podobný jako u mebendazolu. Chemická struktura je znázorněna na obrázku č. 9. Jako léčivo se podává ve formě tablet. Každá tableta obsahuje 200 mg albendazolu. Vedlejší účinky při předávkování jsou bolesti hlavy, vypadávání vlasů, nespavost, průjem nebo závratě.¹⁵

Tab. 3: Chemické vlastnosti albendazolu

Generické názvy	Eskazol, Zentel
Sumární vzorec	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$
Molární hmotnost	265,3314 g/mol
Rozpustnost	Prakticky nerozpustný ve vodě.
Vzhled látky	Bezbarvá krystalická látka.
Teplota tání	208-210 °C

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



Obr. 9: Strukturní vzorec albendazolu

¹⁵<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.5.3 Imidazothiazoly – levamisol, pyrantel

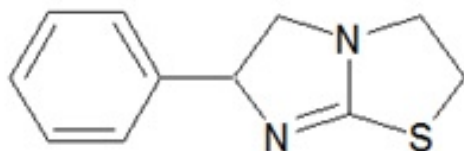
Imidazothiazoly jsou organické polycyklické sloučeniny. Imidazolový kruh je ve sloučenině připojený k thiazolovému kruhu. Zástupce této skupiny, levamisol, se jako lék vyskytuje v podobě tablet s obsahem účinné látky 50 mg v jedné tabletě.¹⁶ Jeho chemická struktura je na obrázku č. 10.

Levamisol je schopen depolarizovat membrány svalové tkáně a způsobuje hyperkontrakce svaloviny. Tato depolarizace je způsobena díky tomu, že je levamisol agonista acetylcholinového receptoru. [14, 15] Spíše než na koncentraci látky ale závisí na způsobu jejího přijetí. Pokožka hlístic je totiž málo propustná. Pokud je však látka přijata pseudocoelem hlístice, lze do 30 minut pozorovat výše popsané účinky. [15]

Tab. 4: Chemické vlastnosti levamisolu

Generické názvy	Ketrax, L-Tetramisol, Lepuron
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S
Molární hmotnost	204,29138 g/mol
Rozpustnost	Látka je rozpustná ve vodě, methanolu i ethanolu.
Vzhled látky	Pevná bílá látka.
Teplota tání	227-227,5 °C

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



Obr. 10: Strukturní vzorec levamisolu

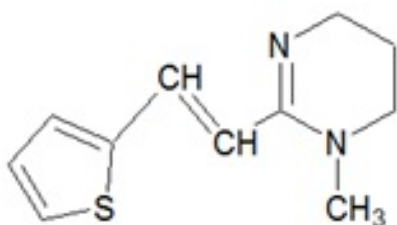
¹⁶<http://www.drugbank.ca/>

Dalším zástupcem je pyrantel. Strukturní vzorec je znázorněn na obrázku č. 11. Mezi vedlejší účinky patří nevolnost, zvracení nebo průjem. Pokud je léčba pyrantelem přerušena, vymizí i nežádoucí účinky.¹⁷

Tab. 5: Chemické vlastnosti pyrantelu

Generický název	Pyrequan
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ S
Molární hmotnost	206,30726 g/mol
Rozpustnost	Rozpustný v dimethylsulfoxidu, mírně rozpustný v dimethylformamidu a prakticky nerozpustný ve vodě.
Vzhled látky	Pevná krystalická látka žluté barvy bez zápachu.
Teplota tání	178 - 179 ° C

Zdroj: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



Obr. 11: Strukturní vzorec pyrantelu

¹⁷<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.5.4 Makrocyclické laktony – ivermectin, abamectin

Ivermectin patří mezi semisyntetické, vysoce aktivní látky s širokým spektrem využití. Látka byla poprvé izolována z produktů fermentace bakterie *Streptomyces avermitilis*. Chemicky se jedná o makrocyclický lakton. Tato látka je řazena do kategorie antibiotik. Chemická struktura je znázorněna na obrázku č. 12. [1]

Již v roce 1985 byl znát velký dopad a pomoc ivermectinu ve veterinární léčbě. Nejdříve se používal při léčbě parazitárních infekcí u psů, ovcí, skotu, koní a prasat. Jelikož byla tato látka úspěšná, veterinární společnosti uvedly na trh analogy ivermectinu, které se od sebe lišily svými vlastnostmi a došlo na uplatnění i v humánní léčbě. [16]

Používá se také k léčbě svrabu, protože působí nejen na hlístice, ale i na roztoče a některé druhy hmyzu. Dlouholeté výzkumy ukázaly, že je ivermectin při léčbě kožního svrabu u lidí efektivní v jediné perorální dávce. Testované množství dávky bylo 150 - 200 mg na kg tělesné váhy.[17]

Ivermectin se podává orálně ve formě tablet. Ty jsou označené pod názvem Stromectol. Ivermectin se metabolizuje v játrech a spolu s metabolity je vylučován převážně výkaly. Podávání ivermectinu po příjmu potravin s vysokým obsahem tuku podporuje biologickou dostupnost než při podání nalačno. ¹⁸

Mechanismus účinku je založený na schopnosti látky ovlivnit chloridové kanály kdy dochází k větší propustnosti buněčné membrány pro chloridové ionty.[18] Tím se poruší polarizace membrány nervových a svalových buněk což vede k paralýze až smrti parazita. Jejich selektivní aktivita spočívá v tom, že ne všichni živočichové mají stejně řízené chloridové kanály a že ivermectin neproniká přes hematoencefalickou bariéru.

Ivermectin však nepůsobí na všechny parazitické hlísty a u některých je toxický pouze pro určitá vývojová stadia. Například na dospělce *Onchocerca volvulus* žádný účinek nemá. Proto je nutné při použití Stromectolu opakované přeléčení.

V nízkých koncentracích se Stromectol vylučuje i do mateřského mléka. Mezi nežádoucí účinky při intoxikaci patří vyrážka, bolesti hlavy, edém, závratě, zvracení nebo průjem.¹⁹

Za objev avermectinů a ivermectinu byla v roce 2015 udělena polovina Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství vědcům Satoshiu Omuraovi a Williamovi Campbellovi.[19]

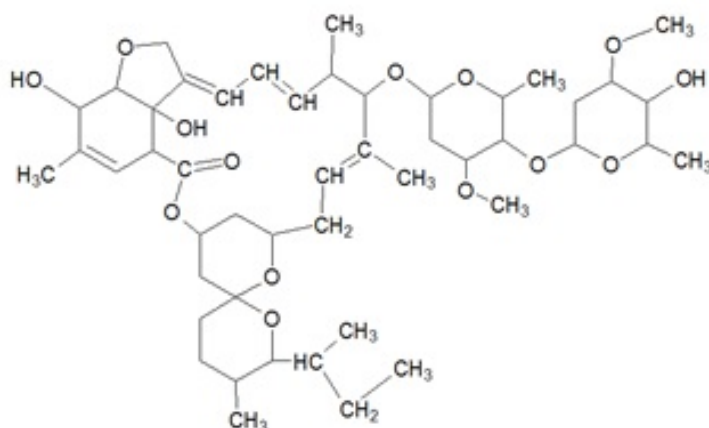
¹⁸<http://www.merck.com/>

¹⁹Viz 17

Tab. 6: Chemické vlastnosti ivermectinu

Generické názvy	MK-933, Heartguard 30, Eqvalan, Ivomec
Sumární vzorec	$C_{48}H_{74}O_{14}$
Molární hmotnost	875,09276 g/mol
Rozpustnost	Ner rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu nebo 95% ethanolu.
Vzhled látky	Krystalická látka bílé až žlutavě bílé barvy, nehygroscopická.
Teplota tání	155-157 °C

Zdroje: <https://crs.edqm.eu/>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



Obr. 12: Strukturní vzorec ivermectinu

Synonymem pro abamectin je název avermectin B1.²⁰ Chemická struktura je zobrazena na obrázku č. 13. Mechanický účinek abamectinu je stejný jako u ivermectinu. Abamectin se mimo jiné v České republice používá jako součást přípravku VERTIMEC 1,8 EC k ochraně rostlin.²¹

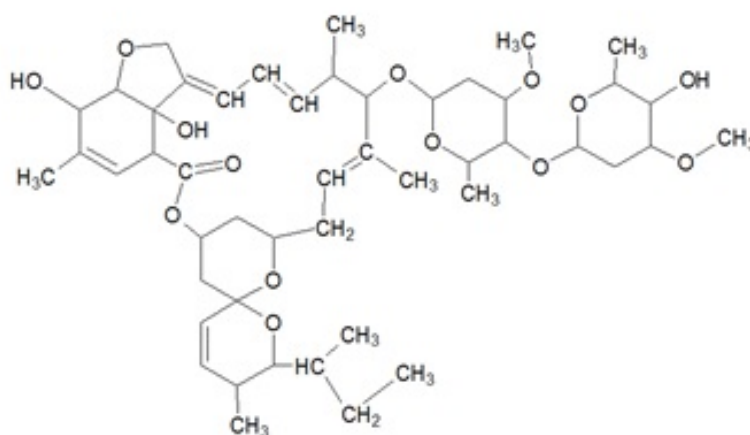
²⁰<http://www.inchem.org/>

²¹<http://www.syngenta.com/global/corporate/en/Pages/home.aspx>

Tab. 7: Chemické vlastnosti abamectinu

Generické názvy	Avermectin B1, MK-936
Sumární vzorec	$C_{48}H_{72}O_{14}$
Molární hmotnost	873,07688 g/mol
Rozpustnost	Prakticky nerozpustný ve vodě, rozpustný v methanolu, acetonu nebo isopropanolu.
Vzhled látky	Bílý až žlutý prášek.
Teplota tání	150-155°C

Zdroje: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://www.alfa.com/en/>



Obr. 13: Strukturní vzorec abamectinu

3.5.5 Další používaná antihelmintika

V současné době není mnoho používaných antihelmintik a většina z nich je na trhu již několik let. Příklady antihelmintik využívaných v humánní medicíně jsou uvedeny v tabulce č. 8. [20]

Tab. 8: Příklady dalších antihelmintik používaných pro léčbu člověka

Lék	Onemocnění
Trichlorfon	Schistosomóza
Antimonial	Schistosomóza
Oxamniquine	Schistosomóza
Niclosamid	Cestodóza
Closantel	Fasciolóza, střevní škrkavky
Diethylkarbamazin	Filarióza
Suramin	Filarióza

Tabulka upravena a převzata z [20].

Vzhledem k tomu, že existují případy, kdy se látka původně určená pro veterinární užití schválila i pro léčbu člověka, jsou v tabulce č. 9 zmíněny vybrané látky. Příkladem látky schválené pro veterinární užití, která v dohledné době možná začne být využívána i pro léčbu člověka, je emodepside. Ten je momentálně v první fázi klinických testů.²² Uvedeny jsou i antihelmintika působící proti dalším vnitřním parazitům, jako jsou například tasemnice (onemocnění cestodóza). Poněvadž chybí experimentální data k efektivnosti dané látky na hlístice, a víme, že jiné látky působí na tasemnice i hlístice zároveň, je třeba tyto látky vnímat jako potenciální kandidáty na nový lék. [21]

Tab. 9: Vybraná antihelmintika schválená pro veterinární užití

Název léku	Účinná látka	Nemoc
Panacur Singles	Fenbendazol	Trichurióza
Lopatul	Nitroscanat	Ankylostomóza
Cestex	Epsiprantel	Cestodóza
ProHeart6	Moxidectin	Ankylostomóza, dirofilarióza
Revolution	Selamectin	Cestodóza, dirofilarióza

Tabulka upravena a převzata z [21].

²²<https://clinicaltrials.gov>

3.6 Rezistence

K používaným antihelmintickým látkám se u hlístic časem vyvinula rezistence. O rezistenci mluvíme tehdy, když se v populaci vyskytuje větší množství jedinců, kteří jsou tolerantní k dávce dané sloučeniny, která ale v jiné populaci stejného druhu způsobuje fyziologické změny. [22]

3.6.1 Mechanismy rezistence u nejčastěji používaných antihelmintik

Mechanismy rezistence se často studují na *C. elegans*. Důvodem je snadné pěstování v laboratorních podmínkách. Nervová soustava *C. elegans* a klíčové složení cytoskeletu je podobné parazitickým hlísticím, tudíž mechanismus působení látek a mechanismus rezistence jsou s největší pravděpodobností podobné. [20]

V nervovém systému *C. elegans* se nacházejí acetylcholinové receptory, situované na postsynaptické membráně nervových buněk. Hlavním neurotransmiterem u *C. elegans* je acetylcholin, který se váže na tyto receptory a tím je aktivuje. Tento nervový přenos se uplatňuje například při pohybu hlístic, přijímání potravy nebo kladení vajec. [23]

Rezistence hlístů konkrétně k levamisolu je pravděpodobně způsobena změnami v cholinergních receptorech. Mezi agonisty, což jsou látky působící stejně jako acetylcholin, patří nikotin nebo levamisol. Mutanti *C. elegans*, kteří jsou rezistentní vůči levamisolu, mají pozměněné acetylcholinové receptory a neinteragují tedy s cholinergními agonisty. [14, 24, 25] Rezistence k levamisolu se projevuje nepřítomností hyperkontrakce svaloviny. Bylo zjištěno, že rezistentní alely ovlivňují neurotransmisi změnou nikotinových acetylcholinových receptorů. Mechanismus účinku je stejný u parazitických hlístic tak jako i u *C. elegans*. [15]

Levamisol je na seznamu základních léčiv WHO. Pokud by se toto léčivo používalo současně s benzimidazoly, představovalo by to výhodu v oddálení nástupu rezistence. Tato kombinace by také účinkovala na více skupin hlístic než v případě použití samotného levamisolu. [9]

Rezistence je zaznamenána i u jiných skupin používaných antihelmintik. Jak již bylo zmíněno, benzimidazoly mají schopnost negativně ovlivnit cytoskelet prostřednictvím interakce s β -tubulinem a tím jsou poté narušeny procesy, ve kterých je zapotřebí funkce integrálních mikrotubulů. [20] Rezistence *C. elegans* k benzimidazolům je způsobena mutací v genu *ben-1*, který kóduje β -tubulin. [12]

K rezistenci k ivermectinu může dojít hned několika způsoby. Mohou za ni například některé P-glykoproteiny, které v buňce zastávají funkci membránových transportérů, které jsou všeobecně zodpovědné za přenášení xenobiotik ven z buňky. [26] Další možností je výskyt rezistentních mutantů, majících mutace v genech, které ve většině případů kódují podjednotky glutamátém řízených chloridových kanálů. Mezi ně patří například geny *glc-1*, *avr-14* a *avr-15*. Mutace v jiných genech mohou například měnit permeabilitu membrán, a to může mít za následek podporu rezistence.

U levamisolu byl ve většině případů objeven stejný mechanismus rezistence jak u *C. elegans*, tak u parazitických hlístic. Mechanismus rezistence parazitických hlístic na ivermectin ještě není úplně znám, ale z prvotních dat vyplývá, že mechanismus u *C. elegans* je pravděpodobně odlišný. [20]

3.6.2 Důsledky rezistence

Na farmách je velkým problémem vzrůstající rezistence u parazitů hospodářských zvířat. Vzhledem k vysokým úhynům byla výše zmíněná antihelmintika po dobu několika let intenzivně využívána. To vedlo k rozšíření rezistence po celé Zemi. Vysoká míra odolnosti k antihelmintikům je hlášena v Evropě, Severní a Jižní Americe, Africe a Austrálii. [18]

Konkrétním případem, který názorně demonstruje problém se vznikem a rychlým šířením rezistence, je použití monepantelu na Novém Zélandě, kde se rezistence objevila již do dvou let od prvního použití. Na dotyčné farmě byl monepantel použit ke kontrole hlístic u ovcí a koz. Tento lék přestal být účinný proti dvěma druhům hlístice (*Teladorsagia circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis*) a to hned u dvou různých hostitelů. [27]

Rezistence se dá omezit střídáním léků nebo jejich různou kombinací. Je však třeba i vyvíjet nová léčiva, jejichž mechanismus účinku se liší od již existujících látek. Hledání potenciálních kandidátů na nové antihelmintikum je cílem této práce právě kvůli závažnosti situace, která ze stoupající rezistence vyplývá.

3.7 Rostlinná výroba

I když je tato práce věnována především parazitům a léčbě člověka (respektivě jiných savců), parazitické hlístice jsou obrovským problémem i v rostlinné výrobě. Rostliny jsou nejčastěji napadány háďátky. V České republice se vyskytuje například háďátko řepné (*Heterodera schachtii*), které je rozšířené po celé Evropě. Larvy háďátka žijí v půdě a napadají zde kořeny hostitelských rostlin, mezi které patří brukvovité a merlíkovité rostliny. To způsobuje snížení výnosu a z toho vyplývající zemědělské škody.²³

Howard J. Atkinson odhaduje ve svém článku z roku 2012 světové škody na 118 miliard dolarů ročně. Článek pojednává také o potenciálu transgenních rostlin při kontrole napadení háďátky a tedy i prevenci vzniku jimi způsobovaných škod v zemědělství. [28]

Problém s parazitickými hlísticemi mají zejména chudé státy. Ztráty zapříčiněné hlísticemi se odhadují průměrně na 12 %. Napadené rostliny vadnou nebo jim žloutnou listy, na kořenech vznikají hálky anebo léze. [29]



Obr. 14: Cukrová řepa napadená parazitem

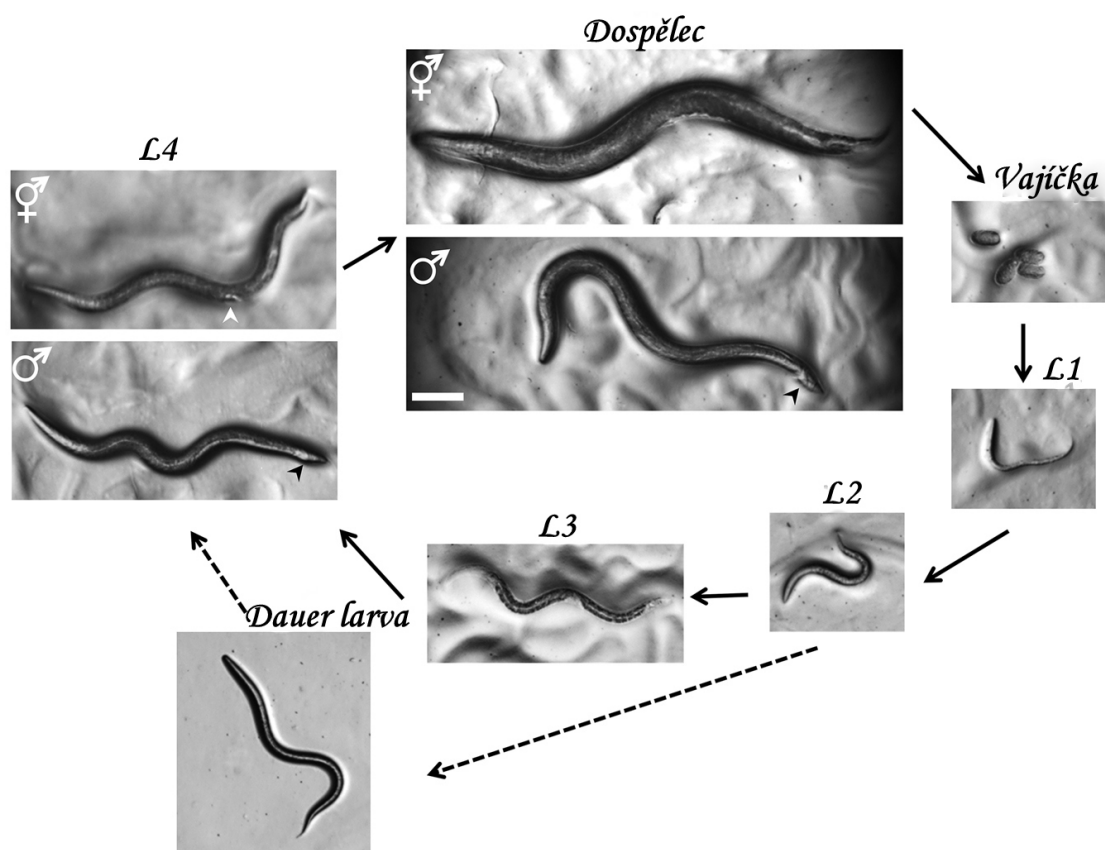
Obrázek převzat z: <http://www.liz-online.de/startseite.html>

²³<http://www.agroatlas.ru/>

3.8 *Caenorhabditis elegans* jako modelový organismus

Caenorhabditis elegans, česky háďátko obecné, je neparazitující půdní hlístice nacházející se běžně v kompostu a půdě, kde se živí bakteriemi. V populaci se necházejí hermafroditi a jedinci samčího pohlaví. Frekvence výskytu samců se pohybuje pod 0,2%. Tělo dospělého jedince měří přibližně 1 mm a je složeno z 959 tělních buněk, pokud se jedná o hermafrodita, a 1031 buněk pokud se jedná o samce. [30]

Hermafroditi produkují samčí i samičí pohlavní buňky a mohou se sami oplodnit. Vývojový cyklus za vhodných podmínek (20°C) trvá 3 dny a je znázorněný na obrázku č. 15. Cyklus zahrnuje 4 larvální stádia označovaná L1 až L4. Dospělec za laboratorních podmínek (20°C) žije průměrně 15-20 dnů a je schopný naklást za svůj život až 300 vajíček. V přírodě, kde nejsou optimální podmínky, se hlístice přirozeně dožívají méně. [31]



Obr. 15: Vývojový cyklus *Caenorhabditis elegans*

Obrázek převzat a upraven z: <http://www.wormbook.org/>

Provádění screeningu látek na parazitických hlísticích je obtížné, protože parazitické hlístice potřebují k dokončení svého cyklu hostitele a to komplikuje pěstování v kultuře za laboratorních podmínek. [15] U některých parazitů lze v laboratoři pěstovat určitá vývojová stádia, nicméně z tohoto důvodu plyne omezení při hledání aktivních sloučenin na ty, které imobilizují nebo zabíjejí červy v určité životní fázi. [32]

C. elegans je z fylogenetického hlediska blízká parazitickým hlísticím, a tak je možné, že látka působící na *C. elegans* bude mít stejný efekt i na parazitické hlístice. Ačkoliv *C. elegans* není sama parazitující hlísticí, může být použita pro screening nových léčiv a poskytnout informace o mechanismech rezistence k antihelminthikům. V některých případech se však ke screeningu mohou použít i parazitické hlístice. Příkladem může být *Toxocara canis* (škrkavka psi) [33], nebo *Ancylostoma ceylanicum* [34], patřící mezi měchovce.

C. elegans má mnoho užitečných vlastností. Na rozdíl od parazitujících hlístic, které bychom museli extrahovat z nakažených zvířat, se dá *C. elegans* pěstovat na Petriho miskách v laboratorních podmínkách. Jelikož je její životní cyklus krátký, získáme velké experimentální populace.

Mezi výhody *C. elegans* jako modelového organismu patří také znalost celého genomu a jeho snadné klonování. Dále je *C. elegans* opticky transparentní, proto mohou být za pomoci mikroskopu pozorovány různé struktury, které se mohou případně i barvit. [15] Předností tohoto modelového organismu je i samotná údržba v laboratoři. Hlístice se dají zamrazit pro budoucí použití, a to v kapalném dusíku při -196 °C po neomezeně dlouhou dobu. Pro vědecké pracovníky je k dispozici více než 3 000 mutantních kmenů, které se dají objednat ze speciálních center. Tato skutečnost dělá *C. elegans* ještě atraktivnějším modelem. *C. elegans* v některých případech nevádí ani kontaminace, kterou lze navíc ve většině situacích snadno odstranit. [35]

Příkladem, ukazujícím vhodnost tohoto modelového organismu, může být například podobnost iontových kanálů u *Haemonchus contortus* a *C. elegans*. *H. contortus*, česky vlasovka slezová, je parazit přežvýkavců, který reaguje na všechna hlavní antihelminthika. [36]

Při zkoumání rezistence je v některých případech použití *C. elegans* vhodné, v jiných nereflektuje přesně mechanismus působení u parazitických hlístic. Je to dané například tím, že na hlístice pěstované v laboratorních podmínkách není vyvinut skoro žádný selektivní tlak. Některé mutace vedoucí k rezistenci mají i další efekty, které mohou být pro hlístici škodlivé.

Mezi ně patří například neschopnost normálního pohybu. Takový jedinec by pravděpodobně mimo laboratoř nepřežil, zatímco v umělých podmínkách může prosperovat. [15]

Závěrem lze říci, že pro hledání nových látek s nematocidní aktivitou pomocí molekulárně genetických metod, je *C. elegans* velmi vhodným modelovým organismem. [20]

3.9 Screening látek na *Caenorhabditis elegans*

Při screeningu látek se vyhodnocuje toxicita testovaných substancí. Toxicita se projevuje schopností hlístice za určitou časovou jednotku v dané látce přežít či nikoli. Kromě smrti, která je důležitým parametrem, se dá hodnotit i rychlost a koordinovanost pohybu, poruchy vývoje nebo množství vyprodukovaného potomstva. Vyhodnocování může probíhat manuálně, kdy se počítají živé hlístice, případně se vyhodnocuje jejich pohyb. Za fyziologických podmínek je pohyb vlnivý, dopředu nebo dozadu a reaguje na vnější podněty. V tekutém médiu se sleduje počet ohybů hlístice za určitý čas. Při pěstování na agaru se sleduje dráha, kterou hlístice urazí za jednotku času.[31]

Množství potomků se dá vyhodnotit manuálním počítáním pod mikroskopem, nebo lépe pomocí chitinázového testu. Tento test je založený na skutečnosti, že obal vajíček obsahuje chitin. Při líhnutí embrya produkují chitinázu, což je enzym, který je schopný vaječný obal rozložit. Při tomto procesu se část enzymu dostává i do kultivačního média. Pro stanovení enzymatické aktivity se používají fluorogenní substráty. Pokud je testovaná látka toxická a negativně ovlivňuje produkci vajíček, bude pozorována nižší aktivita chitinázy.[37]

Kromě manuálního vyhodnocování je možná také automatická mikroskopie a následná analýza obrazu. V roce 2007 představili autoři G.D. Tsibidis a N. Tavernarakis software jehož algoritmus pojmenovali Nemo. Tento program je schopný kvantitativně zpracovat velké množství dat s vysokou přesností. Slouží k analýze a vyhodnocení nejen smrti, paralýzy ale i dalších výše zmíněných faktorů, jako je například pohyb nebo vývoj. Toto je pouze ilustrační příklad jednoho z několika existujících algoritmů. [38]

Smrt hlístic se dá detekovat také použitím zeleného fluorescenčního barviva SYTOX Green. Toto barvivo je schopné interkalace do DNA. Při smrti hlístice se membrány buněk stanou propustnější a barvivo pronikne dovnitř čímž se hlístice selektivně nabarví. Intenzitu tohoto zbarvení lze detekovat pomocí fluorescenčních detekčních metod. Smrt hlístic lze vyhodnocovat manuálně ve fluorescenčním mikroskopu, v případě pouhé paralýzy by ale tato

metoda nebyla účinná. Viabilitu populací nabarvených pomocí SYTOX green je možné vyhodnocovat také na fluorimetru. [39] Pro tuto metodu je však potřeba, aby byly populace *C. elegans* ve všech jamkách konstatní. Je tedy vhodné experimenty připravovat za pomoci sorteru, který je uzpůsoben ke třídění velkých objektů. Oproti manuálnímu počítání je tato metoda výrazně rychlejší, objektivnější a méně pracná, nicméně vyžaduje nákladné vybavení.

V některých situacích je možné také využít reportérové linie. Takovéto linie umožňují zkoumat expresi studovaného genu, nejčastěji tak, že je produkt daného genu, případně některého jeho podřízeného genu, značen zeleným fluorescenčním proteinem. Tyto linie se využívají například při hledání látky, která by indukovala nebo inaktivovala určitý gen, který je důležitý pro toxicitu nebo rezistenci. Stanovení lze opět provést pomocí fluorescenčního mikroskopu, fluorimetru nebo případně použít průtokový cytometr COPAS Biosort. Nevýhodou použití reportérových linií jsou zvýšené finanční náklady.[40]

K vyhodnocování toxicity nebo paralýzy hlístic na pevném médiu by se mohla použít analýza fotografií pořízených na skeneru pomocí metody, jakou je například wormscan. Tato metoda spočívá v pořízení několika za sebou jdoucích snímků misek s nasazenými hlísticemi. Jednotlivé skeny se poté proloží a software pomocí nastavených algoritmů vyhodnotí mobilitu. Výhodou jsou nízké náklady a snadná instalace. [41] Na stejném principu jako wormscan funguje také lifespan machine, skenování je ale automatizováno, tedy bez nutnosti zásahu obsluhy. [42] Při automatickém skenování agarových misek s *C. elegans* [43] se ale i přes výborný algoritmus nevyhneme chybám. Tyto algoritmy jsou náchylné k výkyvům kvality obrazu např. při nerovnoměrném osvětlení misek při skenování.[32] Proto je v praxi vždy potřeba parametry upravit a zoptimalizovat pro dané podmínky a možnosti laboratoře. Mezi další nevýhody těchto metod patří větší spotřeba látek nebo nemožnost manipulace s miskami, se kterými se nesmí během skenování hýbat.[42]

4 Materiál

Všechna média byla připravena v souladu se zdrojem [44] nebo podle internetového zdroje²⁴. Pokud není uvedeno jinak, byla skladována při pokojové teplotě.

4.1 Materiál

1. *Caenorhabditis elegans* linie BA17 fem-1(hc17) Tato linie je citlivá na teplotu. Teplota 25°C způsobuje sterilitu hlístic a zabraňuje tak jejich množení. Proto jsou vhodné na experimenty, při kterých se vyhodnocuje přežití jedinců. [45]
2. Linie bakterií *Escherichia coli* OP50 Tato linie je díky mutaci uracil autotrofní, zabraňuje tedy množení v médiu chudém na uracil. Tím se předejde přemnožení bakterií, které by mohlo ovlivnit experiment nebo samotné hlístice.

C. elegans i *E. coli* byly zakoupeny z Caenorhabditis Genetics Center (CGC).²⁵

4.2 Média

LB médium:

- trypton
- kvasnicový extrakt
- NaCl
- deionizovaná voda

pH média 7,5.

²⁴<http://www.wormbook.org/>

²⁵<http://cbs.umn.edu/>

S-základní médium:

- NaCl
- KH_2PO_4 (1M, pH 6)
- deionizovaná voda

S-kompletní médium:

- předem připravené S-základní médium
- citrát draselný
- roztok stopových prvků
- CaCl_2
- MgSO_4

Skladování ve tmě.

Citrát draselný:

- citrát tridraselný
- kyselina citronová monohydrát
- deionizovaná voda

pH upraveno na 6,0 pomocí KOH.

Roztok stopových prvků:

- Na_2EDTA
- $\text{FeSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnCl}_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$
- CuSO_4
- deionizovaná voda

Skladování ve tmě.

NGM médium:

- NaCl
- pepton
- agar
- deionizovaná voda
- CaCl_2
- cholesterol
- MgSO_4
- K_3PO_4 pufr

M9 pufr:

- Na_2HPO_4
- KH_2PO_4
- NaCl
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- deionizovaná voda

Agar, Na_2EDTA a citrát tridraselný zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, kvasnicový extrakt od Merck, cholesterol byl pořízen od Calbiochem. Pepton a trypton koupeny od společnosti Fluka. Všechny ostatní chemikálie byly zakoupeny na www.lach-ner.com.

4.3 Testované látky

Byly testovány tyto přírodní cytokininy:

Kinetin, kinetin ribosid, isopentenyl adenin, isopentenyl adenin ribosid, *ortho*-topolin, *ortho*-topolin ribosid, *meta*-topolin, *meta*-topolin ribosid, *para*-topolin, *para*-topolin ribosid, benzylaminopurin, benzylaminopurin ribosid, *trans*-zeatin, *trans*-zeatin ribosid, *cis*-zeatin, *cis*-zeatin ribosid, 2-hydroxy-3-methoxy benzylaminopurin ribosid.

Dále byly testovány látky, které mají v databázi LRR následující čísla:

1, 164, 221, 281, 284, 408, 464, 600, 647, 751, 770, 771, 778, 785, 797, 859, 882, 889, 893, 938, 993, 1000, 1006, 1016, 1018, 1024, 1080, 1099, 1136, 1145, 1147, 1149, 1170, 1174, 1202, 1211, 1282, 1283, 1293, 1348, 1349, 1406, 1421, 1431, 1433, 1439, 1441, 1454, 1458, 1477, 1478, 1524, 1529, 1537, 1542, 1543, 1561, 1569, 1571, 1576, 1592, 1627, 1645, 1653, 1656, 1657, 1671, 1674, 1692, 1697, 1700, 1729, 1733, 1734, 1744, 1748, 1824, 1826, 1854, 1862, 1866, 1871, 1888, 1892, 1902, 1903, 1914, 1946, 1947, 1948, 1954, 1955, 1961, 1961, 1980, 1990, 1991, 1993, 1995, 1999, 2004, 2006, 2007, 2009, 2010, 2027, 2030, 2041, 2044, 2058, 2095, 2100, 2119, 2141, 2143, 2177, 2178, 2179, 2184, 2196, 2201, 2226, 2230,

2232, 2255, 2257, 2267, 2268, 2291, 2320, 2324, 2344, 2353, 2358, 2359, 2360, 2381, 2393, 2395, 2404, 2405, 2414, 2419, 2420, 2422, 2440, 2441, 2477, 2478, 2479, 2485, 2487, 2488, 2490, 2491, 2493, 2517, 2519, 2525, 2529, 2532, 2544, 2551, 2555, 2556, 2562, 2564, 2581, 2586, 2587, 2591, 2595, 2596, 2606, 2618, 2619, 2621, 2624, 2631, 2634, 2636, 2637, 2645, 2653, 2666, 2671, 2673, 2706, 2707, 2708, 2733, 2734, 2736, 2768, 2770, 2777, 2824, 2833, 2840, 2854, 2860, 2864, 2866, 2869, 2871, 2881, 2893, 2910, 2912, 2915, 2927, 2944, 2946, 2970, 2971, 2978, 2979, 2989, 3003, 3048, 3058, 3059, 3060, 3062, 3066, 3068, 3085, 3091, 3107, 3114, 3121, 3150, 3162, 3184, 3196, 3223, 3228, 3235, 3259, 3262, 3266, 3270, 3274, 3277, 3289, 3298, 3302, 3349, 3364, 3366, 3369, 3383, 3386, 3388, 3396, 3411, 3424, 3428, 3429, 3434, 3443, 3467, 3475, 3480, 3487, 3493, 3517, 3525, 3538, 3543, 3546, 3556, 3557, 3560, 3561, 3586, 3595, 3596, 3598, 3604, 3607, 3625, 3631, 3699, 3702, 3714, 3715, 3717, 3721, 3726, 3738, 3741, 3744, 3762, 3764, 3777, 3779, 3781, 3801, 3802, 3807, 3809, 3814, 3820, 3823, 3840, 3842, 3843, 3911, 3916, 3931, 3934, 3942, 3943, 3946, 3953, 3969, 3970, 3972, 3983, 3990, 3992, 3997, 4004, 4013, 4015, 4024, 4039, 4042, 4104, 4123, 4125, 4134, 4154, 4164, 4172, 4179, 4181, 4184, 4189, 4197, 4214, 4228, 4229, 4233, 4248, 4249, 4258, 4267, 4272, 4371, 4379, 4386, 4403, 4443, 4469, 4603, 4604, 4606, 4607, 4616, 4624, 4629, 4630, 4633, 4643, 4655, 4676, 4678, 4684, 4696, 4729, 4759, 4773, 4817, 4839, 4889, 4905, 4925, 4939, 4958, 5006, 5053, 5077, 5082, 5137, 5187, 5201, 5210, 5249, 5259, 5303

Testované látky byly z knihovny LRR vybrány tak, aby reprezentovaly strukturní variabilitu v knihovně obsaženou. Pro každou z více než 5000 látek byl vypočten její strukturní fingerprint (varianta klíčů MACCS). Fingerprinty potom byly použity k výpočtu matice podobnosti, jako metrika sloužilo Tanimotovo skóre. Tato matice pak byla použita pro shlukovou analýzu. Z každého z klastrů byl vybrán jeden zástupce.

Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). U některých testovaných látek se dlouhodobé skladování v lednici ukázalo jako problém. V zásobních roztocích vznikly krystaly. Tyto roztoky byly zvortexovány a sonifikovány. Pokud se krystaly nerozpustily, čas sonifikace se dvojnásobně prodloužil. Pokud tento postup nebyl úspěšný, látky se zahřívaly na 50 °C, případně 70 °C. V případě přetrvávání krystalů i po 5 minutách v termoboxu se zásobní roztok dané látky připravil znovu.

5 Metody

5.1 Příprava bakteriální suspenze *Escherichia coli*

1. Bylo připraveno sterilní LB médium do 0,5 l zásobní lahve.
2. Na Petriho misce s LB médiem byl proveden křížový roztěr bakterií *Escherichia coli* OP50.
3. Po kultivaci při 37 °C přes noc byla z misky odebrána jedna kolonie, kterou bylo následně naočkováno již připravené sterilní LB médium.
4. Suspenze byla přes noc umístěna na třepací inkubátor v 37 °C.
5. Takto připravená bakteriální suspenze v LB médiu byla rozpipetována do předem zvažných centrifugačních zkumavek s objemem 50 ml.
6. Zkumavky byly stočeny v centrifuze při 3000 G, 20 °C po dobu 15 minut.
7. Supernatant byl odstraněn a pelet byl dvakrát omyt pomocí sterilní demineralizované vody.
8. Otevřené zkumavky byly ponechány v laminárním boxu, aby zbylá tekutina vyschla.
9. Zkumavky byly zvaženy a jednotlivé pelety byly rozsuspendovány v S-kompletním médiu tak, aby výsledná koncentrace bakterií byla 60 mg/ml.
10. Suspenze byla skladována v lednici ne déle než 14 dnů.

5.2 Sklizení hád'átek z misek

1. Světelným mikroskopem byla zkontrolována životaschopnost hád'átek na předem připravených agarových miskách.
2. Ve sterilním boxu byly na jednotlivé misky napipetovány 3 ml SC média a pomocí pipetoru sklizeny do čisté zkumavky.
3. K objemu 9,5 ml této suspenze bylo přidáno 0,5 ml bakterií *E. coli* OP50 v SC médiu s koncentrací 60 mg/ml.

5.3 Příprava testovaných látek

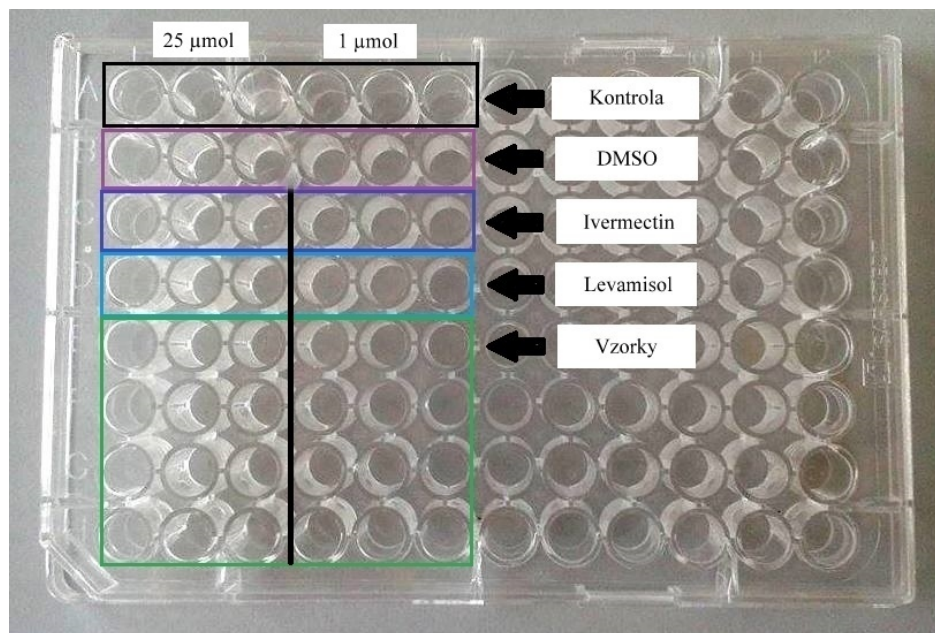
1. Všechny testované látky byly ponechány 10 minut v ultrazvukové lázni.
2. Poté byla připravena ředicí deska.
3. Do prvního sloupce 96-jamkové destičky bylo napipetováno SC médium.
4. Do jamek byly napipetovány takové objemy jednotlivých testovaných látek, aby výsledná koncentrace v prvním sloupci ředicí desky byla 100 μmol .
5. Do druhého sloupce destičky bylo napipetováno SC médium a z prvního sloupce přenesen takový objem, aby výsledná koncentrace v druhém sloupci ředicí desky byla 4 μmol , čímž byly látky 25x naředěny.
6. Opět se pracovalo v prostředí sterilního boxu.

5.4 Nasazení hád'átek na desku

1. Ve sterilním boxu bylo na 96-jamkovou desku napipetováno do každé jamky 37,5 μl suspenze hád'átek.
2. Před každým pipetováním byla suspenze promíchána, aby hád'átka neklesala ke dnu.

5.5 Otrava hád'átek testovanými látkami

1. Destička s nasazenými hád'átky byla ovlivněna připravenými látkami, obrázek č. 16.
2. Po přidání látek z ředicí desky se koncentrace ještě 4x naředila na finální koncentrace $25\mu\text{mol}$ a $1\mu\text{mol}$.
3. Jednotlivé koncentrace byly pipetovány v triplicátu.
4. Na každou desku byl použit levamisol a ivermectin jako pozitivní kontrola.
5. Jamky, do kterých nebyly žádné látky přidány a jamky s DMSO byly použity jako negativní kontrola. DMSO je rozpouštědlo používané pro přípravu testovacích roztoků a přidávalo se ve stejném objemu pro vyloučení jeho vlivu na hlístice.
6. Ovlivněná destička byla zalepena fólií zabraňující odparu tekutiny z jamek a ze sterilního boxu umístěna do inkubátoru při $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 16: Schéma znázorňující 96-jamkovou destičku a distribuci jednotlivých látek v koncentracích $25\mu\text{mol}$ a $1\mu\text{mol}$, kromě kontroly a DMSO.

5.6 Ověření aktivity látek na *Caenorhabditis elegans*

1. Hád'átka byla kontrolována pod světelným mikroskopem (Olympus IX51). po 1 hodině a po 24 hodinách po ovlivnění. Použité zvětšení bylo 100x.
2. Hodnotilo se přibližné procentuální zastoupení mrtvých a živých hlístic na základě jejich pohyblivosti a paralýzy těla.
3. Populaci v každé jamce bylo přiřzeno skóre od jedné do pěti, viz. tabulka č. 10.

Tab. 10: Procentuální vymezení hodnotících skupin

Množství mrtvých červů	Skóre
0 %	1
pod 50 %	2
cca 50 %	3
nad 50 %	4
100 %	5

6 Výsledky

6.0.1 Optimalizace metodiky a výběr pozitivních kontrol

Před začátkem samotného experimentu byla provedena optimalizace a výběr pozitivní kontroly. Pro testování byly vybrány tyto látky: pyrantel, abamectin, levamisol, ivermectin a mebendazol. Hlístice *C. elegans* byly ovlivněny podle postupu uvedeného v metodách, v koncentracích 25 μmol a 1 μmol . Byly vyhodnocovány populace celkem v 6-ti jamkách. Hád'átka nebyla věkově synchronizovaná, v populaci tedy byli zastoupeni dospělci i všechny druhy larev. Bylo tedy možné sledovat případný selektivní vliv pouze na některé vývojové stádium. Pokus byl proveden dvakrát a po 1 a 24 hodinách byl vliv jednotlivých antihelmintik vyhodnocen. Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulkách č. 11 - 14.

Tab. 11: Vyhodnocení vlivu pozitivních kontrol po 1 hodině od ovlivnění

Testovaná látka	Skóre					
Kontrola	2	2	1	1	1	1
DMSO	1	2	1	1	1	1
	25 μmol		1 μmol			
Abamectin	5	5	5	5	5	5
Pyrantel	2	2	2	2	2	2
Ivermectin	5	5	5	3	4	3
Levamisol	2	2	3	2	2	2
Mebendazol	2	2	2	2	2	2

Tab. 12: Vyhodnocení vlivu pozitivních kontrol po 24 hodinách od ovlivnění

Testovaná látka	Skóre					
Kontrola	2	2	1	2	1	2
DMSO	1	2	1	1	1	2
	25 μmol			1 μmol		
Abamectin	5	5	5	5	5	5
Pyrantel	2	2	2	2	2	2
Ivermectin	5	5	5	5	5	5
Levamisol	4	4	4	2	2	2
Mebendazol	2	2	2	2	2	2

Tab. 13: Vyhodnocení vlivu pozitivních kontrol po 1 hodině od ovlivnění

Testovaná látka	Skóre					
Kontrola	2	2	2	2	1	1
DMSO	2	1	2	2	2	2
	25 μmol			1 μmol		
Abamectin	5	4	5	5	5	5
Pyrantel	2	2	3	3	3	3
Ivermectin	4	4	5	5	5	4
Levamisol	3	2	2	3	3	3
Mebendazol	3	3	3	3	3	3

Tab. 14: Vyhodnocení vlivu pozitivních kontrol po 24 hodinách od ovlivnění

Testovaná látka	Skóre					
Kontrola	2	2	2	2	2	2
DMSO	2	1	2	2	2	2
	25 μmol			1 μmol		
Abamectin	5	5	5	5	5	5
Pyrantel	3	3	3	3	3	3
Ivermectin	5	5	5	5	5	5
Levamisol	4	4	4	3	4	3
Mebendazol	3	3	3	3	3	3

V kontrolních neovlivněných jamkách hlístice vykazovaly normální pohyb a bylo pozorováno pumpování pharynxu. U hlístic ovlivněných DMSO taktéž nebyl zaznamenán jakýkoli efekt látky.



Obr. 17: Kontrola



Obr. 18: DMSO

Efekt mebendazolu se na hlísticích viditelně neprojevil a nebyl selektivní pro určité vývojové stádium. Slabý vliv byl zaznamenán pouze ve vyšší koncentraci. Hlístice se pohybovaly pouze mírně rozdílně od kontroly. Proto jsme se rozhodli mebendazol jako pozitivní kontrolu nezvolit. Mohl by být vhodný v experimentech na reprodukční toxicitu, protože dle literatury [15] se jeho efekt projevuje zejména v dalších generacích.



Obr. 19: Mebendazol ($1 \mu\text{mol}$)



Obr. 20: Mebendazol ($25 \mu\text{mol}$)

Mnohem výraznější svalové kontrakce byly zaznamenány u hlístic ovlivněných levamisolem. Byla zde menší pohyblivost než u hlístic ovlivněných pyrantelem. Ve vyšších koncentracích byly zaznamenány silné záškuby a stočení těla a po 24 hodinách byla zaznamenána

úmrtnost u části populace. Množství uhynulých červů bylo závislé na dávce levamisolu. Látka působila stejně na všechna vývojová stádia. Z toho jsme usoudili, že levamisol bude vhodný jako pozitivní kontrola.

V prvotních optimalizačních experimentech (provedených vedoucí práce), kde byly látky testovány i ve vyšších koncentracích, byla u hlístic vystavených 100 μmol pyrantelu pozorována úmrtnost, paralýza a záškuby těla podobné jako u levamisolu. V nižších koncentracích, které byly vybrány pro následující experimenty, však pyrantel působil pouze slabě ve vyšší koncentraci 25 μmol a změna pohybu oproti kontrole nebyla významná. Proto byl jako zástupce této chemické skupiny upřednostněn levamisol.



Obr. 21: Levamisol (1 μmol)



Obr. 22: Levamisol (25 μmol)

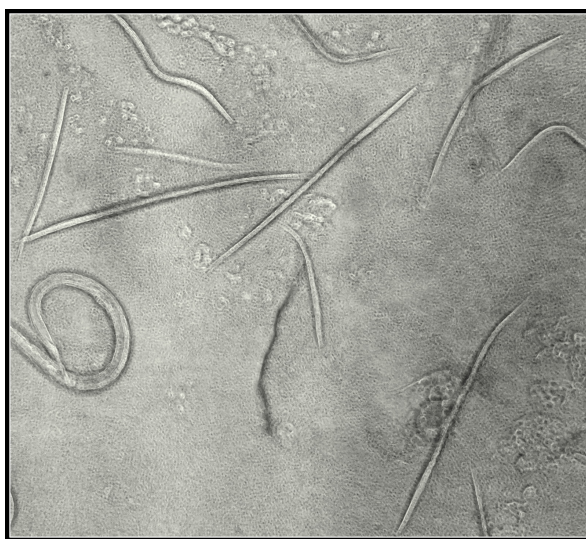


Obr. 23: Pyrantel (1 μmol)



Obr. 24: Pyrantel (25 μmol)

Ivermectin a abamectin účinkovaly velmi podobně. Těla ovlivněných hlístic byla již po hodině viditelně natažená a nevykazovala žádný pohyb. Nebylo pozorováno ani pumpování pharynxu. Tyto látky byly ze všech testovaných jednoznačně nejtoxičtější. Efekt byl stejný u všech vývojových stádií. Tyto projevy byly zaznamenány u obou testovaných látek a v obou koncentracích. Obě tyto látky by byly vhodnou pozitivní kontrolou. V našich experimentech jsme použili ivermectin, protože je častěji využíván a finančně dostupnější.



Obr. 25: Abamectin (1 μ mol)



Obr. 26: Abamectin (25 μ mol)



Obr. 27: Ivermectin (1 μ mol)



Obr. 28: Ivermectin (25 μ mol)

Všechny záběry jsou pořízeny 24 hodin po otravě, fotoaparátem SONY DSC WX-300 při zvětšení 100x ve světelném mikroskopu Olympus IX51.

6.0.2 Akutní toxicita vybraných rostlinných hormonů pro *Caenorhabditis elegans*

Testovala se chemická knihovna LRR, ve které dominovaly deriváty cytokininů purinového typu. Tyto látky byly vybrány, protože dřívější výzkum ukázal, že některé z nich, například cytokininové ribosidy a od benzylaminopurinu odvozené inhibitory cyklin dependentních kináz, jsou toxické pro živočišné buňky.[46, 47]

Byla testována toxicita přírodních cytokininů. Otestován byl kinetin, kinetin ribosid, isopentenyl adenin a jeho ribosid. Dále *ortho*, *meta* a *para*-topolin a jejich ribosidy, benzylaminopurin a jeho ribosid, *trans* a *cis*-zeatin a jejich ribosidy a 2-hydroxy-3-methoxy benzylaminopurin ribosid. Celkem tedy bylo otestováno 17 přírodních cytokininů. Ani u jednoho nebyl zaznamenán akutní toxický účinek.

Z knihovny LRR bylo vybráno a testováno celkem 378 derivátů cytokininů. Ani žádná z těchto látek nebyla akutně toxická pro *C. elegans*.

7 Diskuze

C. elegans má mnoho výhod, mezi které patří již zmiňovaný krátký životní cyklus, znalost genomu, snadné klonování anebo optická transparence. Dostupná je celá řada mutantních linií, včetně těch s pozměněnou rezistencí k existujícím antihelminetikům. Nicméně tento modelový organismus přináší mnohé další podstatné přínosy. Velkou výhodou při objasňování mechanismu účinku nově nalezených aktivních látek a mechanismů rezistence je schopnost samooplození. Díky této schopnosti jsme schopni získat geneticky uniformní populaci, ve které se snadno udrží požadovaný fenotyp a recesivní mutanty lze snadno izolovat.[48] Tato vlastnost je výhodná například při využívání metod reverzní genetiky, kdy je náhodně vytvořený rezistentní mutant snadno namnožen a poté blíže zkoumán. [49] Namísto vytváření mutantní populace je možné využít také RNA interferenci. RNA interference je způsob negativní regulace genetické exprese. Princip spočívá v interakci zavedených fragmentů RNA s mRNA exprimovaných genů. [50]

Na druhou stranu, ačkoliv *C. elegans* přináší řadu výhod, není parazitickou hlísticí, aby představovalo naprosto reprezentativní model. Studované látky tedy mohou v *C. elegans* chovat jinak, než v parazitických hlísticích. K výsledkům ze studií prováděných na tomto organismu je tedy potřeba přistupovat s jistou rezervou.

Cílem této práce bylo otestovat látky, vybrané z chemické knihovny LRR, na akutní toxicitu na *C. elegans*. Šlo převážně o přírodní cytokininy purinového typu a jejich deriváty. Byla zvolena jednoduchá a rychlá metoda screeningu, ve které se dané látky testovaly ve dvou koncentracích - 25 μmol a 1 μmol . Ve vyšších koncentracích by u některých látek hrozila precipitace v médiu.

Některé látky vykazují pozitivní aktivitu pouze u určitého stádia hlístice. Látka působící na dospělé nemusí tedy nutně působit i na jeho larvální stádia a naopak.[51] Proto v našich experimentech byla použita nesynchronizovaná populace, zahrnující jedince v různých vývojových stádiích, abychom tento efekt mohli případně zaregistrovat.

Test byl proveden na několika běžně využívaných antihelminthicích ze 3 různých chemických skupin. Zástupce benzimidazolů, mebendazol, neměl v našich testech žádný výrazný efekt. Podle literatury [15] se jeho toxický vliv na *C. elegans* projevuje až v další generaci, tato látka tedy byla pro naše účely nevhodná. Uplatnění by však mohla najít jako kontrola

v experimentech zkoumajících dlouhodobější toxicitu látek. Ze skupiny imidazothiazolů byl jako pozitivní kontrola pro další experimenty vybrán levamisol, který účinkoval v nižších koncentracích než druhý testovaný zástupce této skupiny, pyrantel. Dále byly testovány dva makrocyclické laktony, ivermectin a abamectin. Tyto sloučeniny byly ze všech testovaných látek jednoznačně nejtoxickéjší. Účinek obou byl podobný, pro další experimenty byl však vybrán ivermectin, který je v praxi častěji využíván a finančně dostupnější.

Látky byly rozpuštěny v DMSO a proto se testoval i jeho vliv na hlístice. DMSO v tomto, ani v žádném z následujících experimentů, neovlivnilo výrazně pohyb ani vzhled hlístic oproti neovlivněné kontrole. Samo o sobě v použitých koncentracích tedy žádnou pozorovatelnou toxicitu nevykazuje.

Bylo testováno 17 přírodních cytokininů a 378 derivátů vybraných z chemické knihovny LRR. Cytokininové ribosidy a inhibitory cyklin dependentních kináz odvozené od benzy-laminopurinu v dřívějších studiích vykazovaly toxicitu pro živočišné buňky. [46, 47] Tato práce měla za cíl prozkoumat, jestli bude podobný toxický efekt pozorovatelný i v *C. elegans*. To by z látek činilo zajímavé kandidáty na nová antihelmintika.

Testované látky byly vybrány tak, aby výsledný soubor co nejlépe postihl strukturní variabilitu v knihovně obsaženou. K tomuto účelu byla použita shluková analýza klíčů MACCS, jednoho z tzv. strukturních fingerprintů. Vstupní soubor (N=5500) byl rozdělen do 2 shluků a z každého byl vybrán jeden reprezentant. Významnou strukturní variabilitu výsledného souboru odrazí to, že látky reprezentují 157 skeletů podle Bemise a Murka.

Látky byly testovány v jednom opakování. Žádná z testovaných látek nebyla pro *C. elegans* toxická.

V nedávné studii z roku 2015 bylo otestováno přes 67 000 látek. Úspěšnost při nacházení toxických látek byla 0,4 %. [52] V rámci této práce bylo otestováno celkem 395 látek. Jedná se tedy o relativně nízký počet a pravděpodobnost nalezení aktivní látky je poměrně malá.

Látky by se ale mohly dále testovat na reprodukční toxicitu, za pomoci již zmiňovaných chitinázových testů. [37] Dále by se mohla vyhodnotit i dlouhodobá toxicita, která se projevuje až v dalších generacích od ovlivnění.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, metody pro vyhodnocování viability se stále vyvíjejí. Do budoucna by bylo vhodné se zaměřit i na jiné parametry než na úmrtnost, například změny v pohyblivosti.

Vizuální hodnocení je náročné a lidské oko není schopno zaznamenat drobné změny v pohyblivosti hlístice. Navíc vyhodnocování u každé hlístice zvlášť je vyčerpávající a časově náročné. Drobné změny, které lidské oko nepostřehne, ale mohou naznačovat účinek dané látky na svalový nebo nervový systém, což jsou vhodné cíle pro nematocidní látky. Nová metoda ve formě softwaru, který by tyto drobné změny dokázal rozlišit, by přinesla velkou výhodu. Bylo by možné najít i látky s menší aktivitou, které by mohly být odrazovým můstkem pro hledání látky s podobnou strukturou, která by mohla vykazovat podobný, v ideálním případě vyšší nematocidní efekt.

Výhodou oproti manuálnímu vyhodnocování, které je časově náročné a dochází během něho k chybám, je využití např. obrazové analýzy. Tato metoda spolu s dalšími byla již zmíněna v kapitole 4.9. Pro tyto experimenty není však laboratoř LRR vybavena, a proto by byla nutná budoucí spolupráce s laboratoří disponující potřebným vybavením.

Pokud by v budoucnu byla v naší knihovně nalezena látka, která působí toxicky na *C. elegans*, bylo by vhodné pokračovat s experimenty na vybraných parazitických hlísticích, aby získaná data byla co nejobektivnější. [53]

8 Závěr

Vzrůstající rezistence parazitických hlístic k dosud používaným antihelmintikům se netýká jenom humánní medicíny, ale ve velké míře postihuje také zemědělství. Z toho vyplývá nutnost hledání nových účinných látek k jejich kontrole.

Cílem této studie bylo zavedení snadné a rychlé metody screeningu akutní helmintotoxicity na modelovém organismu *C. elegans* a pilotní testování metodiky na vzorku 17 přírodních cytokininů a 378 derivátů z knihovny rostlinných hormonů LRR.

Z běžně používaných antihelmintik byl jako pozitivní kontrola zvolen ivermectin a levamisol, které byly stejně jako ostatní látky připraveny v koncentracích 25 μmol a 1 μmol . Po expozici zkoumanými látkami se ve světelném mikroskopu vyhodnocovala viabilita hlístic. V průběhu experimentální části byl potvrzen nulový vliv použitého rozpouštědla (DMSO) na životní funkce modelového organismu a zachyceno několik látek podezřelých z toxicity vůči *C. elegans*. Podezření se však opakovaným testováním ani v jednom případě neprokázalo. Žádná z námi testovaných látek tedy nevykazovala nematocidní aktivitu.

Do budoucna by bylo vhodné otestovat další látky a zaměřit se i na jiné parametry než akutní toxicitu - například na změny pohyblivosti, růstu nebo vývoje *C. elegans*.

Reference

- [1] J. Jíra. *Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci*. Galén, 1998.
- [2] P Horák, P. Volf, and kol. *Paraziti a jejich biologie*. Triton, 2007.
- [3] V. Zicháček. *Zoologie*. Olomouc, 2012.
- [4] E. Sedlák. *Zoologie bezobratlých*. Brno: Masarykova univerzita, 2002.
- [5] Z. Čermáková, Z. Valenta, B. Voxová, and M. Förstl. Enterobióza—zapomenutá diagnóza. *Folia Gastroenterol Hepatol*, 7(2):55–60, 2009.
- [6] G. C. Cook. Enterobius vermicularis infection. *Gut*, 35(9):1159, 1994.
- [7] F. Stejskal. Současná léčba helmintóz. *Klin Farmakol Farm*, 19:111–115, 2005.
- [8] World Health Organization et al. Who model list of essential medicines for children: 4th list, april 2013, 2013.
- [9] L. Savioli. Preventive anthelmintic chemotherapy—expanding the armamentarium. *New England Journal of Medicine*, 370(7):665–666, 2014.
- [10] D. P. Jasmer, Ch. Yao, A. Rehman, and S. Johnson. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode haemonchus contortus. *Molecular and biochemical parasitology*, 105(1):81–90, 2000.
- [11] R.K. Prichard. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *International journal for parasitology*, 20(4):515–523, 1990.
- [12] M. Driscoll, E. Dean, E. Reilly, E. Bergholz, and M. Chalfie. Genetic and molecular analysis of a caenorhabditis elegans beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *The Journal of cell biology*, 109(6):2993–3003, 1989.
- [13] J. Lamka and L. Ducháček. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Karolinum Press, 2014.

- [14] J.A. Lewis, C.H. Wu, J.H. Levine, and H. Berg. Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience*, 5(6):967–989, 1980.
- [15] J. A. Dent. What can *Caenorhabditis elegans* tell us about nematocides and parasites? *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(4):252–263, 2001.
- [16] T. G. Geary. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in parasitology*, 21(11):530–532, 2005.
- [17] T. L. Meinking, D. Taplin, J. L. Herminda, R. Pardo, and F. A. Kerdel. The treatment of scabies with ivermectin. *New England Journal of Medicine*, 333(1):26–30, 1995.
- [18] R. Prichard. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54(1):259–268, 1994.
- [19] B. Owens. 2015 nobel prize goes to antiparasitic drug discoverers. *The Lancet*, 386(10002):1433, 2015.
- [20] L. Holden-Dye and R. J. Walker. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, page 1, 2014.
- [21] J.M. Schurer, C. McKenzie, P.M. Dowling, E. Bouchard, and E.J. Jenkins. Parasite control in canadian companion animal shelters and a cost-comparison of anthelmintics. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 56(9):964–970, 2015.
- [22] R.K. Prichard, C.A. Hall, J.D. Kelly, I.C.A. Martin, and A.D. Donald. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56(5):239–250, 1980.
- [23] J. B. Rand. *Acetylcholine*. WormBook, 2007.
- [24] I. D. Harrow and K. A.F. Gration. Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*. *Pesticide Science*, 16(6):662–672, 1985.
- [25] N.C. Sangster, F.L. Riley, and G.H. Collins. Investigation of the mechanism of levamisole resistance in trichostrongylid nematodes of sheep. *International journal for parasitology*, 18(6):813–818, 1988.

- [26] M. Xu, M. Molento, W. Blackhall, P. Ribeiro, R. Beech, and R. Prichard. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of p-glycoprotein homolog1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91:327–335, 1998.
- [27] I. Scott, W.E. Pomroy, P.R. Kenyon, G. Smith, B. Adlington, and A. Moss. Lack of efficacy of monepantel against *teladorsagia circumcincta* and *trichostrongylus colubrifomis*. *Veterinary parasitology*, 198(1):166–171, 2013.
- [28] H. J. Atkinson, C. J. Lilley, and P. E. Urwin. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. *Current opinion in biotechnology*, 23(2):251–256, 2012.
- [29] S. S. Briar, D. Wichman, and G.V.P. Reddy. Plant-parasitic nematode problems in organic agriculture. In *Organic Farming for Sustainable Agriculture*, pages 107–122. Springer, 2016.
- [30] A. K. Corsi, B. Wightman, and M. Chalfie. A transparent window into biology: A primer on *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2):387–407, 2015.
- [31] W. B. Wood. 1 introduction to *c. elegans* biology. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 17:1–16, 1988.
- [32] S. D. Buckingham, F. A. Partridge, and D. B. Sattelle. Automated, high-throughput, motility analysis in *caenorhabditiselegans* and parasitic nematodes: Applications in the search for new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3):226–232, 2014.
- [33] M. Ponce-Macotella, A. Rodríguez-Caballero, G. E. Peralta-Abarca, and M. N. Martínez-Gordillo. A simplified method for hatching and isolating *toxocara canis* larvae to facilitate excretory–secretory antigen collection in vitro. *Veterinary parasitology*, 175(3):382–385, 2011.
- [34] D. Reiss, L. M. Harrison, R. Bungiro, and M. Cappello. An agar plate method for culturing hookworm larvae: analysis of growth kinetics and infectivity compared with standard coproculture techniques. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(6):1087–1090, 2007.

- [35] T. Stiernagle. Maintenance of *c. elegans*. *C. elegans*, 2:51–67, 1999.
- [36] R. Laing, T. Kikuchi, A. Martinelli, I. J. Tsai, R. N. Beech, E. Redman, N. Holroyd, D. J. Bartley, H. Beasley, C. Britton, et al. The genome and transcriptome of *haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol*, 14(8):R88, 2013.
- [37] B. R. Ellerbrock, E. M. Coscarelli, M.E. Gurney, and T. G. Geary. Screening for pre-senilin inhibitors using the free-living nematode, *caenorhabditis elegans*. *Journal of biomolecular screening*, 9(2):147–152, 2004.
- [38] G. D. Tsibidis and N. Tavernarakis. Nemo: a computational tool for analyzing nematode locomotion. *BMC neuroscience*, 8(1):86, 2007.
- [39] M. S. Gill, A. Olsen, J. N. Sampayo, and G. J. Lithgow. An automated high-throughput assay for survival of the nematode *caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(6):558–565, 2003.
- [40] Ch. K. Leung, Y. Wang, S. Malany, A. Deonaraine, K. Nguyen, S. Vasile, and K. P. Choe. An ultra high-throughput, whole-animal screen for small molecule modulators of a specific genetic pathway in *caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 8(4):e62166, 2013.
- [41] M. D. Mathew, N. D. Mathew, and P. R. Ebert. Wormscan: A technique for high-throughput phenotypic analysis of *caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 7(3):e33483, 2012.
- [42] S. E. Hulme, S. S. Shevkoplyas, A. P. McGuigan, J. Apfeld, W. Fontana, and G. M. Whitesides. Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *c. elegans*. *Lab on a Chip*, 10(5):589–597, 2010.
- [43] N. Stroustrup, B. E. Ulmschneider, Z. M. Nash, I. F. López-Moyado, J. Apfeld, and W. Fontana. The *caenorhabditis elegans* lifespan machine. *Nature methods*, 10(7):665–670, 2013.
- [44] G. M. Solis and M. Petrascheck. Measuring *caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49):e2496–e2496, 2011.

- [45] M. A. Wilson, B. Shukitt-Hale, W. Kalt, D. K. Ingram, J. A. Joseph, and C. A. Wolkow. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 5(1):59–68, 2006.
- [46] J. Voller, M. Zatloukal, R. Lenobel, K. Doležal, T. Béréš, V. Kryštof, L. Spíchal, P. Niemann, P. Džubák, M. Hajdúch, et al. Anticancer activity of natural cytokinins: A structure–activity relationship study. *Phytochemistry*, 71(11):1350–1359, 2010.
- [47] K. Vermeulen, M. Strnad, V. Krystof, L. Havlicek, A. Van der Aa, M. Lenjou, G. Nijs, I. Rodrigus, B. Stockman, H. Van Onckelen, et al. Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia*, 16(3):299–305, 2002.
- [48] S. Brenner. The genetics of *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1):71–94, 1974.
- [49] J. Ahringer. Reverse genetics. 2006.
- [50] A. G. Fraser, R.S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, M. Sohrmann, and J. Ahringer. Functional genomic analysis of *c. elegans* chromosome i by systematic rna interference. *Bli*, 4:0–2, 2000.
- [51] T. G. Geary, N. C. Sangster, and D. P. Thompson. Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Veterinary Parasitology*, 84(3):275–295, 1999.
- [52] A. R. Burns, G. M. Luciani, G. Musso, R. Bagg, M. Yeo, Y. Zhang, L. Rajendran, J. Glavin, R. Hunter, E. Redman, et al. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature communications*, 6, 2015.
- [53] J. Keiser. Is *caenorhabditis elegans* the magic bullet for anthelminthic drug discovery? *Trends in parasitology*, 31(10):455–456, 2015.