

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ondřej Vosála

Metody stanovení viability parazitických helmintů
Methods for assessing the viability of parasitic helminths

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Macháček, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Barbora Šmídová

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 8. 2021

Ondřej Vosála

Poděkování

Hlavní dík patří mému školiteli a konzultantce za lidský, vstřícný, přesto však velice profesionální a podnětný přístup.

Abstrakt

Stanovování viability a jejích změn je důležitou součástí helmintologického výzkumu. V celé řadě experimentů (např. výzkum udržování životních cyklů *in vitro*, studium imunitních interakcí helminta a hostitele a testováním nových potenciálních léčiv) je nutné, aby byla viabilita zkoumaných jedinců určována s co možná nejvyšší přesností a správností. Fyziologie, morfologie i biochemie jednotlivých helmintů, dokonce i jednotlivých vývojových stádií jednoho druhu se ovšem natolik liší, že nemůže existovat jediná univerzální a všestranně využitelná metoda. Při výběru optimální metody je nutné zohlednit vyvážení těchto parametrů: přesnost, správnost, časová náročnost, univerzálnost, nároky na pracovní zkušenosti a finanční dostupnost. Tato práce proto shrnuje metody používané k vyhodnocování viability helmintů, vysvětluje jejich principy a z nich plynoucí limity daných metod. Konečně pak předkládá souhrn metod a jejich vhodnost pro použití u různých druhů helmintů s ohledem na zvolený typ experimentu.

Klíčová slova

Viabilita, helmint, helmintóza, morfologie, motilita, barvivo

Abstract

Assessing the viability of parasitic helminths is an important part of helminthological research. Indeed, precise and valid determination of helminth viability is required in many fields, such as maintenance of helminth life cycles *in vitro*, exploring the host-helminth immune interactions, or testing novel drugs and vaccines. Physiological, morphological, and biochemical features vary among helminth species and even particular ontogenetic stages of the species itself. Thus, it is impossible to have one universal method for assessing the viability. When choosing the method, one must consider its preciseness, validity, throughput, versatility, demands of professional experience, and financial availability. The presented thesis reviews methods used for assessing the viability of parasitic helminths, explains their principles and consequential limits. Finally, it presents a summary of the methods, their suitability for specific helminth species, and types of experiments.

Key words

Viability, helminth, helminthosis, morphology, motility, dye

Seznam zkratek

5AF	5(N-oktadodekoyl)-aminofluorescein
AB	resazurin (z angl. alamar blue)
AO	akridinová oranž (z angl. acridine orange)
ATP	adenosin trifosfát
CAL	kalcein
CAM	acetoxymethylester kalceinu
C-FDA	karboxydiacetyl fluorescein
CPM	cytoplasmatická membrána
CR	kongo červeň (z angl. Congo red)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
EC₅₀	medián efektivní koncentrace (z angl. effective concentration); zde koncentrace látky, která způsobí úmrtí 50% jedinců
EHA	líhňová metoda (z angl. Egg Hatching Assay)
EHPA	metoda pozorování paralýzy při líhnutí (z angl. Egg Hatching Paralysis Assay)
EOB	eozin-B
EOY	eozin-Y
EtBr	ethidium bromid
EtHM1	ethidium homodimer 1
FDA	diacetyl fluorescein
FECRT	metoda pozorování snižování počtu vylučovaných vajíček (z angl. Feces Egg Count Reduction Test)
H258	Hoechst 33258
H342	Hoechst 33342
HFB	helminth fluorescence bioassay
IC₅₀	medián efektivní inhibice (z angl. inhibition concentration); koncentrace látky inhibující 50 % biochemických procesů
LC₅₀	střední smrtná koncentrace (z angl. lethal concentration); koncentrace látky způsobující úmrtí 50 % jedinců
LD₅₀	střední smrtná dávka (z angl. lethal dose); množství látky způsobující úmrtí 50 % jedinců
LFIA	metoda pozorování inhibice příjmu potravy (z angl. Larvae Feeding Inhibition Assay)
MB	methylenová modř (z angl. methylen blue)
MTS	Owenův reagent (z angl. Owen's reagent)

MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromid
NAD(P)H	nikotinamid dinukleotid (fosfát)
NBT	nitro blue tetrazolium chlorid
NK	nukleová kyselina (z angl. nucleic acid)
NR	neutrální červeň (z angl. neutral red)
PI	propidium jodid
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
TB	trypanová modř (z angl. trypan blue)
TBO	toluidinová modř (z angl. toluidine blue)

Seznam zmíněných chemikálií

5AF	N-(3',6'-dihydroxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-4'-yl)oktadekanamid
AB	7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-on 10-oxid
AO	N,N,N',N'-Tetramethylakridin-3,6-diamin
CAL	2-[[7'-[[bis(karboxymethyl)amino]methyl]-3',6'-dihydroxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-2'-yl]methyl-(karboxymethyl)amino]acetát
CAM	acetyloxymethyl 2-[[2-(acetyloxymethoxy)-2-oxoethyl]-[[3',6'-diacetyloxy-7'-[[bis[2-(acetyloxymethoxy)-2-oxoethyl]amino]methyl]-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-2'-yl]methyl]amino]acetát
C-FDA	3',6'-diacetyloxy-1-oxospiro[2-benzofuran-3,9'-xanthen]-5-karboxylová kyselina
CR	4-amino-3-[4-[4-(1-amino-4-sulfonato-naftalen-2-yl)diazenylfenyl]fenyl]diazenyl naftalen-1-sulfonát disodný
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
EOB	2-(4,5-dibromo-2,7-dinitro-3-oxido-6-oxoxanthen-9-yl)benzoová kyselina
EOY	2-(2,4,5,7-tetrabromo-3-hydroxy-6-oxoxanthen-9-yl)benzoová kyselina
EtBr	3,8-diamino-5-ethyl-6-fenylfenanthridinium bromid
EtHM1	5,5'-(fenanthridinium, 5,5'-[1,2-ethanedylbis(imino-3,1-propanediyl)]bis(3,8-diamino-6-phenyl) tetrachlorid
FDA	(6'-acetyloxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-3'-yl) acetát
H258	4-[6-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]-1H-benzimidazol-2-yl]fenol
H342	(2'-(4-ethoxyfenyl)-5-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,5'-bibenzimidazol
MB	3,7-bis(dimethylamino)-fenothiazin-5-ium chlorid
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
NBT	2,2'-Bis(p-nitrofenyl)-5,5'-difenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenilylen) ditetrazolium chlorid
NR	3-amino-7-dimethylamino-2-methylfenazin hydrochlorid
PI	3,8-diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-fenylfenanthridinium diiodid
TB	(3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimethylbifenyl-4,4'-diyl)di(1Z)hydrazin-2-yl-1-yliden]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihydronaftalen-2,7-disulfonová kyselina)
TBO	(7-amino-8-methylfenothiazin-3-yliden)-dimethylazanium chlorid
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Metody monitorující celkový stav helminta.....	2
2.1	Morfologie a motilita.....	2
	Úvod.....	2
	<i>In vitro</i> metody.....	2
	<i>In vivo</i> metody.....	6
2.2	Mikrokalorimetrie.....	7
2.3	Měření hodnot koncentrací metabolitů parazita.....	8
	Laktát.....	8
	ATP.....	9
	Další látky a enzymy.....	9
2.4	Radiorespirometrie.....	10
3	Metody monitorující integritu membrán helminta.....	10
3.1	Neutrální červeň (toluylene red).....	10
3.2	Kongo červeň.....	12
3.3	Trypanová modř (diamine blue, Niagara blue).....	13
3.4	Eosin.....	14
3.5	Deriváty fluoresceinu.....	15
3.6	Alkylaminofluorescein.....	16
4	Metody monitorující redoxní schopnosti buněk helminta.....	16
4.1	Skupina monotetrazoliových solí.....	17
	První generace tetrazoliových solí.....	17
	Druhá generace tetrazoliových soli.....	20
4.2	Resazurin (Presto blue).....	21
4.3	Methylenová modř.....	22
5	Metody interagující s nukleovými kyselinami v buňkách helminta.....	24
5.1	Deriváty fenanthridinu (ethidium bromid, propidium jodid).....	24
5.2	DAPI.....	27
5.3	Hoechstova barviva.....	27
5.4	Toluidinová modř.....	29
5.5	Akridinová oranž.....	31
6	Závěr.....	32
7	Zdroje.....	33

1 Úvod

Humánní i veterinární helmintózy jsou nezanedbatelným problémem především tropických zemí. Mezi nejzávažnější patogeny patří hlístice (mj. rody *Trichuris*, *Brugia*), motolice rodů *Schistosoma* a *Fasciola*, jakožto i tasemnice rodu *Taenia* a *Echinococcus* (CDC, 2019). Za rok 2010 měly helmintózy dohromady na svědomí přes 26 milionů lidských DALYs (let ztracených v důsledku nemoci, z angl. disability adjusted life year) (GAHI: Global Atlas of Helminth Infections, 2016) nemluvě o velikosti hospodářských škod způsobených sníženým výkonem či úmrtím nakažených zvířat. Mezi nejvýznamnější původce veterinárních helmintóz patří rody *Strongyloides*, *Moniezia* a *Fascioloides* (Maichomo, Kagira & Walker, 2004). Není přitom naděje, že se v dalších letech medicínský a veterinární význam helmintů dramaticky sníží, jelikož existuje jen hrstka ochraňujících hospodářská zvířata (příkladem takové úspěšné vakcíny je Cysvax proti cysticerkóze vepřů (Flisser *et al.*, 2004)) a žádná využitelná u lidí. Anthelmintika, látky používané v boji s parazitickými helminty, jsou tedy jedinou možností jejich ochrany a stále převažující možností u zvířat – dlouhodobě se ale vynořuje problém vzniku nových kmenů rezistentních vůči látkám využívaným v současné době jako léčiva (Doenhoff *et al.*, 2002; Novobilský & Höglund, 2015). Výzkum v těchto oborech (vývoj nových léčiv a vakcín) je tudíž nesmírně důležitý, ovšem pro jeho zdárné dokončení je mimo jiné nutné znát co nejpřesněji i míru účinku zkoumané látky či vakcíny na viabilitu helminta. Právě viabilita, tedy životaschopnost, je velice široký a obecný pojem, jež je definován mnohými faktory – motilitou (pohyblivostí), integritou povrchových membrán, fekunditou (schopností vytvářet potomstvo), fertilitou (reálnou produkcí potomstva), metabolickou aktivitou atp. Samotné stanovování viability se pak odvíjí od pozorování těchto faktorů.

Cílem této práce je popsat a shrnout metody využívané při stanovování viability parazitických helmintů, na příkladech vysvětlit jejich principy a úskalí, zhodnotit míru jejich přesnosti, správnosti a využitelnosti v praxi – ať již terénní, laboratorní či průmyslové.

2 Metody monitorující celkový stav helminta

2.1 Morfologie a motilita

Úvod

Morfologické metody jsou pro své snadné provádění prvními testy, kterými výzkumníci zpravidla zjišťují viabilitu helmintů. Mohou být prováděny buď *in vivo*: vyhodnocováním stavu různých vývojových stádií helmintů získaných z biologického materiálu (trus, tkáň) hostitele, jemuž bylo např. podáno anthelmintikum přímo. Druhou možností je sledovat viabilitu helmintů *in vitro*, tedy např. po přidání anthelmintika k laboratorně pěstované kultuře helminta.

In vitro metody

Test líhnutí vajíček (EHA, z angl. *Egg hatching assay*)

Jedná se o nejstarší *in vitro* prováděný postup pro zjišťování viability životních stádií helmintů izolovaných z hostitele. Stejně početné skupiny vajíček vyloučených z hostitele jsou inkubovány po několik hodin v kultivačním médiu. Jedna ze skupin slouží jako neovlivněná negativní kontrola, u ostatních je do roztoku přidáváno anthelmintikum v několika různých koncentracích. Po uplynutí inkubační doby se spočítají vylíhnuté larvy i mrtvá vajíčka – ta, z nichž se larva nevylíhla a stanoví se úbytek vylíhnutých jedinců (Diconza & Basch, 1975).

Touto metodou byla zkoumána snížená citlivost na thiabendazol u hlístic druhů *Haemonchus contortus* a *Teladorsagia circumcincta* - stejný počet vajíček od rezistentních i nerezentních kmenů byl inkubován se stejnou koncentrací účinné látky, přičemž se ukázalo, že medián letální koncentrace (LC₅₀, vysvětleno v seznamu zkratk) odolnější populace je řádově vyšší. Důležitým faktorem pro přesnost výsledků a jejich interpretaci byla jednotnost vývojového stádia vajíček v jedné skupině, neboť u pozdějších stádií (s již patrným embryem) se vyšší rezistence vůči thiabendazolu objevovala napříč všemi zkoumanými kmeny druhu *H. contortus*. (Diconza & Basch, 1975). Aby mohly být výsledky této velice rozšířené metody porovnávány mezi sebou, byla metoda standardizována (počet vajíček na jednu kultivační jamku, objem média, výpočet relativního úbytku vylíhnutých jedinců) beze změn principu (Coles *et al.*, 1992).

Kombinací *in vitro* EHA a *in vivo* metod byla zkoumána viabilita lidských měchovců¹ při zvyšování hladiny mebendazolu – anthelmintikum bylo podáváno přímo zkoumaným lidem a působilo tedy *in vivo*. Určité procento zkoumaných dětí bylo zároveň infikováno měchovcem i škrkavkou dětskou (*Ascaris lumbricoides*). Vajíčka *A. lumbricoides* však při společné inkubaci snižovala počet vylíhnutých

¹ Jednalo se o výzkum prováděný na ostrovech při pobřeží Tanzanie. Autoři se však o zkoumaném parazitu vyjadřují jen jako o „human hookworm“, což může značit buď druhy *Ancylostoma duodenale* či *Necator americanus*. Vzhledem ke geografickému rozšíření obou druhů jde nejspíše o *N. americanus* (Albonico *et al.*, 1998).

jedinců měchovce – aby se zabránilo zkreslování výsledků, byla snížena inkubační doba. Testování přineslo údaje o tom, že i přes to, že u některých z dětí již dříve proběhla léčba ankylostomózy, nevznikly přesto žádné výrazněji odolné kmeny parazitů (Albonico *et al.*, 2005). Zkrácení inkubační doby kvůli snížení toxického vlivu vajíček *A. lumbricoides* bylo nejspíš zvoleno kvůli minimálnímu zásahu do doposud zavedené metodiky. Filtrace, která by oddělila vejíčka obou druhů, by byl zásah větší: vyvstala by nutnost dalšího vybavení, čas na vyhodnocení by se prodloužil, navíc by samotná metodika filtrace musela být optimalizována na místě.

Kvůli odlišnému principu fungování anthelmintik musela být EHA pozměněna. Anthelmintikum levimasol totiž stimuluje nervová zakončení u svalových buněk, čímž působí tonickou imobilitu (Van Heuten, 1972). Při delším vystavení této látky se ovšem mobilita navrácí (Coles, East & Jenkins, 1975). Tímto se liší od mebendazolu, který inhibuje polymeraci tubulinu, čímž v důsledku zastavuje růst mikrotubulů (Ranjan *et al.*, 2018) a příjem živin (Van Den Bossche & De Nollin, 1973). Tyto dva jevy však mohou být spojeny složitými a dosud neprozkoumanými procesy v buňkách (Lacey, 1988). Thiabendazol zase inhibuje činnost fumarát reduktázy (Prichard, 1970). Úprava EHA proto spočívá v přidání levimasolu až těsně (např. 1 h) před samotným líhnutím. Takto byla zkoumána viabilita rodů *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* a *Haemonchus*, přičemž bylo velice důležité předem definovat průměrnou vhodnou dobu inkubace vajíček před líhnutím (Martin & Le Jambre, 1979; Dobson *et al.*, 1986). Tato upravená metoda se poté označuje jako EHPA (Egg hatching paralysis assay). Nutnost odlišného přístupu u levimasolu souvisí s jeho mechanismem účinku – zatímco u thiabendazolu s mebendazolem je výhodně přidat tyto látky v co nejranějším stádiu vývoje vajíčka, aby mohly difundovat přes méně vrstev buněk a zamezily růstu a vývoji embrya, levimasol nemůže působit, dokud není nervová soustava vyvinuta.

EHA i EHPA jsou velmi levné a na vybavení nenáročné metody; jejich hlavní problém dlí v dlouhém čase provádění (inkubace v řádech hodin až dní) a nízké přesnosti u populací s nižší rezistencí na anthelmintika (Diconza & Basch, 1975; Dobson *et al.*, 1986; Albonico *et al.*, 2005) – to je způsobeno např. zmenšením počtu vajíček, která jsou vyloučena z hostitele a do výpočtu relativního úbytku se dostane chyba způsobená zákonem malých čísel. Test založený na tomto principu určuje viabilitu dospělců v hostiteli pouze nepřímou, a tím pádem je dobré ho kombinovat s jinými metodami. Rovněž je standardizovaná pouze pro několik rodů ze skupiny Nematoda, u jiných taxonů nebyla prováděna.

Testy průběhu vývoje larev a dospělců

Dalším ze způsobů zjišťování vlivu anthelmintik na viabilitu populace parazita může být i sledování opožďování vývoje jedinců od vylíhnutí po dospělost. Principem metody je inkubace larev od vylíhnutí buď do stadia L3 (Gill *et al.*, 1995) nebo do úplné dospělosti (Stringfellow, 1988). Rozdílné procento plně vyvinutých jedinců u kontrolní skupiny a skupiny kultivované na živné půdě s anthelmintiky pak určují vliv léčiv na parazita.

Metoda Gillové et al. (1995) je rychlejší, neboť vývoj druhu *H. contortus* trvá od vajíčka po stadium L3 larev šest dní. Do stádia plně dospělé samice kladoucí vejce ovšem 35 dní (Stringfellow, 1988), což je pro využití v praxi příliš dlouhá doba.

Testy sledující motilitu helmintů

Základní formou metody zkoumající motilitu je rozdělení do dvou kategorií podle toho, zda se během předem zvoleného krátkého časového úseku jedinec pozorovaný mikroskopem viditelně pohnul nebo ne (Martin & Le Jambre, 1979). Toto rozdělení není samozřejmě ideální, neboť velmi nepřesně určuje poměr živých a mrtvých jedinců – pohyblivost totiž nutně neodráží viabilitu helminta. Proto se časem objevily sofistikovanější přístupy (viz níže), a základní metoda byla standardizována pro rod *Schistosoma* – vznikly 4 základní kategorie popisu pohybu, navíc se přihlíží k celkovému vzhledu jedince (intaktnost povrchu, scvrknutí těla apod.) (Ramirez et al., 2007).

Pokrokem byl i vznik poloautomatické eseje využívající změnu toku světla přes suspenzi L3 stadií *H. contortus*. Porovnávání výkyvů světelné intenzity oproti nehybným helmintům a prázdným zkumavkám (tyto dva poslední údaje se mnoho nelišily) se monitoruje motilita helmintů. Světlo prochází přes suspenzi se zkoumanými jedinci a láme se v dutovypuklé čočce. Část odraženého světla putuje přes zesilovač do AD převodníku, odkud již putuje digitální informace do počítače. Pohyb helmintů ve zkumavce způsobí rozdíl v intenzitě světla odraženého od čočky a tedy i změnu signálu. Metoda je ale málo procesivní nehledě na potřebu speciálního přístroje a zřejmě i zcela stabilního podloží, což znemožňuje práci v terénu. Výhodou je pak druhová nespecifita a odstranění lidské chybovosti (Folz et al., 1987).

Při zkoumání druhů *Strongyloides ratti* a *Strongyloides venezuelensis* došlo rovněž k vylepšení eseje sledující motilitu. Data o pohybu a jeho rychlosti byla zaznamenávána pomocí digitální kamery a s přispěním softwaru vyhodnocována. Tím se omezila chybovost lidského faktoru. I tak bylo ovšem umožněno sbírat data jen o 20 jedincích v rámci jedné jamky (Satou et al., 2001).

Další vylepšení postupu se týká hlavně zvýšení procesivity metody dalším zapojení moderních technologií, konkrétně metody xCELLigence. Jedním z přístupů bylo připravení speciální nádoby, v níž se nacházel vždy jeden jedinec. Na dně byly umístěny zlaté elektrody, probíhal záznam změn impedance (změna povrchu dotyku testovaného subjektu a vodivého dna), z čehož byla následně vypočtena motilita. Výhodou je i jeho všestrannost, co se týče druhů i vývojových stadií parazitů: Testovány byly larvy L3 *S. ratti* a *H. contortus*, dospělci *Ancylostoma caninum* a *Schistosoma mansoni*, jakož i vajíčka *H. contortus* (zde šlo o kombinaci s EHA – zkoumala se motilita právě vylíhnutých larev). Metoda prokázala svou využitelnost, i když se objevily některé nejasnosti u měření vlivu některých anthelmintik (např. ivermektin) na motilitu stejného vývojového stádia stejného druhu. Účinek jiných (levimasol) byl však změřen velmi přesně (Smout et al., 2010). Důvodem může být odlišný mechanismus účinku obou látek - princip účinku ivermektinu spočívá v navázání na γ -aminomáselnou kyselinou aktivované kanály pro vstup Cl^- do buněk (z angl. GABA-mediated Cl^- channels) (Brownlee, Holden-Dye & Walker,

1997), čímž v závislosti na koncentraci zastaví pohyb hltau nebo celé parazitické hlístice (Kass *et al.*, 1980; Brownlee, Holden-Dye & Walker, 1997).

Metoda xWORM (xCELLintelligence worm real-time motility assay; upravená metoda xCELLigence používající odlišnou frekvenci elektrického proudu – oproti původně používaným 10 kHz zde bylo použito 25 kHz, což zvýšilo přesnost měření), byla dále využita konkrétně pro zkoumání všech vývojových stádií *S. mansoni*. U cercárií, které se v přirozeném prostředí pohybují ve vodním sloupci, muselo probíhat měření motility v PBS. Důvodem byla nutnost zvýšení kontaktu s vodivou deskou na dně měřicí nádoby. Tato nutná změna však mohla přinést arteficiální snížení motility. U ostatních vývojových stádií bylo použito standardní médium. Schistosomula kvůli svému odlišnému druhu pohybu ve formě kontrakcí nevytvořila dostatečná data pro přesné určení viability. Takto upravená metoda xCELLigence umožňuje přesnější měření motility u parazitických helmintů napříč druhy – omezení je ovšem patrné u méně pohyblivých stádií. Cercárie, jejichž pohyb byl autory popsán jako „rychlé záškuby“ byl přístrojem daleko lépe zaznamenán než kontrakce schistosomul, i když jich bylo do měřicí nádoby přidáno řádově více než cercárií (Rinaldi *et al.*, 2015).

Viabilita schistosomul *S. mansoni* byla taktéž vyhodnocována pomocí plně automatizovaného postupu: snímky pořízené za dlouhý časový úsek byly porovnávány s velkou databází snímků stejných vývojových stádií dříve vystavených několika typům anthelmintik. Fenotypové změny (tvar schistosomula, granulace atp.) byly vyhodnocovány lidmi a byla vytvořen databáze. Program posléze porovnával pozorované jedince právě s touto databází. Motilita byla také vypočtena přesně na základě rozdílu poloh jedinců na jednotlivých snímcích (oba údaje byly srovnávány s daty získanými standardizovanou metodou Ramirezové *et al.* (2007)). I přes málo intenzivní a specifický pohyb schistosomul, jenž byl příčinou neúspěchu metody xWORM, se zde podařilo jejich viabilitu měřit velice přesně díky odlišnému přístupu a pokročilému softwaru. (Paveley *et al.*, 2012).

Oproti výše zmíněným metodám lze různé formy sledování motility uplatnit na jakýkoliv taxon helmintů – ovšem jen na vývojová stádia, u nichž k nějakému pohybu dochází. Velkým nedostatkem je časová náročnost při vyšším počtu vzorků a subjektivita pojetí určitých kategorií při hodnocení vlivu („slowed activity“ oproti „minimal activity“ (Ramirez *et al.*, 2007)) – to však platí pouze u prvotních přístupů k vyhodnocování motility jen pozorováním lidským okem pod mikroskopem. U technologicky vyspělejších postupů je míra subjektivit i časová náročnost značně zmenšena, na druhou stranu již nelze tyto postupy provádět v polních podmínkách a jsou i finančně náročnější (Chen *et al.*, 2020; Loghry *et al.*, 2020).

Specializovaným typem eseje pozorující pohyb je určování viability za pomoci sledování funkce plaménkových buněk. Ty jsou součástí protonefridií a zajišťují pohyb vylučované tekutiny. S jejich činností tedy souvisí udržování osmotického tlaku v těle a jejich činnost je zásadní pro život. Zároveň jsou lehce pozorovatelné i pod světelným mikroskopem dokonce bez barvení. Proto jsou vhodným a věrohodným ukazatelem viability helmintů z skupiny Neodermata.

Tato metoda může být použita jako hlavní kritérium stanovování viability, jako tomu bylo u výběru nejvhodnějšího média pro uchovávání protoskolexů *Echinococcus granulosus*. Zde byla vyhodnocena jako dostatečně vypovídající a přesnější než měření viability pomocí methylenové modři (viz níže) (Casado, Rodriguez-Caabeiro & Hernandez, 1986). Jindy k ní bylo přistupováno jako k zásadnímu kritériu při rozhodování o stavu jedinců, u kterých nebyly dostatečně průkazné patofyziologické změny a sloužila tedy jen jako doplňková metoda (Kenji, Minoru & Tohru, 1984).

Celkově je tedy metoda pozorování pohybu plaménkových buněk velice přesným a spolehlivým způsobem určování stavu zkoumaného helminta. Jejimi nevýhodami jsou však vysoká časová náročnost, neexistence spektra viability a tím pádem možnost zkreslení výsledků – rozlišuje pouze na živé a mrtvé jedince. V neposlední řadě je použitelná jen u skupiny Neodermata, jelikož u hlístic má vylučovací soustava bez plaménkových buněk.

Test pozorování inhibice příjmu potravy (LFIA, z angl. Larvae feeding inhibition assay)

Jedním z kritérií určování motility larev i dospělců parazitických hlístic je i typický pohyb svaloviny hltanu („pharyngeal pumping“). K jeho inhibici dochází (v rámci inhibice svalové aktivity obecně) při působení anthelmintika ivermektinu. Tím pádem může být i změna míry příjmu potravy považována za ukazatel viability těchto skupin. Tato informace je zjišťována pomocí kultury bakterie *Escherichia coli* pro tento účel označené fluorescenčním barvivem. Po určité době je monitorován obsah těchto bakterií ve střevě. Výsledky jsou zařazovány do čtyř skupin v závislosti na intenzitě fluorescence – podobně, jako tomu bylo u celkové motility pozorované metodou Ramirezové (2007). Tím pádem mohou být výsledky opět zkreslené individuálním přístupem vyhodnocovatele – celkově byla tato metoda použita spíše jako kontrola klasické eseje zkoumající motilitu a dalších přístupů (Geary *et al.*, 1993; Jackson. & Coop, 2000; Alvarez-Sánchez *et al.*, 2005).

In vivo metody

Pitva

Nejpřímějším způsobem, jak se přesvědčit např. o vlivu anthelmintika či vakcíny podávané definitivnímu hostiteli na viabilitu helmintů v něm žijících, je po určité inkubační době hostitelský organismus usmrtit a provést pitvu (Allen, 1928; Chandler, 1932). Při porovnání počtu jedinců (tzv. parazitární zátěže – z angl. parasite burden) u kontrolních hostitelů a hostitelů podstoupivších léčbu či vakcinaci lze pozorovat změnu velikosti populace helmintů a z toho odvodit i změnu fitness. Nároky na zkušenosti examinatora, etická stránka, náklady spojené s chovem hostitelů a nereproducibilita spojená s chybou malých čísel, jakož i vznik přesnějších, rychlejších a všeobecně efektivnějších metod zařazuje pitvy mezi méně používané metody, ačkoliv jsou stále v malé míře používány (Sutherland *et al.*, 1997). Navíc je zde viabilita brána spíše jako vlastnost celé populace parazita v hostiteli a na úrovni jedinců není zjišťována. To předurčuje využití spíše ve veterinární praxi. Pro bližší zkoumání mohou být jedinci izolovaní z těla hostitele podrobeni např. zkoumání patomorfologických změn či extrakci vajíček a provedení EHA, aby bylo zjištěno více o viabilitě jednotlivých helmintů.

Metoda pozorování počtu vylučovaných vajíček (FECRT, z angl. Feces Egg Count Reduction Test)

Neinvazivní alternativu k pitvám představuje sledování fluktuací počtu vajíček vylučovaných spolu se stolicí hostitele. Změny v kvantitě vajíček naznačují změny velikosti populace dospělých stadií či jejich fertility. Většinou se využívá ve spojitosti se zjišťováním odolnosti parazitů hospodářských zvířat vůči anthelmintikům (Martin, Anderson & Jarrett, 1989; McKenna, 1996), ačkoliv samotná podstata nebrání využití této metody u všech parazitů, jejichž vajíčka opouští hostitele tímto způsobem. Vzhledem k tomu, že jsou počty vajíček vyhodnocovány pod mikroskopem lidským okem, mohou vznikat chyby zapříčiněné lidskou nepřesností. Taktéž je málo citlivá při nízkých hodnotách rezistence daného kmene k anthelmintikům – při zmenšení počtu vajíček na méně než 25% původní hodnoty jsou získané výsledky statisticky nevěrohodné (Martin, Anderson & Jarrett, 1989).

2.2 Mikrokalorimetrie

Principem této metody je měření tepla, které je produkováno parazitem při metabolických dějích (Wadsö & Goldberg, 2001). Jak klesá viabilita, objem metabolismu se snižuje a úměrně k tomu klesá i vyrobené teplo. Podstata této metody zajišťuje její využitelnost napříč všemi druhy parazitických helmintů – jediným omezením je velikost jedince, který se musí vejít do nádobky v přístroji.

Jedním z využití potvrzujících dobré kvality této metody je studium viability dospělců a schistosomul *S. mansoni* pod vlivem několika různých anthelmintik. Metoda nejenže ukázala postupný pokles velikosti tvořeného tepla, ale i motility vlivem toho, jak účinná látka působila a helmint umíral. Motilita byla vypočtena z jevu vyskytující se při mikrokalorimetrických esejích označovaného jako „náhodné oscilace“ (z angl. „random oscillations“) (Manneck *et al.*, 2011). Citlivost přístroje zaznamenává i výkyvy tepla spojené s kontrakcemi svalů, které ale nejsou běžným mikroskopem pozorovatelné. Kvůli tomu byla schistosomula vyloučena z klasické eseje zjišťující motilitu (Rinaldi *et al.*, 2015). Obdobně kladné výsledky s vysokou citlivostí při práci s dospělci *Ancylostoma ceylanicum* a *Necator americanus* popisuje i Tritten *et al.* (2012).

V porovnání s klasickou motilitní esejí však mikrokalorimetrie neuspěla při měření viability L3 *A. ceylanicum* - u dospělých stadií bylo třeba do jedné nádobky umístit více jedinců najednou pro získání stabilního a dostatečně silného signálu. Ani při zvýšení počtu L3 larev v nádobce se však měření nepodařilo. Na vině je dle autorů nejspíše chyba v kalibraci přístroje či nižší metabolická aktivita tohoto vývojového stádia ve srovnání s dospělci. I po stimulaci světlem a zvýšení počtu larev byly hodnoty tepla pod detekčním limitem přístroje. Kvůli tomu však byla mikro- i nanokalorimetrie (principiálně stejná metoda, jen s vyšší citlivostí a nižším rozsahem monitorování změn teploty) vyhodnocena jako méně citlivá než pozorování motility pod mikroskopem. To by bylo možno považovat za hlavní nevýhodu této metody – nutnost naprosto přesné, časově náročné kalibrace a s ní spojené vysoké nároky na profesionální úroveň obsluhy, jakožto i vysoká pořizovací cena. Zároveň je velice důležité pracovat v přísně aseptických podmínkách, neboť metabolická aktivita případných mikroorganismů by nepříznivě ovlivnila přesnost výsledků měření (Tritten, Braissant & Keiser, 2012). Dalším problémem

nastávajícím při dlouhodobějším měření (více než dva dny) je umělé snižování viability zřejmě kvůli úbytku kyslíku – tento fenomén byl pozorován při pokusu aplikovat mikrokalorimetrii na dospělých *Fasciola hepatica* (Manneck *et al.*, 2011). Řešením je tedy zvýšení koncentrace anthelmintik (za předpokladu, že je fyziologicky relevantní) aby účinky nastupovaly rychleji a hypoxie neměla na parazity vliv.

2.3 Měření hodnot koncentrací metabolitů parazita

Další z možností, jak monitorovat životaschopnost helmintů, je pozorování činnosti jejich enzymů. To lze buď provádět přímo přidáním látek, jež budou enzymy přeměněny na látky jiné a změna bude nějakým způsobem detekovatelná (např. rozdíl barvy výchozích látek a produktů - viz kapitola 4), nebo nepřímo, a to detekcí přirozených produktů metabolismu. Cílem této kapitoly není vyjmenování všech detekovatelných metabolitů, neboť je jich nepřehledné množství, ale zdůraznění těch, které byly v helmintologii spolehlivě využity.

Laktát

Koncentraci laktátu, jakožto koncového produktu anaerobního katabolismu glukózy některých parazitických helmintů (Tielens, 1994), je možno monitorovat pomocí fluorometrických enzymových esejí. Takto byla zkoumána viabilita dospělců i schistosomul *S. mansoni* ve snaze najít alternativu k morfologickému zkoumání viability. Hledaná metoda by měla být rychlejší a zároveň přesnější. Navíc je tento postup už mimo parazitologii zavedený a adaptace na jiné modelové helminty není obvykle složitá (Howe *et al.*, 2015; Macháček *et al.*, 2020). Problém s měřením koncentrace vyloučeného laktátu se však může objevit při odstraňování supernatantu k jeho analýze – celý postup zpomaluje nutnost vyhnout se nasátí schistosomula, jehož přítomnost by v dalších krocích znehodnotila výsledky (Aguiar *et al.*, 2017).

Měření koncentrace laktátu byla využita i při zjišťování vlivu oxidu dusnatého - NO na viabilitu schistosomul *Trichobilharzia regenti* (Macháček *et al.*, 2020). Po transformaci z cercárií vykazují schistosomula jiného druhu schistosom (*S. mansoni*) různé poměry aerobního a anaerobního metabolismu v závislosti na koncentraci glukózy (Skelly, Stein & Shoemaker, 1993) – do jisté míry fungují tedy obě dráhy. Experimentální působení NO na schistosomula *T. regenti in vitro* však zvýšilo koncentraci laktátu. NO má tím pádem zřejmě vliv na některou ze součástí aerobního energetického metabolismu, proto helmint při snaze vyrobit dostatečné množství energie zvyšuje objem anaerobního metabolismu (Macháček *et al.*, 2020). Tato metoda byla kombinována s barvením methylenovou modří (viz kapitola 4.3), a proto je možné výsledky změn viability považovat za věrohodné. Možným nebezpečím v tomto konkrétním případě by mohlo být umělé snižování viability schistosomul – anaerobní metabolismus produkující laktát je mnohem méně energeticky výnosný než aerobní metabolismus. Při nahrazování ztrát způsobených snížením objemu aerobního metabolismu musí tedy schistosomulum zpracovat daleko více molekul glukózy než by potřebovalo bez přítomnosti NO. V hostiteli by nebyl neustálý přísun glukózy krví problém, ale *in vitro* chovaná schistosomula mohou

vyčerpat zásoby glukózy z média a tím pádem zemřít dříve. Celkovým důsledkem tohoto jevu by mohlo být přisuzování molekulám s podobným účinkem jako NO, tedy inhibitorům aerobního energetického metabolismu, vyšší vliv na viabilitu helmintů, než tomu je *in vivo*.

ATP

Nedílnou součástí energetického metabolismu všech buněk je ATP. Bez rozdílu se objevuje i v odvozených energetických metabolismech parazitů. Metoda je dostatečně etablovaná v jiných odvětvích biologie podobně jako měření koncentrace laktátu a je druhově univerzální i rychlá. Principem tohoto testu je přidání enzymu luciferázy a molekuly luciferinu. Luciferáza je ATP-dependentní oxidáza, která přeměňuje luciferin na oxoluciferin, jenž vydává detekovatelné světlo (McElroy & Green, 1956).

Tato metoda byla zkoušena jako jedna z nových, výkonnějších možností pro zjišťování viability tasemnic rodu *Taenia*. Konkrétně u metacestodů *Taenia crassiceps* byly monitorovány koncentrace ATP v supernatantu a činnost dalších enzymů (viz níže). Na rozdíl od esejí zaměřujících se na enzymatickou aktivitu se u koncentrací ATP nenašla žádná významná změna po vystavení cyst anthelmintikům (Mahanty, Madrid & Nash, 2013). Příčinou nezdaru může být, že jako klidové stadium má cysta malý objem energetického metabolismu – tak malý, že citlivost klasické ATP esej je nedostatečná. Řešením by mohlo být zvolit jiné stadium, u něhož je energetický metabolismus aktivnější, nebo zvýšit počet cyst v jedné reakční nádobě, aby se koncentrace ATP v supernatantu zvýšila na detekovatelnou úroveň.

Naopak ATP esej prováděná na schistosomulech *S. mansoni* vykazovala statisticky velmi stabilní výsledky, což se intenzity vyzáření světla vzhledem k počtu zkoumaných jedinců i vlastního zjišťování viability týče – data porovnávána např. s těmi získanými s použitím FDA/PI (viz kapitola 5) (Lalli *et al.*, 2015). Je zřejmé, že i méně aktivní vývojová stadia parazitů lze úspěšně podrobit této esej, i když schistosomula přeci jen vykazují určité pohyby, zatímco cysty (např. u výše zmíněné *T. crassiceps*) jsou v tomto směru neaktivní.

Další látky a enzymy

Současný úroveň technologie v molekulární biologii a biochemii nabízí způsoby, jak monitorovat činnost nepřeberného množství enzymů a kontrolovat koncentrace mnoha metabolitů pomocí komerčně dostupných sad.

Příkladem úspěšně použité sady tohoto typu byl výzkum viability pozorováním aktivity glukóza-6-fosfát izomerázy u tasemnice *Echinococcus multilocularis*. Společně se studiem patomorfologických změn za pomoci elektronového mikroskopu byl studován vliv velké skupiny derivátů thiazolidu na metacestody. Díky vysoké procesivitě této metody je ideální pro první fázi porovnávání účinností jednotlivých derivátů a tvorbu zúženého výběru potenciálních léčiv (Hemphill *et al.*, 2010).

2.4 Radiorespirometrie

Principem metody je sledování činnosti enzymatického aparátu spojeného s výrobou chemické energie v buňkách. Přidáním substrátu pro enzymy Krebsova cyklu (cukry, aminokyseliny, karboxylové kyseliny) s inkorporovaným ^{14}C lze pak sledovat únik $^{14}\text{CO}_2$. (Comley & Rees, 1989). Pro snadnější měření je plyn zachycován fenyethylaminem za tvorby pevného uhličitanu (Merck, 2001). Záření je posléze měřeno pomocí scintilačního detektoru (Comley & Rees, 1989).

Tato metoda byla využita při stanovování viability jednotlivých dospělých samic *Acanthocheilonema viteae* a pětic dospělých samců *Onchocerca gibsoni*. Prvním důležitým krokem byl výběr substrátu – byla zvolena karboxylová kyselina (acetát a oktanoát), cukr (D-glukóza) a aminokyselina (glutamin). Poslední jmenovaná látka byla shledána jako nejvhodnější, neboť u ní jediné bylo možno pozorovat lineární vzestup počtu rozpadů za minutu a hodnoty u jednotlivých jedinců se nejvíce podobaly. S tímto zjištěním byla druhá fáze experimentu, totiž vliv antifilaritik na produkci $^{14}\text{CO}_2$ prováděna pouze s tímto substrátem. Ve srovnání s výsledky získanými pomocí redukce MTT (viz kapitola 4) se tato metoda ukázala přesnější. Důležité bylo zjištění, že i homogenát ze zmíněných helmintů má rovněž schopnost vytvářet $^{14}\text{CO}_2$, i když v menší míře – tím bylo rozšířeno potenciální druhové spektrum využití, neboť u některých druhů (např. *O. volvulus*, *O. gibsoni*) je téměř nemožné získat k experimentu živou samici (Comley & Rees, 1989). Zkoumání homogenátu z mrtvých jedinců může být využito např. ke studiu účinnosti anthelmintik fungujících jako inhibitory enzymů.

Na rozdíl od výše zmíněných postupů monitorujících vždy činnost pouze jednoho konkrétního enzymu či jejich skupiny provádějící podobnou činnost je tato metoda daleko komplexnější. Nejenže výsledky vypovídají o procesivitě enzymů Krebsova cyklu (v němž vzniká CO_2); v závislosti na druhu přidaného substrátu s ^{14}C se do procesu zpracování zapojuje i mnoho dalších enzymů (např. enzymy spojené s β -oxidací karboxylových kyselin). Se správně zvolenou kombinací substrátů značených ^{14}C lze tedy např. přesně určit místo, kde působí léčivo. Tato metoda má však i negativní stránky, totiž snižování viability zkoumaných jedinců při delší inkubaci s aktivním zdrojem záření, nutnost dodržování speciálních opatření na k tomu určeném a certifikovaném pracovišti se speciálním vybavením, postupné snižování aktivity zářiče během času a omezená dostupnost substrátů s inkorporovaným ^{14}C . Tak, jak je metoda popsána, je také využitelná jen pro zkoumání viability helmintů při aerobních podmínkách – při anaerobních podmínkách je v závislosti na taxonu helminta energetický metabolismus změněn a CO_2 produkován není.

3 Metody monitorující integritu membrán helminta

3.1 Neutrální červeň (toluylene red)

Neutrální červeň (NR, z angl. neutral red) je derivátem fenazinu a je využívána jako vitální barvivo. Nedisociovaná proniká do buněk – až zde dochází k disociaci z důvodu snížení pH na hodnoty nižší než 7 (Borenfreund & Puerner, 1985). Pro kationt je cytoplasmatická membrána (CPM) již

neprostupná a ten zůstává tedy v buňce. Zde barví především lyzozomy, do nichž proniká kvůli zvýšené koncentraci záporně nabitých molekul (Winckler, 1974). U mrtvých buněk s porušenými membránami (například po prodělané autofágii) rozdíl pH mezi vnitřním a vnějším prostředím mizí; tyto buňky tedy obsahují méně barviva. Intenzitu zbarvení lze posléze vyhodnotit jak spektrofotometricky, tak i pouhým okem (zde ovšem vyvstává nebezpečí subjektivního hodnocení).

Role neutrální červeně při výzkumu tasemnic byla napoprvé jen okrajová – při výzkumu *in vitro* indukovaného vývoje onkosfér v metacestody (konkrétně šlo o druhy *E. granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis*, *Taenia pisiformis* a *Taenia serialis*) byla použita pro kontrolu účinnosti aktivačního roztoku. Aktivní jedinci opustivší onkosféru byli zbarveni červeně, mrtví jedinci modře za použití trypanové modři (TB z angl. trypan blue; viz níže). Hlavní účel této práce však nespočíval v přesnějším určování viability, proto nebylo NR věnováno více prostoru (Heath & Smyth, 1970).

Další práce si dala mimo jiné za cíl porovnat několik metod zjišťování viability onkosfér tasemnice *T. solium*. Přesnost výsledků zde byla klíčová, neboť se experiment zabýval možností použití činčily vlnaté (*Chinchilla lanigera*) jako možného laboratorního definitivního hostitele těchto parazitů. Bylo tedy nutné posoudit, zda je tento druh pro tyto účely vhodný – zda dospělci dokáží dospět a tvořit dostatečné množství životaschopných vajíček. Jako jedna z metod měření viability onkosfér byla využita i NR. Oproti výsledkům získaným při použití TB či propidium jodidu (PI) se nicméně toto barvení ukázalo jako méně přesné, navíc se při inkubaci objevovaly krystaly, které znemožňovaly pozorování vlastních onkosfér (Maravilla *et al.*, 2011). Vzniku krystalů však lze předcházet filtrací roztoku před jeho použitím (Ates *et al.*, 2017).

Otázkou stanovování viability vajíček *S. mansoni* s použitím několika různých metod se zabývali Sarvel *et al.* (2006). Mezi jinými zkoušeli i kombinace NR/TB. Jako kontrola výsledků sloužilo ohledání patomorfologických změn vajíček. Obě látky ovšem barvily stejně jak živá, tak i mrtvá vajíčka – kvůli tomu bylo rozhodnuto o nevhodnosti tohoto přístupu ke stanovování viability vajíček *S. mansoni* (A. K. Sarvel *et al.*, 2006).

Obdobný pokus, totiž stanovování viability vajíček, tentokrát ovšem u druhu *Schistosoma haematobium*, byl proveden později, přičemž výsledky použití kombinace TB/NR se ne zcela shodovaly s předchozím experimentem, Metodika eseje (koncentrace barviv i doba inkubace) byla však převzata od Sarvel *et al.* (2006). Lepších výsledků však dosáhlo barvení s pomocí TB (Forson *et al.*, 2019), proto bude o případných důvodech tohoto rozporu pojednáno v příslušné kapitole níže.

Jako jedna z metod zjišťování viability u dospělců *S. mansoni* byla použita i NR – cílem bylo ověřit využitelnost nefluorescenčních barviv. I přes počáteční problémy s příliš vysokou koncentrací NR byla posléze tato metoda shledána užitečnou. Ukázala totiž specifická místa působení některých účinných látek, které byly použity. Konkrétně artesunát a amodiakvin měly výrazný vliv na trávicí ústrojí samic (Mitsui & Kato, 2018). U kontrolních jedinců tohoto pohlaví byla totiž střeva oproti zbytku těla tmavší (zřejmě v důsledku zvýšeného množství lyzozomů ve střevních buňkách ve spojitosti s trávením), u samic inkubovaných s výše zmíněnými anzhelmintiky bylo střevo naopak světlé. Zajímavá

je paralela se samci, u nichž se tento účinek neprojevil (Mitsui & Kato, 2018). To může být způsobeno buď odlišnou rezistencí samců a samic na účinné látky, nebo lidskou chybou při provádění experimentu. Tato práce je totiž poněkud zvláštní výsledky získanými za pomoci jiných přístupů (methylenová modř (MB) je nevitální barvivo, přesto však byli prokazatelně živí jedinci obarveni – princip viz kapitola 5). NR každopádně ukázala určité zajímavé detaily – i kdyby mělo jít jen o artefakty vzniklé ne zcela zdařilou aplikací barviva, ukázalo se alespoň, že NR je schopna pronikat syncytiálním tegumentem na povrchu dospělců *S. mansoni* a není tedy *a priori* nevhodná pro další experimenty v tomto poli.

Ačkoliv se tato metoda v žádném z výše uvedených experimentů přímo neosvědčila, je na místě zmínit několik faktorů, které autory článků nebyly brány v potaz. Winckler (1974) upozorňuje na úskalí v podobě nutnosti optimalizace koncentrace a doby inkubace NR v závislosti na typu tkáně a stáří jedince. Komerčně dostupné sady obsahující NR jsou také primárně určeny pro využití při práci s jednobuněčnými organismy či jednotlivými buňkami, což by také mohlo zapříčinit ne zcela uspokojivé výsledky při aplikaci na mnohobuněčné parazity. Nutno podotknout, že výsledky, teoreticky získané po takto náročné optimalizaci metody pro konkrétní druh a vývojové stadium zkoumaného helminta, by pravděpodobně byly srovnatelné s daty získanými snadnější cestou pomocí jiných metod.

3.2 Kongo červen

Strukturně spadá Kongo červen (CR, za angl. Congo red) mezi azosloučeniny. Prostupuje intaktní CPM a funguje jako pH indikátor – živé buňky, jejichž pH se pohybuje kolem 3, zbarvuje do světle modra, ale pokud se pH zvýší (např. kvůli vyrovnání podmínek vně a uvnitř buňky v důsledku vzniku trhlin v CPM), barva se změní na oranžovočervenou. Svou strukturou je však potencionálně nebezpečná, neboť její metabolity, karcinogenní aromatické aminy – např. 1-amino-2-naftol (Chandanshive *et al.*, 2017) mají prokazatelně toxický vliv na živé organismy (Bonser, Clayson & Jull, 1963).

CR byla využita jako metoda pro stanovování viability vajíček a miracidii motolice *S. mansoni*. Miracidia, jak vylíhnutá, tak i ve vajíčkách, u nichž byl pozorován pohyb cílů, byla skutečně obarvena světle modře; miracidia, jejichž cíle se nehýbaly a byla proto označena jako mrtvá, pak červeně. Rozdíly v hodnotách pH byly ověřeny pomocí bromothymolové modři, což je další pH indikátor s rozdílným rozmezím změny barev (pH 6 – 7,6). Skutečně bylo dokázáno, že mrtvá miracidia mají pH průměrně okolo 3, zatímco živá okolo 7 (resp. stejné jako médium) (Sung & Dresden, 1984) – to by mohlo značit poruchy intaktnosti CPM jako příčinu smrti miracidii. Vajíčka s živými embryi a motilními miracidii byla taktéž zbarvena modře, zatímco u nedovyvinutých vajíček nebo těch obsahujících mrtvá miracidia nedošlo k jakémukoliv obarvení – to podle autorů může naznačovat nutnost aktivního transportu barviva přes membránu vajíčka (Sung & Dresden, 1984). Metoda je zde popisována jako spolehlivá, rychlá a využitelná pro tento účel – problém by ale mohl nastat při nutnosti identifikace mrtvých a živých vajec bez přítomnosti vylíhnutých miracidii. Vajíčko se totiž jeví v mikroskopu jako světle žluté a světle modré zbarvení v něm není a první pohled výrazně patrné. Proto by u méně zkušených výzkumníků

mohlo dojít k nesprávnému odečtení počtu mrtvých a živých vajíček a v důsledku i ke zkreslení výsledků experimentu.

U schistosomul *S. mansoni* však CR neobstála – nepodařilo se ani po prodloužené době inkubace obarvit jak živé, tak ani mrtvé jedince, a proto bylo od této metody v tomto experimentu dále upuštěno (Gold, 1997). Na vině bude nejspíše velké množství přidaného barviva a příliš dlouhá doba inkubace, neboť se stejnými problémy se Sung a Dresden (1984) nesetkali. Dalším důvodem může být i rozdílná stavba tegumentu cercárií a schistosomul (Hockley & McLaren, 1973; Pan, 1980).

Obdobně byla CR využita i při výzkumu viability vajíček *A. lumbricoides*. Dokázala odlišit živá a mrtvá vajíčka, ale statisticky nebyla tak spolehlivá jako např. TB, a proto nepostoupila do užšího výběru testovaných metod (De Victorica & Galván, 2003).

CR je využitelná při rozlišování živých a mrtvých vajíček motolic a parazitických hlístic, ale kvůli výše zmíněné karcinogenitě metabolitů je lepší je nahradit jinými metodami např. Hoechstovými barvivy (viz Kapitola 5.3).

3.3 Trypanová modř (diamine blue, Niagara blue)

Stejně jako CR patří i Trypanová modř (TB, z angl. trypan blue) mezi azobarviva. Kvůli své vysoké molekulární hmotnosti ($873 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) a zápornému náboji nemůže pronikat přes intaktní membránu (Yang & Hinner, 2015). Teprve po vzniku větších pórů (a tedy i po smrti buňky) se dostane dovnitř a buňku tak zbarví modře (Sampson, 1924). Vyhodnocování posléze probíhá vizuální kontrolou pod světelným mikroskopem či pomocí spektrofotometru. TB bývá často využívána jako nevitální barvivo v kombinaci s dalším vitálním barvivem (podobně jako FDA/PI, viz níže), aby tak výsledky obou esejí daly dohromady přesnější výsledky.

V již výše zmíněném experimentu s činčilami jako definitivními hostiteli několika druhů tasemnic byla jako další metoda využita právě TB. Dosáhla daleko přesnějších výsledků než další nefluorescenční barviva a na rozdíl od NR nevytvářela nežádoucí krystaly (Maravilla *et al.*, 2011)

Schopnost prasečích anti-GK-1² protilátek aktivovat komplement při styku s cysticerky tasemnice *Taenia crassiceps* a vliv takto vzniklé odpovědi na viabilitu těchto vývojových stádií byla testována mimo jiné i pomocí TB v kombinaci s pozorováním motility. Po určité době od podání vakcíny byla pokusným vepřům odebrána krev, z níž byly izolovány protilátky. Ty pak byly přidány k cysticerkům spolu s komerčně dostupným komplementem a adjuvans. Jako kontrolní skupiny pak sloužily cysticerky inkubované bez komplementu či bez komplementu a protilátek, jen s adjuvans. Výsledky TB esejí zde sloužily jako kontrola jiné, hlavní metody, totiž měření koncentrace cytochromu c v supernatantu. I přes jednodušší princip byla přesnost barvení trypanovou modří srovnatelná s hlavní metodou (Núñez *et al.*, 2018).

² GK-1 je jeden z peptidů, jenž je exprimován různými vývojovými stádií tasemnice *T. solium*, a tvoří jeden z epitopů rozeznávaných imunitním systémem hostitele. Spolu s dalšími peptidy tvoří účinnou součást vakcíny proti cysticerkóze prasat (Huerta *et al.*, 2001).

Z důvodu nutnosti zavést snadno standartizovatelnou metodu určování viability vajíček *S. haematobium* získaných filtrací moči byl proveden pokus barvit je pomocí TB. Metoda se ukázala být velice vhodnou pro tento typ využití, neboť oproti EHA se proces značně urychlil (kratší doba inkubace a snadnější počítání vajíček na filtru). TB spolehlivě barvila vajíčka i miracidia zabítá mrazem, zatímco životaschopným vajíčkům pouze lehce obarvila svrchní vrstvu. (Feldmeier *et al.*, 1979) Důvodem, proč se nepodařilo opakovat Feldmeierův úspěch může být v případě Sarvelové (2006) jiný druh schistosomy, hlavně však nebyla stejná doba inkubace vajíček s TB (30 min u Feldmeiera, 5 min u Sarvelové, a později i u Forsona (2019)). Jak je tedy zřejmé, metoda je za správných podmínek k vyhodnocování viability vajíček rodu *Schistosoma* vhodná.

Vliv běžných dezinfekčních prostředků používaných v drůbežářském průmyslu na vajíčka a embrya hlístice *Heterakis gallinarum* byl sledován pomocí barvení TB; jako kontrola sloužilo pozorování motility uměle vylíhnutých embryí. Při barvení se ukázalo, že při použití určité dezinfekční látky se vajíčka zdála obarvená, ale ve skutečnosti TB obarvil pouze vnější vrstvu. Umělému snižování viability se předešlo přidáním jednoho kroku promývání. Jinak se ovšem metoda osvědčila jako vyhovující svému účelu (Cupo & Beckstead, 2019).

Jednou z metod pro výzkum různé rezistence kmenů hlístice *Dirofilaria immitis* proti makrocyclickým laktonům bylo i využití TB (Jesudoss Chelladurai *et al.*, 2020). U všech tří sloučenin (ivermektin, selamektin a milbemycin oxcin) bylo dle hodnot absorbance zřetelné, že kmen Missouri je vůči makrocyclickým laktonům citlivý, zatímco ostatní kmeny mají rezistenci. TB byla tedy shledána jako látka zcela vyhovující nastaveným podmínkám, navíc jako jedna z mála dokázala tato metoda odlišit jednotlivé kmeny mezi sebou i bez přidání jakékoliv účinné látky jen na základě lišící se míry obarvení exkrečně-sekrecních produktů (Premachandran *et al.*, 1988) což v důsledku přineslo změnu absorbance supernatantu. Tyto změny byly však méně výrazné než po účinných látek (Jesudoss Chelladurai *et al.*, 2020).

Trypanová modř byla v kontrastu s NR využitelnou metodou všech aplikací. Jako příčina může být jednodušší mechanismus působení, jenž není natolik náchylný k tvorbě lidských chyb jako u výše zmíněného vitálního barviva. Připočteme-li krátkou dobu inkubace, rozpustnost ve vodě, přesnost výsledků, minimální náklady na vyhodnocování výsledků a univerzálnost využití v rámci helmintologie, i přes stáří metody jde stále o jednu z nejlepších. Nevýhodou je zřejmě jeho struktura obdobně jako u CR (Kapitola 3.2) jde o azobarvivo, jehož metabolity mohou být toxické nebo karcinogenní.

3.4 Eosin

Pod označením eosin (EO) se objevuje skupina látek, derivátů fluoresceinu. Nejběžněji jsou používané látky eosin-Y (EOY) a eosin-B (EOB). V obou případech se jedná o nevitální barviva, která z důvodu svého záporného náboje neprostupují intaktní CPM – obdobně jako TB.

Viabilita tetrathyridií tasemnice *Mesocostoides vogae* byla zkoumána mnoha způsoby ve snaze nalézt alternativu k pouhému vyhodnocování posmrtných morfologických změn. Mimo jiné (viz níže)

bylo zkoušeno i využití EO, který se velice osvědčil – navzdory dlouhé době inkubace s živými jedinci je neobarvila a barva se z mrtvých, obarvených jedinců nevymývala po přidání rozpouštědla. Celkově byla metoda vyhodnocena jako velice rychlá, přesná a plně vyhovující požadavkům vzneseným jako cíl experimentu (Fabbri & Elissondo, 2019).

Při zjišťování viability schistosomul *S. mansoni* pomocí barvení byl mimo jiné (viz níže) využit i EO. Navzdory dlouhé době inkubace však schistosomula obarvit nedokázal, proto byl odmítnut a dále se s ním nepracovalo (Gold, 1997).

Pokles viability oplozených vajíček *A. lumbricoides* během inkubace s kyselinou octovou byl též zkoumán pomocí EO. V roztocích s předem danou koncentrací byl sledován čas, za který se obarví všechna vajíčka, tedy dobu potřebnou k dezinfekci zeleniny, než bude bezpečné ji konzumovat. Na základě těchto experimentálních dat vznikla rovnice, s jejíž pomocí lze vypočítat dobu nutnou k bezpečné dezinfekci za použití komerčně dostupných koncentrací octa. Podle všeho metoda fungovala adekvátně ke svému účelu (Beyhan, Yilmaz & Hokelek, 2016). Autoři ovšem neuvádí přesný typ ani výrobce EO, stejně tak ani objemy přidávaných roztoků kyseliny octové. Mohl by však nastat problém při její nejnižší koncentraci – ta byla jen desetkrát vyšší než koncentrace EO. Eosin-Y má $pK_{a1} = 2,0$, $pK_{a2} = 3,8$. Je tedy silnější kyselinou než acetát ($pK_a = 4,75$), tudíž by teoreticky mohl ovlivnit koncentraci acetátových iontů v roztoku a domněle snížit účinnost roztoku na viabilitu vajíček.

Látky EOB a EOY se poměrně osvědčily v roli nevitálního barviva – jediným problémem by mohla být již výše zmíněná vysoká kyselost, zvláště v malých reakčních objemech.

3.5 Deriváty fluoresceinu

Látkami využívanými k zjišťování viability parazitických helmintů patřícími do této skupiny jsou kalcein acetoxymethyl ester (CAM) a fluorescein diacetát (FDA) společně s karboxyfluorescein diacetát (C-FDA). Tyto prekurzory vstupují přes CPM do buněk, v nichž jsou činností cytosolických esteráz přeměněny ve výsledný produkt. U FDA a C-FDA jde o fluorescein (3',6'-dihydroxy-3H-spiro[2-benzofuran-1,9'-xanthen]-3-on), u CAM o kalcein (CAL). Tyto produkty již z buňky nemohou samovolně vystoupit a díky své fluorescenci jsou detekovány (Rotman & Papermaster, 1966; Gutiérrez *et al.*, 2017).

C-FDA byl při zjišťování viability schistosomul *S. mansoni* považován za nespolehlivý kvůli úniku této látky do prostředí. Problém bude nejspíše v nevhodně zvoleném médiu (Van Der Linden & Deelder, 1984), neboť vzhledem k principu fungování metody látka unikát nemůže – fluorescein neprojde přes neporušenou CMP. Pokud by však k jejímu porušení došlo, buňka by byla obarvena i nevitálními barvivy, což autoři nepopisují.

Problematicke „Helmith Fluorescence Bioassay“ (HFB) bude věnován odstavec v kapitole o derivátech fenanthridinu. Zatímco propidium jodid (PI; viz kapitola 5.1) nevykazoval při použití žádné negativní vlastnosti, u FDA se určité problémy vyskytly. Šlo zejména o arteficiální zvyšování intenzity fluorescence bez přítomnosti živých buněk (Peak, Chalmers & Hoffmann, 2010). To může být

zapříčiněno samovolnou hydrolýzou esterové vazby. Míra těchto arteficiálních reakcí závisí na obsahu některých látek (Tris-HCl, trypton, pepton) v tekutém médiu (Clarke *et al.*, 2001). Další možností vzniku tohoto fenoménu jsou reakce s esterázami uniknuvšími do média po prasknutí CPM. Další nevýhodou oproti PI je rychlejší nástup plató fáze fluorescence – měření tedy může probíhat jen po kratší dobu (Peak, Chalmers & Hoffmann, 2010).

I přes nedostatky a omezení v podobě nutnosti inkubace helmintů v médiích s obsahem tryptonu, peptonu a Tris-HCl je role těchto barviv důležitá. Jsou totiž jediná vitální fluorescenční barviva. Fluorescenční značení je výhodou při interpretaci výsledků a zajišťuje vyšší přesnost měření. I přes výše zmíněné nevýhody mají tedy stále místo ve výzkumu viability helmintů.

3.6 Alkylaminofluorescein

Alkylaminofluoresceiny jsou rovněž deriváty fluoresceinu, ale kvůli odlišnému principu jejich využití jsou popsány zvlášť. Na jejich kostru je přes aminoskupinu připojen dlouhý hydrofobní řetězec, který je inkorporován do lipidové dvouvrstvy membrán. U takto fluorescenčně značených membrán pak lze monitorovat jejich celistvost jakožto i další vlastnosti (viz níže). V helmintologickém výzkumu byl využit derivát s osmnáctiuhlíkatým zbytkem (5AF).

Tato látka byla využita při výzkumu vlivu polakationtů na membrány různých vývojových stádií *S. mansoni*. Pokud jsou membrány neporušeny, 5AF se může dostat jen do vnější vrstvy lipidů. Při působení polykationtů byl pozorován i snížený odběr 5AF z supernatantu, což odhalilo mechanismus účinku působení těchto látek na membrány *S. mansoni* – zabraňují přijímání lipidů z okolí, čímž zamezí zvětšování povrchu helminta a zpomalí či zastaví jeho růst (Jones, Helm & Kusel, 1988).

5AF je zajímavou alternativou k ostatním metodám zjišťujícím intaktnost membrán helmintů – díky principu této metody mohou být studovány interakce účinných látek a imunitního systému přímo na membránách, což pomůže k zjištění např. epitopů rozpoznávaných imunitním systémem.

4 Metody monitorující redoxní schopnosti buněk helminta

Metody, které se objevují v této kapitole, jsou všechny založeny na rozdílných vlastnostech výchozích látek a produktů redoxních reakcí. Tento typ reakcí je typický pro děje probíhající v trámci energetického metabolismu buněk. Helminti, jejichž životní cyklus probíhá více či méně v hypoxickém až anoxickém prostředí, musí však využívat při výrobě energie upravené metabolické dráhy, aby kompenzovali právě nedostatek kyslíku jakožto finálního akceptoru elektronů. Existují v zásadě dva přístupy, které se u helmintů objevují – prvním je anaerobní glykolýza u schistosom a filarií, při níž vzniká ethanol nebo laktát. Následuje kaskáda reakcí, která končí u systému I elektrontransportního řetězce (Tielens, 1994). Druhou formou je malátová dismutace, při níž z cytosolického malátu, produktu glykolýzy, vzniká v mitochondriích acetát a sukcinát či propionát. Redoxní reakce acetátu se sukcinátem

či propionátem poté regeneruje NADP⁺. Aby tento systém fungoval, musí existovat molekula, jež přenáší elektrony mezi systémem I a II elektrontransportního řetězce (Köhler, 1991; Tielens, 1994). Nelze ovšem tvrdit, že vstupem do hostitele se celý energetický metabolismus změní z aerobního na anaerobní. Konkrétně u *S. mansoni* se poměr anaerobního a aerobního metabolismu mění během migrace na definitivní místo lokalizace, vždy se však aspoň v určité míře objevují oba typy. Hraje v tom roli lokalizace a s ní související rozdílný obsah O₂ či glukózy např. v plicích a v játrech (van Oordt, Tielens & van den Bergh, 1988; Tielens, 1994).

4.1 Skupina monotetrazoliových solí

Monotetrazoliové soli či jejich dimery jsou často využívány k zjišťování cytotoxicity xenobiotik (Berridge, Herst & Tan, 2005). Strukturu těchto sloučenin lze tedy obecně popsat jako jeden tetrazolový kruh substituovaný v polohách 2, 3 a 5 třemi aromatickými cykly, většinou deriváty benzenu (Berridge, Herst & Tan, 2005). Substituenty na aromatických kruzích nebo záměna celého fenylderivátu za thiazolyl pak určují rozdílnost vlastností konkrétních sloučenin. Pokud jsou substituenty na hlavním kruhu nenabitě, umožňuje kladný náboj na dusíku 3 celé molekule dobře proniknout CPM – tak je tomu např. u MTT substituované na poloze 2 a 5 fenylem, na poloze 3 thiazolyem (Berridge, Herst & Tan, 2005). Oproti tomu jiné soli, např. XTT, jsou substituovány na pozicích 2 a 3 záporně nabitým 2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenylem (Berridge, Herst & Tan, 2005). Celá molekula pak dostává záporný náboj, k prostupu CPM nedochází, a tím se zcela mění princip interakce tetrazoliové soli s buňkou (viz níže).

Základním principem zjištění viability zkoumané buňky, potažmo helminta, je redukce tetrazoliové soli a vznik formazanu (Al-araji, Shneine & Ahmed, 2015). Kvůli výše zmíněné rozmanitosti způsobené rozdíly v chemické struktuře různé tetrazoliové soli reagují s různými redukčními činidly intracelulárně nebo extracelulárně. Taktéž vzniklé formazany mají odlišnou rozpustnost ve vodě. Tyto odlišné vlastnosti předurčují jednotlivé soli k rozdílným uplatněním, dále však budou s ohledem na téma práce uvedeny pouze sloučeniny použité u helmintů.

Tvorbu formazanů lze pozorovat jak *in situ* ve tkáních parazita, tak spektrofotometricky v médiu. Pokud formazany vznikají, je jasné, že elektrontransportní řetězec funguje a buňka není mrtvá. Výhodou je kvantitativnost metody, tedy přímá úměrnost mezi množstvím vzniklého formazanu a počtem jedinců, u nichž je viabilita zjišťována. Z koncentrace formazanu stejně velké kontrolní populace tedy můžeme poměrově zjistit snížení viability experimentální populace (Mosmann, 1983; Comley *et al.*, 1989).

První generace tetrazoliových solí

MTT

První test využívající MTT byl u helmintů proveden na mikrofiláriích a dospělých *A. viteae* a *Brugia pahangi*. V první fázi experimentu bylo ověřováno, zda je metoda na filárie aplikovatelná – zda

dokáží MTT vstřebat a metabolizovat a produkty pro ně nejsou příliš toxické. I po dlouhé době inkubace s tetrazoliovou solí však vzniklé formazany nepůsobily cytotoxicky. Jediným efektem bylo snížení motility u zkoumaných jedinců, aktivita enzymů energetického řetězce ovšem ovlivněna nebyla. U řezů samičími makrofiláriemi *A. viteae* bylo pozorováno nestejně rozložení vniklých formazanů v rámci těla. Nejvíce jich bylo v hypodermis a svalových buňkách, nejméně poté v buňkách trávicí a rozmnožovací soustavy. Tento fakt zřejmě souvisí s rozdílnou mírou transportu MTT do buněk různých tkání nebo s rozdílnou aktivitou enzymů elektrontransportního řetězce. Druhá fáze experimentu poté sestávala z vystavení parazitů antifilarikům a sledování vlivu těchto látek na viabilitu. Díky různé míře zabarvení tkáně poté bylo možné sledovat specifitu účinku na jednotlivé orgánové soustavy. Důležitým zjištěním u experimentů s nedospělými stadii bylo, že pro měřitelné hodnoty absorbance musí zkoumaná populace obsahovat minimálně 1000 mikrofilárií *B. pahangi* (u pokusů s makrofiláriemi *A. viteae* byla třeba k dosažení měřitelných hodnot absorbance za stejnou dobu inkubace jen jedna samice). Jinak se ale výsledky experimentů shodují s makrofiláriemi. (Comley *et al.*, 1989).

S výzkumem hlístic souvisí i experiment zaměřený na míru ovlivnění viability druhu *Onchocerca gutturosa* symbiotickými bakteriemi rodu *Wolbachia* (Townson *et al.*, 2006). Autoři se zabývají myšlenkou bojovat proti napadení lidského hostitele nematodem antibiotiky. Metodiku použití MTT využili s drobnými úpravami stejnou jako Comley *et al.* (1989). Jelikož však intracelulární bakteriální symbionti mají gen pro SDH (sukcinát dehydrogenázu) (New England Biolabs, 2005) a mohly by tedy zasahovat do výsledků MTT eseje, bylo nutno míru jejich příspěvku k energetickému metabolismu měřit odděleně. Po přidání účinných látek k jedincům *O. gutturosa* klesl celkový objem energetického metabolismu. Kvůli principu vzniku formazanů však nemůžou být vysvětleny detaily vztahu bakterií a hlístic, potažmo ani přímý důvod poklesu viability (Townson *et al.*, 2006). Na vysvětlení tohoto problému je tedy nutno zvolit metody zjišťování viability založené na zcela jiných principech. Problémem Comleyho metodiky je navíc to, že výsledná koncentrace MTT formazanu odečtená po inkubaci makrofilárií je arteficiální. Je v ní totiž zahrnut i formazan, který byl vyroben mikrofiláriemi vyloučenými do média makrofiláriemi (Mukherjee, Misra & Chatterjee, 1998). Dalším důvodem, proč mohou být výsledky této metody nepřesné, může být nehomogenní snížení viability zkoumaného jedince zapříčiněné nehomogenní koncentrací antifilarika v roztoku z důvodu jeho špatné rozpustnosti. Vinou rozdílné metabolické aktivity lokálních tkání (jev označovaný jako „variabilní viabilita“) se objevovalo nehomogenní zabarvení helmintů (Comley *et al.*, 1989).

Vliv kurkuminu na viabilitu parazitických helmintů je dlouhodobě studovaným tématem (El-Ansary, Ahmed & Aly, 2007; El-Banhawey *et al.*, 2007). Při zjišťování jeho principu účinku na dospělce *S. mansoni* a možnosti jeho případného využití jako léčiva byla využita (mimo jiné) MTT eseje (Magalhães *et al.*, 2009; de Paula Aguiar *et al.*, 2016). K monitorování změn viability byl využit tento přístup právě proto, že vznik formazanu přímo koreluje s činností mitochondrie (viz výše) a dle pozorování působí kurkumin především na tuto organelu (de Paula Aguiar *et al.*, 2016).

Jiný přístup k MTT esejí spočívá v pouhém vizuálním zhodnocení míry přeměny soli na formazan ve vajíčkách *Schistosoma japonicum* bez jejich homogenizace a následné spektrofotometrie. Nejvíce využívanou metodou byl dosud vizuální odhad viability na základě morfologických znaků vajíček. Zde se ovšem projevíly notoricky známé problémy morfologického přístupu k zjišťování viability (viz výše). Bylo zkoušeno několik různých metod odrážejících aktivitu různých enzymů (mezi jinými i NBT, viz níže), přičemž se u všech zvýšila přesnost určení živých či mrtvých vajíček oproti kontrole prováděné na základě vyhodnocování patomorfologických změn. Po inkubaci s MTT byla stanovena škála intenzity změny barev (stupně od „žádná barevná změna“ po „tmavě fialová“), pomocí níž byla jednotlivá vajíčka rozřazována na stupnici viability (Gu *et al.*, 2017).

Comley *et al.* (1989) hodnotí MTT esej jako rychlou, výhodnou s ohledem na produkci kvantitativních dat. Jako nevýhodu uvádí průměrně vyšší hodnotu mediánu efektivní koncentrace (EC₅₀, vysvětleno v seznamu zkratk). Zástupci skupiny Filarioidea byli jediní, u nichž bylo možné využít tuto esej u dospělců i mikrofilárií. U jiných hlístic (*H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Trichostrongylus axei*) se ukázalo, že kvůli rozdílné struktuře kutikuly nemůže být MTT vstřebáno a metabolizováno (Franz, 1988 dle Comley *et al.*, 1989). Odpovědí by mohlo být rozmělnění červa, neboť i materiál z čerstvě zabitých jedinců dokáže formazany tvořit kvantitativně vzhledem ke své hmotnosti (Comley *et al.*, 1989), čímž může sloužit k monitorování činnosti enzymů obdobně jako u radiorespirometrie (kapitola 2.4). Pokud jde jen o zkoumání viability helmintů, je MTT využitelnou metodou (Strote, Bokhof & Comley, 1993; Hördegen *et al.*, 2006). Je-li však obsahem experimentu vztah mezi bakteriemi *Wolbachia* a filariemi, není tato metoda průkazná, neboť ukáže jen celkový pokles objemu energetického metabolismu bez bližších informací (Townson *et al.*, 2006). U schistosom se jeví MTT esej jako spolehlivý, jednoduchý a přesný způsob zjištění viability, k němuž není třeba žádného speciálního vybavení (Gu *et al.*, 2017). Pokud je ale potřeba zjistit komplexnější vliv sloučeniny na mitochondrii, je nutno přístupy kombinovat, neboť MTT není nedostatečně specifické (de Paula Aguiar *et al.*, 2016).

NBT

Principem fungování NBT je monitorování koncentrace superoxidů, které jej dokáží redukovat (např. Bakr, 2016) – takto je monitorována nepřímou činností enzymů zodpovědných za boj proti reaktivním formám kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species). V případě detekce superoxidu lze koncentraci vzniklého formazanu analyzovat různými postupy: Buď mikroskopicky (klasické počítání buněk ztmavělých - naplněných formazanem), nebo denzitometricky (změna absorbance buněk bez nutnosti rozpuštění formazanu), popřípadě kolorimetricky (solubilizace formazanu organickým rozpouštědlem) (Hyung *et al.*, 2006).

Klasická – mikroskopická – NBT esej má značné nedostatky; malou citlivost při nízkých koncentracích intracelulárního superoxidu, nekvantitativnost a nízkou přesnost zapříčiněnou vyhodnocováním lidským okem. Z toho důvodu byly vyvinuty i další, už kvantitativní metody, které

opět pracují na principu spektrofotometrie (Hyung *et al.*, 2006). Tato metoda byla využita D. de Auguiarovou *et al.* (2016) – viz MTT.

Druhá generace tetrazoliových soli

Hlavní motivací pro syntézu těchto látek bylo získat data o změně koncentrace formazanu přímo ze supernatantu bez nutnosti přidávání rozpouštědla a nemohlo by tedy dojít ke zkreslení spektrofotometricky získaných dat (Sutherland & Learmonth, 1997). Navíc se ušetří čas při vyhodnocování (odpadá nutnost inkubace s rozpouštědlem) (Roehm *et al.*, 1991). Soli využívané parazitologů při zjišťování viability (MTS, XTT) fungují na principu nepřímé detekce superoxid dismutáz. Pokud funkčnost enzymů klesá (např. po přidání inhibitoru), intracelulární koncentrace superoxidu roste (Beauchamp & Fridovich, 1971), a tím roste i koncentrace formazanu – jedná se o kompetici o substrát mezi tetrazoliovými solemi a superoxid dismutázami.

XTT

Tato sůl byla využita pro zjišťování mediánu efektivní inhibice (IC_{50} , vysvětleno v seznamu zkratk) pro praziquantel, kurkumin, amfotericin, meflokin, ivermektin a látky JQ1 u schistosomul *S. mansoni*. Barevná antischistosomika (kurkumin, amfotericin) však interferovala při spektrofotometrickém vyhodnocování koncentrace formazanu (XTT formazan je žlutooranžový (Comley & Turner, 1990)). I přes úpravu metodiky se ale křivka popisující účinnost amfotericinu i praziquantelu neshodovala s jinak získanými daty (Aguiar *et al.*, 2017). Důvodem snad byla nízká účinnost praziquantelu na vybrané stadium parazita, jak bylo dokázáno i v jiných pracích (Panic *et al.*, 2015). Kvůli své barevnosti však XTT nebylo vhodným kandidátem pro výzkum vlivu kurkuminu a přesností výsledků získaných touto metodou se nezařadilo ani jako nejvhodnější metoda pro zjišťování viability schistosomul *S. mansoni*.

Obdobně lze XTT využít i u stanovování viability jednotlivých dospělých samic *A. viteae*. Problém představovala volba přechodného akceptoru elektronů, neboť jednotlivé sloučeniny nepříznivě ovlivňovaly zkoumané jedince (Comley & Turner, 1990). Ustanovení metodiky XTT eseje pro hlístice otevřelo dveře dalším pokusům. Výzkum zvýšení homogenity populace *O. volvulus* pro další kultivaci využil XTT společně s mikroskopicky klasifikovanou motilitou a pozorováním hladin vylučovaného laktátu. Prokázalo se, že metody zjišťující viabilitu jí samy neovlivňovaly, ovšem i tak docházelo k samovolnému, byť pomalému poklesu viability a motility během kultivace (Strote, Bokhof & Comley, 1993).

XTT esej standardizovaná P. H. N. Aguiarem je popisována jako přesná, s reprodukovatelnými výsledky, což není zcela standardní stav u jiných metod (Aguiar *et al.*, 2017; Braun *et al.*, 2020). Rovněž byla pozorována nižší toxická zátěž na zkoumané helminty – XTT lze tedy označit za supravitální barvivo (barvení lze se stejnými jednicemi konat několikrát), i když po několikátém opakování dochází k malému snížení viability. Nevýhodou je nutnost naprosté přesnosti v počtu jednotek parazitů, kteří budou s činidlem inkubováni, jinak se výsledky budou markantně lišit. Další nevýhodou je dlouhá doba

inkubace, s čímž má co dočinění pomalý metabolismus vybraného stádia *S. mansoni*, a nelze ji tedy dalšími úpravami metodiky nijak výrazně zmenšit. Z obdobného původu byla hladina IC₅₀ praziquantelu pro schistosomula nesignifikantní (Aguiar *et al.*, 2017).

MTS

Účelem studie hlístic *D. immitis* bylo ustanovení nejvhodnější eseje pro určování odolnosti jednotlivých kmenů parazitů. Vzniklo totiž několik lokálních forem se zvýšenou odolností k makrocyclickým laktonům. Kritérii hledané ideální metody určení viability byla nízká náročnost na čas a vybavení, cena, přesnost, a možnost rozlišení odolnosti jednotlivých kmenů hlístic. Mezi mnoha jinými metodami (viz výše i níže) se vyskytla i MTS esej. Hodnoty EC₅₀ se však měnily v závislosti na množství přidaného léčiva. Zároveň nebylo možné rozlišit jednotlivé kmeny podle výsledků eseje bez přidání léčiva. MTS esej byla tedy označena jako nevyhovující (Jesudoss Chelladurai *et al.*, 2020).

Jako indikátor viability monitorují tetrazoliové soli míru funkčnosti enzymů spojených s dýchacím řetězcem nebo redukcí kyslíkového stresu buňky. Jelikož však i buňky hostitele mají stejné či velmi podobné mechanismy, není možné používat tyto eseje *in vivo*. Tím jsou pak ovšem výsledky výzkumů sledujících účinky léčiv limitovány, neboť z těchto testů není znám např. účinek látky na hostitele, její biotransformace hostitelovým metabolismem apod. Jinak ale představují spolehlivou metodu pro *in vitro* využití.

4.2 Resazurin (Presto blue)

Resazurin (AB, z angl. alamar blue) je derivátem fenoxazinu. Dusík na pozici 10 s navázaným kyslíkem může být enzymaticky redukován, přičemž vzniká resorufin (7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-on) kvantitativně vzhledem k hmotnosti zkoumané tkáně. Produkt reakce má vyšší optickou denzitu a jiné absorpční spektrum světla než výchozí látka, čehož se využívá při vyhodnocování eseje pomocí fluorometrie nebo spektrofotometrie (DeBaun & de Stevens, 1951).

K zjišťování vlivu sloučenin z databáze WHO-TDR (Aguero *et al.*, 2018) na viabilitu schistosomul *S. mansoni* bylo použito AB eseje v kombinaci s pozorováním patomorfologických změn pro snížení chybovosti. V prvním kroku experimentu byla schistosomula vystavena již používaným léčivům, aby se prokázala přesnost a využitelnost AB eseje – ta se ukázala jako přesná ve stanovování již známých EC₅₀, a proto bylo přikročeno k dalšímu kroku: Byly zkoumány sloučeniny z výše zmíněné databáze; jak ty s již dříve potvrzenou účinností proti dospělcům *S. mansoni*, tak i náhodně vybrané, bez prokázané účinnosti, které sloužily jako negativní kontrola. Touto prací bylo potvrzeno, že všechny látky účinkující na dospělé snižovaly i viabilitu schistosomul. AB esej umožnila spolehlivě určit vážně poškozené či mrtvé jedince, u méně poškozených schistosomul však nastal problém. Jelikož autoři určili účinnou látkou každou, která po třídní inkubaci inhibovala více než 25% redukce resazurinu, byl v tomto experimentu za neúčinný považován i praziquantel, který je běžně užívaný při léčbě schistosomózy. Proto metoda redukce resazurinu není vhodná pro určování viability schistosomul bez kombinace s dalšími metodami. Při jejím využití jakožto kontrolní metody je ovšem její výhoda (oproti

např. formazanům 1. generace) nízká toxická zátěž na zkoumané jedince (Mansour & Bickle, 2010). Další práce potvrdila využitelnost metody i u *S. haematobium*. Limitací metody byl maximální počet schistosomul v jedné nádobě – při vyšším počtu jedinců intenzita fluorescence klesala, docházelo zřejmě k tvorbě shluků a vzájemnému stínění (Marxer, Ingram & Keiser, 2012).

U hlístic druhu *Trichuris trichiura* byla nutnost přijmout novou metodiku *in vitro* testu viability, neboť mikroskopicky pozorované změny morfologie a/nebo motility si s sebou nesou nevýhody zmíněné výše. Proto bylo s použitím účinných látek se známou účinnou koncentrací (ivermektin, levamisol, nitazoxanid) vyzkoušeno několik metod stanovování viability se smíšenými úspěchy. U AB eseje byla vyzdvihována jednoduchost provedení, nízká cena a malé nároky na vybavení pro vyhodnocení výsledků, jakožto i korelace s výsledky měření motility. Oproti tomu bylo zcela odsouzeno využití MTT. Naměřené hodnoty naprosto neodpovídaly hodnotám IC_{50} získaným pomocí AB eseje, navíc při vyhodnocování docházelo k problémům s interferencemi pozadí (Silbereisen, Tritten & Keiser, 2011).

Využití resazurinu se ukázalo jako rychlá a přesná metoda při určování velmi poškozených jedinců, zatímco u exemplářů s vyšší viabilitou nebyl dostatečně přesný. Důvodem může být to, že resorufin není plně redukovanou formou resazurinu. Ta se totiž nazývá (di)hydroresorufin (3,7-dihydroxyfenoxazin), je bezbarvá a tedy nedetekovatelná fluoro- ani spektrofotometrií při nastavení přístrojů na detekci resorufinu. Jestliže reakce resazurinu probíhá v nadbytku elektronů – tedy v případě, pokud redukční potenciál buněk jedince je ještě vysoký a zkoumaný jedinec není tedy tolik poškozený, vzniká až tento koncový produkt. Tato reakce je sice reverzibilní, ovšem i tak by mohlo docházet k falešnému snižování koncentrace monitorovaného resorufinu, a tím pádem i ke zkreslování výsledků (O'Brien *et al.*, 2000).

4.3 Methylenová modř

Methylenová modř (MB, z angl. methylene blue) je derivátem fenothiazinu. Stejně jako u resazurinu dochází v redukčním prostředí k zániku dvojné vazby u dusíku 10 a vzniku redukované leuko formy (3,7-bis(dimethylamino)-fenothiazin). Ta je na rozdíl od výchozí látky bezbarvá. Pokud si tedy buňky pozorovaného jedince zachovaly možnost redukce, bude celý organismus po určité době bezbarvý (Ehrlich, 1885). Vyhodnocování samotné viability pak probíhá vizuálním zařazením jednice do příslušné kategorie podle stupně odbarvení - obdobně jako např. u vyhodnocování motility.

Průběh migrace schistosomuly *S. mansoni* savčí kůži a odpovědi napadeného organismu se provádělo za pomoci MB eseje. Několik minut po infekci byla z kůže nakažených myší extrahována schistosomula a jejich viabilita byla vyhodnocována pozorováním jejich barvení. Ačkoliv bylo odbarvení buněk vysvětleno jakožto redukce výchozí látky na bezbarvý produkt (Ehrlich, 1885), výzkumníci se domnívali, že jde o aktivní vypuzování barevné látky mimo tělo (tento výklad přetrval poměrně dlouho (Gold, 1997) a dostal se i mimo výzkum schistosom (Fabbri & Elissondo, 2019). I přes nesprávnou interpretaci však bylo dosaženo kýžených výsledků – vznikla škála od výrazně modrých po

zcela odbarvená schistosomula. Hodnocení viability rozřazovalo jednotlivá schistosomula však jen do dvou kategorií – živá či mrtvá. Toto není ideální, neboť mezi mrtvé byla zařazena i ta s nenulovou, i když nižší viabilitou autory označovaná jako „moribund stages“ – na prahu smrti. Toto se nepochybně odrazilo na výsledcích experimentu ve zvýšení důležitosti kůže jakožto bariéry pro průnik infekčních stádií (Clegg & Smithers, 1968).

Oxid dusnatý a peroxynitrit jsou molekuly s prokázaným antimikrobiálním účinkem (Brasil *et al.*, 2017), rovněž byl prokázán i jejich účinek na *S. mansoni* (Fouad Ahmed *et al.*, 1997). K prokázání jeho vlivu na ptačí schistosomula *T. regenti* bylo využito mimo jiných metod (sledování změn koncentrace laktátu, patologické změny na povrchu schistosomul - viz výše) byla využita i MB esej. Po přidání látek spontánně uvolňujících výše zmíněné mikromolekuly byl zjišťovány jejich účinky na viabilitu schistosomul *in vitro*. Ty byly později porovnávány s daty získanými z *in vivo* experimentů. (Macháček *et al.*, 2020). Kvůli zvolené metodě mohly opět vznikat artefakty vinou nutnosti vizuálního vyhodnocování výsledků. Schistosomula byla rozdělena do dvou kategorií – prokazatelně mrtvá (tmavě modrá s výraznými patologickými změnami) a prokazatelně živá (neobarvená s vysokou motilitou). Kombinace s dalšími, výše uvedenými metodami napomohla objektivnímu zhodnocení reálného stavu schistosomula.

In vitro vývoj protoskolexů v dospělce tasemnice *E. granulosus* byl optimalizován za přispění MB eseje. Konkrétně byla zjišťována prudkost poklesu viability v různých médiích za různých teplot. Jako referenční parametry pak sloužil pohyb plaménkových buněk protonefridií (viz výše), svalové stahy, integrita celého těla a barvení za pomoci MB. Jako nejvěrohodnější metoda bylo vyhodnoceno pozorování plaménkových buněk, neboť při barvení MB docházelo ke zbarvení skolexu bez větších patologických změn až několik dní po ukončení pohybu v protonefridiích (Casado, Rodriguez-Caabeiro & Hernandez, 1986). Na vině by mohla být neprostupnost a odolnost tegumentu na povrchu vývojových stádií tasemnic, takže bez mechanického poškození se výchozí látka nedostala dovnitř.

Při výzkumu vlivu druhu meziphostitele na vývoj skolexů v cystách tasemnice *E. granulosus* byla použita rovněž MB. Dřívější přístup, tedy krmení definitivního hostitele (psa) nakaženými meziphostiteli a sledování vývoje v dospělce mělo řadu nevýhod – dlouhotrvající pitva definitivního hostitele, nutnost zcela pečlivě prohlédnout střevo a možnost kontaktu s infekčními vajíčky. Oproti tomu se využití MB eseje osvědčilo jakožto velmi bezpečná, jednoduchá a rychlá metoda stanovování viability skolexů (Elowni *et al.*, 2019). Při tomto přístupu však není možné zhodnotit, zda skolexy vskutku dospějí v tasemnici, neboť životaschopnost neznamená zaručené dokončení životního cyklu.

MB esej byla s úspěchem využita i u druhu *Trichuris spiralis*. Ověření funkčnosti metody bylo provedeno pouze pomocí extrémně vysokých a nízkých teplot v kontrastu s klasickou metodou uchovávání *in vitro* kultury (Randazzo & Costamagna, 2010). Sofistikovanější přístup kombinující několik metod vyhodnocujících viabilitu byl zaměřen na vystavení svaloviny s larvami teplotám odpovídajícím lidské přípravě pokrmů. Infektivita poté byla zjišťována kombinací MB eseje, změn morfologie (patologické narovnání larev) a efektivitou pokusných infekcí myši podáváním nakažené

svaloviny. MB se ovšem neosvědčila, neboť i zcela obarvené a tedy zdánlivě mrtvé larvy byly stále infekční. Daleko přesnějším ukazatelem byla míra stočení, kterou si larvy zachovaly (Franssen *et al.*, 2021). Příčinou nepřesnosti může být poněkud delší doba inkubace s barvivem.

Jedním z modelových organismů pro studium skupiny Cestoda je i tasemnice *M. vogae*. Pro určování viability metacestodů bylo využito několik různých metod, které byly náchylné k chybě zapříčiněné lidským faktorem. Tato možnost by měla být minimalizována použitím několika různých barviv, jejichž mechanismus se navzájem lišil. Jedním z přístupů byla i MB esej. Jako její hlavní nevýhoda byla změna výsledku v závislosti na délce inkubace. Další nevýhodou bylo vymývání barviva při delším kontaktu s rozpouštědlem (Fabri & Elissondo, 2019).

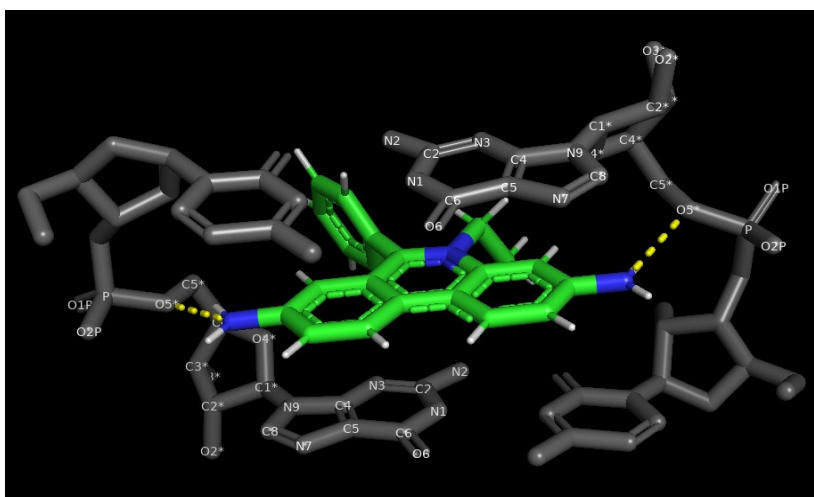
Specifikou této metody je nutnost velice krátké inkubace zkoumaných helmintů v přítomnosti barviva, neboť při delší době byly pozorovány falešně pozitivní výsledky čistě z důvodu vyčerpání redoxních schopností buněk – celý organismus posléze vykazoval nižší viabilitu, než tomu tak bylo ve skutečnosti (Elowni *et al.*, 2019; Fabri & Elissondo, 2019). U některých prací byla tato doba dodržena (Macháček *et al.*, 2020), u jiných docházelo k několikanásobnému překročení inkubační doby s nevyhnutelnými následky v podobě vzniku arteficiálních výsledků (Li Hsü *et al.*, 1977).

5 Metody interagující s nukleovými kyselinami v buňkách helminta

5.1 Deriváty fenanthridinu (ethidium bromid, propidium jodid)

Ethidium bromid (EtBr) a PI se váží na dvoušroubovice nukleové kyseliny bez ohledu na sekvenci. Jedná se o tzv. interkalační látky, neboť molekuly barviva se vmezeřují mezi jednotlivé báze. Tam jsou udržovány elektrostatickými silami vznikajícími mezi aminoskupinami EtBr či PI a kyslíky ve fosfátech nukleové kyseliny (NK) (viz obr. 1). Dalším aspektem vkládání látky do dvoušroubovice jsou i patrové interakce („stacking interactions“) mezi aromatickou kostrou a bázemi, kterými je barvivo udržováno na místě (Waring, 1965; Jain & Sobell, 1984).

Obě látky neprostupují intaktní CPM, jelikož jsou v roztoku disociovány. Obarví tedy NK buněk, které jsou po smrti a jimž byla CPM porušena. Proto je výhodné kombinovat s metodami, které zvýrazňují živé jedince, aby tak bylo dosaženo vzájemné kontroly – příkladem je FDA/PI esej



Obrázek 1. Interkalace ethidium bromidu (barevně) do dvoušroubovice nukleové kyseliny (šedě). Zvýrazněny (žlutě) jsou slabé vazebné interakce mezi $-NH_2$ ethidium bromidu a kyslíky na kostře nukleové kyseliny. Vizualizace v programu PyMOL dle krystalografických dat S.C. Jaina a Henry M. Sobella (1988) založených na jejich dřívější práci (Jain & Sobell, 1984).

(diacetyl fluorescein/propidium jodid). Výsledky jsou zjišťovány pomocí měření fluorescence barviva, která je několikanásobně silnější, je-li navázáno na dvoušroubovici NK.

Ethidium bromid a jeho deriváty

Společně s několika dalšími fluorescenčními metodami (jako např. PI, viz níže) byl pro zjišťování viability schistosomul *S. mansoni* využit i EtBr. U mrtvých jedinců ve zkoumané skupině docházelo k obarvování jader, zatímco u živých se fluorescence objevovala jen v tegumentu při zvýšení koncentrace EtBr (Van Der Linden & Deelder, 1984). To může být důsledkem přitahování kationtů záporným nábojem iontů v buňce přes CPM, k vlastnímu překonání membrány však nedochází. V průběhu několika hodin od ukončení barvení se začal snižovat rozdíl fluorescence pozadí a nabarveného jedince. Na vině může být difuze obarvených molekul NK do okolního prostředí. Kvůli tomuto nedostatku nebyl EtBr při tomto pokusu dále využíván (Van Der Linden & Deelder, 1984). S podobným jevem se však u dalších experimentů nesetkali (Peak, Chalmers & Hoffmann, 2010) – na vině může být např. použití odlišného rozpouštědla.

Látka odvozená od EtBr (přesněji „ethidium homodimer-1“, odtud EtHM1) byla společně s kalcein acetoxymethylesterem (CAM) v rámci sady LIVE/DEAD[®] využita při hledání nových přístupů k zjišťování viability L1 larev druhu *Trichuris muris*. Cílem bylo posouzení účinnosti nových potenciálních léčiv jakožto i nalezení nové metody pro určování viability – rychlejší, přesnější a jednodušší než monitorování motility a morfologických změn (Wimmersberger, Tritten & Keiser, 2013). Jelikož byl dokázán pozitivní vliv bakteriální mikroflóry na ontogenezi *T. muris* (Hayes *et al.*, 2010), byla vajíčka inkubována spolu s kolonií bakterie *E. coli*. Po vylíhnutí takto odchovaných L1 larev byla posléze nastavena hranice 100% viability, dle které byly hodnoceny výsledky vlivu léčiv na další skupiny. EtHM1/CAM esej však neposkytla dostatečně přesvědčivé výsledky. Jedním z problémů byla právě přítomnost bakterie *E. coli*. Jimi způsobená fluorescence na pozadí byla příliš vysoká. Problém se do jisté míry podařilo odstranit přidáním antibiotik po vylíhnutí larev, ale ani pak nekorelovaly hodnoty fluorescence s hodnotou viability určenou morfologickým pozorováním. Na vině může můžou být rozdíly mezi buňkami savců, pro jejichž výzkum je LIVE/DEAD[®] esej určena, a buňkami helmintů. Ostatní metody navržené jako alternativa - využití Resazurinu a pozorování inhibice příjmu potravy (obojí viz výše) rovněž nevykázaly dostatečnou přesnost při experimentech. (Wimmersberger, Tritten & Keiser, 2013). Možným řešením pro výzkum *T. muris* by mohlo být např. ověření redukčních schopností homogenátu z jedinců – tento způsob byl již ověřen u jiných parazitických hlístic (Comley & Rees, 1989).

Propidium jodid

PI byl využit při stanovování vlivu desinfekce vnějšího obalu vajíček *T. muris* roztokem kyseliny chlorné na jejich životnost (Kopper & Mansfield, 2010). Vajíčka určená pro výzkum interakce těchto helmintů se střevní mikroflórou definitivního hostitele na sobě totiž častou nesou zárodky bakterií a mikroskopických hub, se kterými přišla do kontaktu ve výkalech předchozího hostitele. Ty by výrazně

ovlivnily další analýzy, a proto bylo nutné odstranit tyto mikroorganismy a přitom neohrozit larvu vyvíjející se uvnitř. Viabilita vajíček je rovněž důležitým faktorem pro stanovení přesné infekční dávky – pouhou kontrolou morfologických znaků nelze eliminovat skupinu mrtvých larev, které ale ve vajíčku ještě nejeví známky rozkladu. V důsledku toho není možné určit přesný počet životaschopných jedinců podaných hostiteli. Tento údaj se dal zjistit pouze zpětně, a to pitvou po dokončení vývoje larev po 32 dnech od infekce. Značením vajíček pomocí PI, který obarvil vajíčka s mrtvými larvami, bylo dosaženo přesnějších výsledků než v předchozích pokusech při daleko nižší časové náročnosti. Problém s PI ovšem nastal, když byl použit jako jediné kritérium odhadu viability bez předchozí desinfekce vajíček. Morfologicky mrtvá vajíčka barvivo nepřijímala, zatímco u živých byla obarvena vrchní vrstva (Kopper & Mansfield, 2010). Důvodem obarvení mohou být kolonie bakterií a hub, které byly usmrceny kyselinou chlornou a obarveny.

Ve snaze najít rychlejší a přesnější metodu než morfologické určování viability u schistosomul *S. mansoni* byl proveden test s využitím FDA/PI eseje, kterou zde autoři nazvali „Helminth Fluorescence Bioassay - HFB“. Jak již bylo uvedeno výše, principem je kombinované pozorování intenzity fluorescence obou látek a z jejího poměru vyvozování viability daného jedince. Měřením přesné intenzity záření v jednotlivých jamkách bylo dosaženo vzrůstu fluorescence odpovídajícího množství jedinců. Zároveň bylo ale možno pozorovat barvu jednotlivých populací buněk v rámci jednoho jedince, což může být výhodou např. při pozorování tkáňové specifity použitého anthelmintika. K otestování funkčnosti metody sloužil pokus s vybranými účinnými látkami, které mají prokazatelný vliv na viabilitu, aktivitu a patomorfologické změny schistosomul. Dále byly testovány látky, u kterých se předpokládal určitý efekt, jenž ale nebyl dosud prokázán. Jako kontrolní metoda měla sloužit mikroskopická analýza morfologie a motility. Díky možnosti využití 384jamkové destičky pro měření fluorescence je metoda velmi vhodná i pro vysokokapacitní testování (Peak, Chalmers & Hoffmann, 2010). FDA/PI eseje se tedy plně osvědčila.

Zjišťování viability sledováním a porovnáváním intenzity fluorescence obou látek bylo rovněž využito při sledování vlivu puromycinu na sporocysty a schistosomula *S. mansoni*. Genetickou manipulací s pomocí modifikovaných virů byl do genetické informace přenesen gen *puroR*, jenž kóduje protein zodpovědný za zvýšenou odolnost vůči puromycinu (Ángel Rubio *et al.*, 2004). Rozdílná letální dávka (LD₅₀, vysvětleno v seznamu zkratk) pro puromycin u stejných vývojových stádií, neupravených a transgenních, určuje úspěch pokusu (Yan *et al.*, 2018).

Stanovování viability u tetrathyridií tasemnice *M. vogae* probíhalo hlavně vyhodnocováním postmortálních změn morfologie či změn motility, což s sebou neslo již mnohokrát zmíněné nevýhody. Za cílem najít nejvhodnější, rychlou, jednoduchou a objektivní metodu určování viability byla testována i FDA/PI eseje. Tetrathyridia byla inkubována s thymolem, který má vliv na jejich morfologii (Maggiore & Elissondo, 2014). Barvení pomocí FDA/PI bylo přesné a rychlé, na rozdíl od MB se výsledky po určité době inkubace neměnily, ovšem kvůli aspektu mutagenity a nákladnému vybavení pro pozorování

nakonec nebyl tento přístup zvolen jako nejvhodnější pro danou situaci a jako nejvhodnější metoda bylo zvoleno barvení pomocí EO (Fabbri & Elissondo, 2019).

Hlavní nevýhodou je fakt, že deriváty fenantridinu jsou považovány za mutageny, neboť jejich navázání mění sekundární strukturu dvoušroubovice NK (Wang, 1974). Tím pádem se i ne zcela mrtvému jedinci, který byl ovšem do jisté míry obarven, mohla uměle snížit viabilita ještě více, zejména při dlouhodobějším působení.

5.2 DAPI

DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) je obdobně jako deriváty fenantridinu interkalační látkou tvořící komplex s dvoušroubovicemi nukleových kyselin (Kapuściński & Szer, 1979; Manzini *et al.*, 1985), na rozdíl od výše zmíněných látek je však pro fungování metody nutnost vazby na páry A-T a A-U, popřípadě I-C. Pokud se v sekvenci objevují C-G páry, DAPI utvoří jiný druh vazby, při níž není posílena fluorescence (Kapuściński & Szer, 1979). Jelikož je do buněk s intaktní CPM transportována jen málo, při nižších koncentracích barví přednostně mrtvé buňky, jejichž CPM byla porušena.

Jako jediné vyhovující fluorescenční barvivo pro odlišení živých schistosomul *S. mansoni* od mrtvých bylo použito právě DAPI, neboť na rozdíl od ostatních (např. EtBr) nedocházelo s postupem času k úniku barviva mimo zkoumaného jedince. Rovněž byla zaznamenána vysoká míra specifity ve smyslu obarvování pouze mrtvých buněk, a to i po velice dlouhé inkubační době (48 h), ačkoliv živí jedinci i po této době zůstali neobarveni. Důkazem selektivity je i pokus s umělým lokálním poraněním schistosomula, při němž byly porušené tkáně obarveny, zatímco neporušené ne (Van Der Linden & Deelder, 1984).

DAPI je široce používaným barvivem využívaným v např. buněčné biologii při zvýrazňování jader fixovaných buněk. Výhodou je jeho dostupnost, funkčnost při nízkých koncentracích a nízká toxicita. Je až s podivem, že jeho využití coby ukazatele viability není širší, i když se nepodařilo objevit možná úskalí využití této metody a při helmintologických výzkumech s jiným zaměřením se prokázala její využitelnost i u embryí rodu *Ascaris* (Davis *et al.*, 1999).

5.3 Hoechstova barviva

Do této skupiny patří několik strukturně podobných látek rozlišovaných pomocí identifikačních čísel. V helmintologii se uplatňují dvě z nich: Hoechst 33258 (H258) a Hoechst 33342 (H342). Obě tyto látky fungují jako fluorescenční barviva s afinitou k dvoušroubovice NK – váží se do malého žlábků v oblastech bohatých na A-T páry (Portugal & Waring, 1988; Bazhulina *et al.*, 2009).

Jednou z molekul poškozovanou ROS je i DNA – proto byl při zjišťování viability u dospělců druhu *Hymenolepis diminuta* jako jedna z metod použit i H258 (z dalších metod lze jmenovat MTT spojené s funkcí mitochondrií, NBT jako metodu monitorující aktivitu SOD, akridinovou oranž aj.). Dospělci získaní *ex vivo* z potkanů byli vystaveni vlivu výtažků z několika rostlin rodu *Senna* (Roy *et al.*, 2020), u nichž byly již dříve prokázány antimikrobiální (Perumal Samy & Ignacimuthu, 2000) a

protizánětlivé (Cuéllar *et al.*, 2001) účinky. H258 byl využit při monitorování změny v morfologii jádra při inkubaci jak s těmito výtažky, tak i s již využívanými léčivy – konkrétně praziquantelem. Oproti kontrolní skupině tasemnic, které byly inkubovány pouze v médiu bez účinných látek, bylo možno pozorovat patologické změny v podobě kondenzovaného chromatinu a deformovaných jader, které byly rovněž obarveny H258. I výsledky získané ostatními metodami potvrzovaly, že tinktury z rostlin rodu *Senna* mají schopnost vyvolávat oxidativní stres a v nich obsažené účinné látky mohou být potencionálními léčivy proti tasemnicím tohoto druhu (Roy *et al.*, 2020). Vzhledem k tomu, že výzkum nebyl zatím prováděn *in vivo*, je otázka opravdové využitelnosti těchto látek nezodpovězena (nehledě k neznalosti jejich přesné struktury a tím pádem nemožnosti případné umělé syntézy). H258 v tomto experimentu však fungoval bez nejmenších problémů, i když byl při jejím využívání použit protokol k H342 – jádra obarvil spolehlivě.

Jako nevitální barvivo byl H258 použit i při stanovování viability vajec *S. haematobium*. Z pohledu přesnosti určování stavu jednotlivých vajíček byl H258 shledán jako jednoznačně nejlepší metoda. Dokázal totiž rozlišit mrtvá vajíčka, která byla ale na základě morfologického ohledání shledána mrtvými – jako kontrola sloužilo pozorování počtu vylíhnutých vajíček. Oproti ostatním metodám byla rovněž pozorována vyšší spolehlivost – např. jako další nevitální barvivo byla využita např. akridinová oranž (AO), která ovšem nedokázala obarvovat mrtvá embrya ve vajíčcích. Vitální barviva (TB, NR) byla také shledána jako nevyhovující z důvodu neselektivního obarvení všech vajíček – jak živých, tak mrtvých (A. K. Sarvel *et al.*, 2006).

Při sledování vlivu komplementu na viabilitu cercárií *S. mansoni* bylo kromě detekce MAC (z angl. membrane attack complex) a transportérů glukózy na vnější straně tegumentu pomocí imunologického barvení použito i barvení jader pomocí H258. Toto barvivo bylo již použito jako důkaz poškození tegumentu u schistosomul (Jones, Helm & Kusel, 1988; Farias *et al.*, 2013) i dospělců (Jones, Helm & Kusel, 1988) *S. mansoni*. Jeho využitelnost při nepřímé kontrole poškození tegumentu měla být tedy ověřena i u těchto vývojových stádií. U cercárií fungoval H258 jako nevitální barvivo – pouze jedinci s poškozeným tegumentem byli obarveni. Při inkubaci s komplementem po dobu dvou hodin nebyla ovšem obarvená celá jejich těla, ale pouze anteriorní části. Na nichž byly i detekovány molekuly C9 – to je způsobeno přítomností enzymů z acetabulárních žláz, které komplement aktivují. U kontrolní skupiny inkubované s tepelně inaktivovaným komplementem se fluorescence objevovala jen na předělu ocásku a těla, což souvisí s přirozeným odvrhováním ocásku při transformaci cercárie na schistosomulum. Další částí pokusu bylo zjištění doby působení komplementu, která je nutná pro kompletní zabití cercárií – po 18 hodinách inkubace byl sice komplement detekován po celém povrchu těla, ovšem barvení H258 nepotvrdilo vliv této skutečnosti na viabilitu cercárií - až po šesti dnech po inkubaci začala viabilita výrazněji klesat. Komplement taktéž neměl zásadní vliv na změnu povrchového glykokalyxu, což je důležitý moment v přeměně na schistosomulum (Da'dara & Krautz-Peterson, 2014). Jelikož zde byla metoda využita pouze jako zobrazovací a nikoliv kvantitativní, fungovala přesně.

Odlišný přístup k vyhodnocování viability cercárií pomocí barvení pomocí H258 byl zvolen v následujícím experimentu. Výsledky byly tentokrát kontrolovány nejen vizuálně, ale i pomocí fluorofotometrie. Bylo zjištěno, že kvantitativních výsledků (lineárního vzrůstu intenzity světla v závislosti na počtu cercárií) dosahuje metoda až od několika desítek jedinců v nádobce (na rozdíl od FDA, jehož výsledky byly v tomto ohledu lepší) (Braun *et al.*, 2020). Proto je H258 vhodnější pouze pro experimenty tohoto typu, které jsou dimenzovány na vyšší počty jedinců.

Vliv polykationních peptidů na viabilitu schistosomul *S. mansoni* a variabilita odolnosti vůči těmto látkám byla zkoumána s pomocí H258 a 5AF (viz výše). V těle hostitele totiž bojují se těmito vývojovými stádii eozinofily za pomoci degranulace váčků obsahujících peptidy s kladným nábojem (Butterworth, 1985). Jako modelový polykationt ke sledování rozdílů mezi náchylností vývojových stádií k tomuto jevu a principem poškozování schistosom posloužil poly-L-lysin. 5AF byl využíván k monitorování příjmu lipidů do CPM (mechanismus viz výše), H258 zde úspěšně zastával funkci hlavní metody zjišťování viability jakožto nevitální barvivo (Jones, Helm & Kusel, 1988).

H258 bylo využito jako přidružená metoda monitorování viability oocytů, mikrofilárií a dospělců *Setaria cervi* a mikrofilárií *Wuchereria bancrofti*. U těchto subjektů byl zkoumán vliv a mechanismus účinku ursolové kyseliny, extraktu z rostliny *Nyctanthes arbor-tristis*. Samotné určování viability sestávalo z několika metod – redukce MTT, monitorování funkčnosti SOD pomocí NBT (obojí viz výše) a H258 bylo využito pro kontrolu patomorfologických změn jader a chromatinu. Daty získanými pomocí těchto metod bylo zjištěno, že filaricidní účinky této látky spočívají v indukci apoptózy vlivem vzniku ROS (Saini *et al.*, 2014) H258 byl v tomto experimentu využit obdobně jako u tasemnice *H. diminuta* (Roy *et al.*, 2020) či výzkumu apoptózy a oxidačního stresu způsobeného albendazolem u dospělců a mikrofilárií *S. cervi* (Nayak *et al.*, 2012). Obdobně, tedy jako látku monitorující změny chromatinu a a morfologie jádra, byl využit i H342 u výzkumu vlivu extraktu z rostliny *Curcuma zedoaria* na parazitické hlístice *Settaria digitata* – opět byl zvolen přístup kombinace mnoha metod spojených s monitorováním činnosti ROS v jedinci inkubovaném s účinnou látkou (Senathilake *et al.*, 2016).

H258 i H342 se ukázaly být užitečnými metodami pro monitorování patomorfologických změn jádra u tasemnic a parazitických hlístic. U těchto dvou skupin helmintů nemuselo dojít k porušení CPM a barvivo se i přes to dokázalo navázat na DNA. U schistosom však H258 hrálo roli nevitálního barviva a barvilo jen poškozené tkáně u všech vývojových stupňů. Důvodem tohoto jevu bude nejspíše rozdílná struktura povrchových struktur těchto parazitů.

5.4 Toluidinová modř

Vazba toluidinové modři (TBO, za angl. toluidine blue) na nukleové kyseliny je oproti ostatním metodám této kapitoly zvláštní – díky své struktuře může fungovat buď jako interkalátor dvoušroubovice obdobně jako např. DAPI, nebo svým kladně nabitým koncem interagovat se záporně nabitými částmi cukrofosfátové kostry NK (Ilanchelian & Ramaraj, 2011). Tato druhá možnost

předesílá daleko širší spektrum barvených struktur v buňce včetně jednovláknových NK a jiných záporně nabitých molekul – to ale nepředstavuje pro výsledky experimentu problém. Pokud je jakákoliv struktura v buňce obarvena, napovídá to o trhlínách v CPM, neboť kvůli svému náboji nemůže TBO procházet celistvou CPM a tudíž funguje jako nevitální barvivo.

Při zjišťování poškození schistosomul *S. mansoni* imunitním systémem byla kromě zkoumání morfologie použita i TBO. Cílem bylo zjištění, zda určité složky imunitního systému mohou poškodit nenávratně i mnohobuněčného parazita tak, aby škody byly neslučitelné s životem a s dokončením vývojového cyklu. V první fázi byl zjišťován vliv eozinofilů nebo neutrofilů na schistosomula *in vitro*. Včetně kontroly bylo tedy sedm experimentálních skupin: EO⁻, EO⁺, NE⁻, NE⁺, OB⁻ a OB⁺, přičemž EO značí schistosomula inkubovaná s eozinofily, NE schistosomula inkubovaná s neutrofilů, OB je skupina inkubovaná s oběma typy bílých krvinek a horní index značí přítomnost (+) či nepřítomnost (-) anti-schistosoma protilátek. Po uplynutí doby inkubace byla u všech skupin testována viabilita schistosomul pomocí TBO. Druhá fáze experimentu spočívala v infekci myši obdobně kultivovanými schistosomuly a posléze extrakci dospělců. Autoři hodnotí použití TBO kladně, neboť počet *ex vivo* nedospělých či jinak poničených jedinců odpovídá počtu výsledkům *in vitro*. Z výsledků *in vitro* pokusu vyplynulo, že poškození byla způsobovaná hlavně eozinofily, ale nebylo je vždy možno identifikovat na základě morfologických změn a hodnocení viability podléhalo subjektivnímu názoru pozorovatele (Dessein *et al.*, 1983). TBO totiž vytvořilo spektrum odstínů modré v závislosti na vážnosti poškození jedince – pro přesné vyhodnocení by bylo možné zkoumané jedince omýt od přebytečného barviva, homogenizovat a koncentraci barviva zjistit spektrofotometricky. Tato data by se porovnála s předem připravenými, stejně zpracovanými daty získanými ze skupiny schistosomul s přesně definovaným poměrem živých a mrtvých jedinců.

Profesor Gold se zabýval porovnáváním využitelnosti mnoha postupů při zjišťování viability schistosomul *S. mansoni*, jelikož pozorování morfologických změn, motility a plaménkových buněk s sebou nese již několikrát zmíněné nevýhody. Jedinými metodami s dobrými výsledky byla MB a TBO, neboť několik barviv z výběru (EO, CR, TB, bromothylol blue) nedokázalo obarvit jednice vůbec ani při prodloužení inkubace, navíc vytvořila nepřehledné pozadí, tudíž byla z experimentu nadále vyloučena. Porovnání výsledků z morfologicky odhadnuté viability populace před nabarvením a těch získaných po použití TBO a MB bylo zjištěna obdobná přesnost obou metod. I přesto bylo jako celkově nejvýhodnější metoda vybráno barvení pomocí MB, jelikož TBO příliš rychle (10 min) začala barvit nespecificky všechny jednice na sklíčku a snižovat jim motilitu, takže bylo poté téměř nemožné rozeznat živého a mrtvého jedince. (Gold, 1997)

TBO se ukázala být přesnou, jednoduchou metodou. Objevují se i nevýhody: jedna spočívá v nutnosti pozorovat barvené jedince na sklíčku, což vyžaduje jejich transport, tím pádem i zvyšuje riziko vzniku arteficiálního snížení viability zkoumaných jedinců při manipulaci. Druhá je pak až příliš rychlý nástup nespecifického barvení, což znemožňuje posouzení stavu zkoumaných jedinců.

5.5 Akridinová oranž

Akridinová oranž (AO, z angl. acridine orange) je derivátem akridinu a jako nenabitá lipofilní molekula se dostane do buňky, v níž ale získá díky nižšímu pH kladný náboj a nemůže již CPM přestoupit zpět (obdobně jako NR). Podle prostředí, v němž se nachází či podle molekuly, na níž se váže, se pak liší barva její fluorescence – červená v lyzozomech s nízkým pH, zelená při navázání na DNA a oranžová při vazbě na jednovláknovou NK (Rundquist, Olsson & Brunk, 1984). Živé buňky by tedy měly mít obarvené kompartmenty podle pH a obsahu, zatímco mrtvé by neměly být obarveny vůbec.

AO byla využita při hledání metody určování viability u onkosfér tasemnice *Taenia taeniformis*. Onkosféry byly vystavovány vysokým teplotám a následně barveny několika typy barviv – důvodem bylo určit tepelné optimum, při němž už onkosféry nebudou infekční. Metody principiálně fungovaly dobře, ovšem data jimi získaná měla až příliš velký rozptyl. Proto bylo rozhodnuto, že tento problém pomocí vitálních a nevitálních barviv nemůže být vyřešen (Chapalamadugu *et al.*, 2008).

Při výběru adekvátní metody pro určování viability vajíček *S. mansoni* byla využita i dvojmetoda EtBr/AO. Stejně jako u FDA/PI bylo cílem obarvit jak živá, tak i mrtvá vajíčka pro snadnější a přesnější sledování viability. Výsledky však nebyly dle autorů dobré a kombinace EtBr a AO byla zamítnuta pro další využití – fluorescence naprosto neodpovídala výsledkům morfologického pozorování a výsledky byly matoucí (A. K. Sarvel *et al.*, 2006). Problém, který zde nastal, může být vysvětlen stejnými barvami fluorescence. Jak bylo v úvodu řečeno, AO má schopnost emitovat několik světelných délek v závislosti na podmínkách. Při barvení cytoplazmy emituje světlo o délce zhruba 600 nm (Thomé *et al.*, 2016), což je stejná vlnová délka, jakou emituje EtBr při navázání na DNA (Chib *et al.*, 2014). V tomto ohledu tedy není dobré kombinovat ony dvě metody najednou, tím spíše ne při jedné inkubaci. Oranžové světlo je poté nejasného původu a obarveny jsou jak mrtvé, tak i živé buňky. Pokud je ale AO využita jako samostatná metoda pro zjišťování intaktnosti membrány, funguje u vajec *S. japonicum* spolehlivě (Shen *et al.*, 2017).

Kromě *S. mansoni* bylo toto barvivo využito i při zkoumání změn permeability vrchních vrstev vajíček fytoparazitických hlístic *Heterodera glycines* (Charlson, Harkins & Tylka, 2008) a *Globodera rostochiensis* (Perry & Feil, 1985). Tyto práce se nezabývají viabilitou, proto nejsou více rozváděny. Funkčnost tohoto přístupu byla nicméně prokázána, což z AO činí potenciální nástroj např. pro zkoumání vlivu léčiv na vajíčka jiných druhů lidských parazitů patřících do parazitických hlístic

AO se osvědčila jako vitální barvivo používané u vajíček parazitických helmintů. Důležitým faktorem při kombinovaném barvení fluorescenčními vitálními a nevitálními barvivy je ovšem důležité vybrat jako nevitální barvivo látku s jiným emisním spektrem (např. Hoechstova barviva), aby nedocházelo k nejasnostem prezentovaným týmem Sarvel *et al.* (2006). Zároveň jako u všech látek interagujících s DNA existuje nebezpečí vzniku mutací, což by mohlo vést k umělému snižování viability.

6 Závěr

Tato práce shrnula metody používané ke stanovování viability parazitických helmintů. Popsala odlišné principy jejich fungování a z nich plynoucí výhody, ale i technická či interpretační omezení. Jak je z práce zřejmé, neexistuje žádná metoda, natolik univerzální, přesná, jednoduchá na provedení a nenáročná na vybavení, která by byla primární a jedinou volbou výzkumníků. Kvůli velké rozmanitosti biologických vlastností, která se vyskytuje mezi parazitickými helminty taková ani existovat nemůže. Na základě provedené literární rešerše je možné konstatovat, že pro získání správných a věrohodných výsledků je nutné (1) správně vybrat a definovat parametr viability, který má být sledován a (2) zvolit metodu, která tento parametr přesně a správně měří. Shrnutí a porovnání nejčastěji používaných metod je spolu se stručným popisem jejich principu, výhod a nevýhod uvedeno formou tabulky v příloze k této práci.

Oproti minulosti, v níž byly hlavními přístupy k zjišťování viability jednoduché metody založené na pozorování patomorfologických změn a ztrátě motility nebo využívání barviv, se v dnešní době od těchto přístupů pomalu ustupuje. Ačkoliv možnosti syntézy v organické chemii a tedy i teoretické množství látek je téměř neomezené, velkou nevýhodu zde tvoří toxicita (ať již pro zkoumané helminty nebo pro examinátory), špatná rozpustnost, a neuniverzálnost, co se týče druhů a vývojových stádií helmintů. Mikroskopické pozorování a vyhodnocování pouhým okem je na druhou stranu zdoluhavé, nepřesné a náročné na zkušenosti. Nároky na přesnost, správnost a rychlost metody určování viability neustále rostou, proto je do tohoto procesu zapojována čím dál tím více robotika a umělá inteligence, jak o tom svědčí i poslední články. Tato pokročilá technologie dává naději k urychlení výzkumu nových, tak nutně potřebných léčiv a vakcín.

7 Zdroje

- Aguero, Landaburu, Chernomoretz, Videla, Berenstein, Maru, Magariños, Carmona, Roos, Shanmugam, Van Voorhis, Hertz-Fowler, Crowther, Reichers, Suzuki, Berriman, Pain & Doyle** (2018) 'TDR Targets'.
Dostupné z: <https://tdrtargets.org/> (Navštíveno: 24. 7. 2021).
- Aguiar, Fernandes, Zani & Mourão** (2017) 'A high-throughput colorimetric assay for detection of *Schistosoma mansoni* viability based on the tetrazolium salt XTT', *Parasites and Vectors*, 10(1), s. 1–10.
- Al-araji, Shneine & Ahmed** (2015) 'Chemistry of formazan', *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 5(1), s. 41–76.
- Albonico, Stoltzfus, Savioli, Tielsch, Chwaya, Ercole & Cancrini** (1998) 'Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* or *Necator americanus*, on iron status of children', *International Journal of Epidemiology*, 27(3), s. 530–537.
- Albonico, Wright, Ramsan, Haji, Taylor, Savioli & Bickle** (2005) 'Development of the egg hatch assay for detection of anthelmintic resistance in human hookworms', *International Journal for Parasitology*, 35(7), s. 803–811.
- Allen** (1928) 'An experimental study of the development of *Ancylostoma caninum* in normal and abnormal hosts', *American Journal of Epidemiology*, 8(2), s. 158–204.
- Alvarez-Sánchez, Pérez García, Bartley, Jackson & Rojo-Vázquez** (2005) 'The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance.', *Experimental Parasitology*, 110(1), s. 56–61.
- Ángel Rubio, Barrado, Carlos Espinosa, Jiménez & Lobato** (2004) 'The *pur6* gene of the puromycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces alboniger* encodes a tyrosinyl-aminonucleoside synthetase', *FEBS Letters*, 577(3), s. 371–375.
- Ates, Vanhaecke, Rogiers & Rodrigues** (2017) 'Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay', In: *Methods in Molecular Biology*, Humana, ©2017, s. 19–26. ISSN 19406029
- Bakr & Rahaman** (2016) 'Electrochemical efficacy of a carboxylated multiwalled carbon nanotube filter for the removal of ibuprofen from aqueous solutions under acidic conditions', *Chemosphere*, 153(červenec 2016), s. 508–520.
- Bazhulina, Nikitin, Rodin, Surovaya, Kravatsky, Pismensky, Archipova, Martin & Gursky** (2009) 'Binding of hoechst 33258 and its Derivatives to DNA', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 26(6), s. 701–718.
- Beauchamp & Fridovich** (1971) 'Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels', *Analytical Biochemistry*, 44(1), s. 276–287.
- Berridge, Herst & Tan** (2005) 'Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction', in *Biotechnology Annual Review*, s. 127–152.
- Beyhan, Yilmaz & Hokelek** (2016) 'Effects of acetic acid on the viability of *Ascaris lumbricoides* eggs: Is vinegar reliable enough to clean the vegetables?', *Saudi Medical Journal*, 37(3), s. 288–292.
- Bonser, Clayson & Jull** (1963) 'The potency of 20-methylcholanthrene relative to other carcinogens on bladder implantation', *British Journal of Cancer*, 17(2), s. 235–241.
- Borenfreund & Puerner** (1985) 'A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)', *Journal of Tissue Culture Methods*, 9(1), s. 7–9.
- Van Den Bossche & De Nollin** (1973) 'Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum*', *International Journal for Parasitology*, 3(3), s. 401–407.
- Brasil, Freire-de-Lima, Morrot & Vetö Arnholdt** (2017) 'Host-*Toxoplasma gondii* coadaptation leads to fine tuning of the immune response', *Frontiers in Immunology*, 8, p. 1080.

- Braun, Hazell, Webb, Allan, Emeryid & Templeton** (2020) 'Determining the viability of *Schistosoma Mansoni* cercariae using fluorescence assays: An application for water treatment', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3), s. 1–16.
- Brownlee, Holden-Dye & Walker** (1997) 'Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*', *Parasitology*, 115(5), s. 553–561.
- Butterworth** (1985) 'Cell-Mediated Damage to Helminths', in *Advances in Parasitology* (23), Academic Press, ©1985, s. 143–235 ISSN 0065-308X.
- Casado, Rodriguez-Caabeiro & Hernandez** (1986) 'In vitro survival of *Echinococcus granulosus* protoscolices in several media, at +4°C and +37°C', *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72(2), s. 273–278.
- CDC** (2019) 'CDC - Neglected Tropical Diseases - Diseases', Who. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (Navštíveno: 8. 8. 2021).
- Chandanshive, Rane, Tamboli, Gholave, Khandare & Govindwar** (2017) 'Co-plantation of aquatic macrophytes *Typha angustifolia* and *Paspalum scrobiculatum* for effective treatment of textile industry effluent', *Journal of Hazardous Materials*, 338, s. 47–56.
- Chandler** (1932) 'Susceptibility and resistance to helminthic infections', *The Journal of Parasitology*, 18(3), s. 135.
- Chapalamadugu, Busboom, Nelson, Hancock, Tang & Jasmer** (2008) '*Taenia taeniaeformis*: Effectiveness of staining oncospheres is related to both temperature of treatment and molecular weight of dyes utilized', *Veterinary Parasitology*, 151(2–4), s. 203–211.
- Charlson, Harkins & Tylka** (2008) 'Relationship between juvenile hatching and acridine orange fluorescence of *Heterodera glycines* eggs', *Nematology*, 10(5), s. 603–610.
- Chen, Suzuki, Dohrmann, Singh, Arkin & Caffrey** (2020) 'A multi-dimensional, time-lapse, high content screening platform applied to schistosomiasis drug discovery', *Communications Biology*, 3(1), s. 747.
- Chib, Raut, Sabnis, Singhal, Gryczynski & Gryczynski** (2014) 'Associated anisotropy decays of ethidium bromide interacting with DNA', *Methods and Applications in Fluorescence*, 2(1), s. 015003.
- Clarke, Gillings, Altavilla & Beattie** (2001) 'Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity', *Journal of Microbiological Methods*, 46(3), s. 261–267.
- Clegg & Smithers** (1968) 'Death of schistosome cercariae during penetration of the skin:II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*', *Parasitology*, 58(1), s. 111–128.
- Coles, Bauer, Borgsteede, Geerts, Klei, Taylor & Waller** (1992) 'World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance', *Veterinary Parasitology*, 44(1–2), s. 35–44.
- Coles, East & Jenkins** (1975) 'The mechanism of action of the anthelmintic levamisole', *General Pharmacology*, 6(4), s. 309–313.
- Comley, Rees, Turner & Jenkins** (1989) 'Colorimetric quantitation of filarial viability', *International Journal for Parasitology*, 19(1), s. 77–83.
- Comley & Rees** (1989) 'Radiorespirometric detection of macrofilaricidal activity in vitro', *Parasitology*, 98(2), s. 259–264.
- Comley & Turner** (1990) 'Potential of a soluble tetrazolium/formazan assay for the evaluation of filarial viability', *International Journal for Parasitology*, 20(2), s. 251–255.
- Cuellar, Giner, Recio, Máñez & Ríos** (2001) 'Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders', *Fitoterapia*, 72(3), s. 221–229.
- Cupo & Beckstead** (2019) 'An in vitro assay of disinfectants on the viability of *Heterakis gallinarum* eggs', *Avian Diseases*, 63(3), p. 511–513.

- Da'dara & Krautz-Peterson** (2014) 'New insights into the reaction of *Schistosoma mansoni* cercaria to the human complement system', *Parasitology Research*, 113(10), s. 3685–3696.
- Davis, Parra, LoVerde, Ribeiro, Glorioso & Hodgson** (1999) 'Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), p. 8687–8692.
- DeBaun & de Stevens** (1951) 'On the mechanism of enzyme action. XLIV. Codetermination of resazurin and resorufin in enzymatic dehydrogenation experiments', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 31(2), s. 300–308.
- Dessein, Butterworth, Vadas & David** (1983) 'Maturation in vivo of *Schistosoma mansoni* schistosomula after culture in vitro with granulocytes and antibody', *Infection and Immunity*, 39(1), p. 225–232.
- Diconza & Basch** (1975) 'Histochemical demonstration of acetylcholinesterase in sporocysts of *Schistosoma mansoni* (Trematoda)', *Parasitology*, 71(2), p. 305–310.
- Dobson, Donald, Waller & Snowdon** (1986) 'An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites.', *Veterinary parasitology*, 19(1–2), s. 77–84.
- Doenhoff, Kusel, Coles & Cioli** (2002) 'Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: Is there a problem?', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), s. 465–469.
- Ehrlich** (1885) 'Zur biologischen Verwertung des Methylenblau', *Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften.*, 23(8), s. 114–117.
- El-Ansary, Ahmed & Aly** (2007) 'Antischistosomal and liver protective effects of *Curcuma longa* extract in *Schistosoma mansoni* infected mice.', *Indian journal of experimental biology*, 45(9), s. 791–801
- El-Banhawey, Ashry, El-Ansary & Aly** (2007) 'Effect of *Curcuma longa* or parziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice liver – histological and histochemical study.', *Indian journal of experimental biology*, 45(10), s. 877–889
- Elozni, Ahmad, Abdelnabi & Badawi** (2019) 'Validation of the methylene blue test for assessment of viability of protoscolices from hydatid cysts', *Open Veterinary Journal*, 9(2), s. 172–176.
- Fabbri & Elissondo** (2019) 'Comparison of different staining methods for determination of viability on *Mesocestoides vogae* tetrathyridia', *Parasitology Research*, 118(2), s. 687–692.
- Farias, Krautz-Peterson, Tararam, Araujo-Montoya, Fraga, Rofatto, Silva-Jr, Isaac, Da'dara, Wilson, Shoemaker & Leite** (2013) 'On the Three-Finger Protein Domain Fold and CD59-Like Proteins in *Schistosoma mansoni*', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), s. e2428
- Feldmeier, Bienzle, Dietrich & Sievertsen** (1979) 'Combination of a viability test and a quantification method for *Schistosoma haematobium* eggs (filtration--trypan blue-staining-technique).', *Tropenmedizin und Parasitologie*, 30(4), s. 417–22
- Flisser, Gauci, Zoli, Martinez-Ocaña, Garza-Rodriguez, Dominguez-Alpizar, Maravilla, Rodriguez-Canul, Avila, Aguilar-Vega, Kyngdon, Geerts & Lightowlers** (2004) 'Induction of Protection against Porcine Cysticercosis by Vaccination with Recombinant Oncosphere Antigens', *Infection and Immunity*, 72(9), s. 5292–5297.
- Folz, Pax, Thomas, Bennett, Lee & Conder** (1987) 'Detecting in vitro anthelmintic effects with a micromotility meter', *Veterinary Parasitology*, 24(3–4), s. 241–250.
- Forson, Tetteh-Quarcoo, Ahenkorah, Aryee, Okine, Afutu, Djameh, Agyapong, Anang & Ayeh-Kumi** (2019) 'Ability of vital and fluorescent staining in the differentiation of *Schistosoma haematobium* live and dead eggs', *Medical Sciences*, 7(4), s. 64.

- Fouad Ahmed, Oswald, Caspar, Hieny, Keefer, Sher & James** (1997) 'Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*', *Infection and Immunity*, 65(1), s. 219–226.
- Franssen, Deng, Swart, Marinović, Liu, Liu & van der Giessen** (2021) 'Inactivation of *Trichinella* muscle larvae at different time-temperature heating profiles simulating home-cooking.', *Experimental parasitology*, 224, s. 108099.
- ***Franz** (1988) 'The morphology of adult *Onchocerca volvulus* based on electron microscopy.', *Tropical Medicine and Parasitology*, 39(4), s. 359–66
- GAHI: Global Atlas of Helminth Infections** (2016) 'Global burden | Global Atlas of Helminth Infections', Global Atlas of Helminth Infections. Dostupné z: <http://www.thiswormyworld.org/worms/global-burden> (Navštíveno: 24. 7. 2021).
- Geary, Sims, Thomas, Vanover, Davis, Winterrowd, Klein, Ho & Thompson** (1993) '*Haemonchus contortus*: Ivermectin-Induced Paralysis of the Pharynx', *Experimental Parasitology*, 77(1), s. 88–96.
- Gill, Redwin, Van Wyk & Lacey** (1995) 'Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* - Effects of ivermectin resistance', *International Journal for Parasitology*, 25(4), s. 463–470.
- Gold** (1997) 'Assessment of the viability of *Schistosoma mansoni* schistosomula by comparative uptake of various vital dyes', *Parasitology Research*, 83(2), s. 163–169.
- Gu, Li, Driguez, Zeng, Yu, Sun, Cai, He, Wang & McManus** (2017) 'Clinical diagnostic value of viable *Schistosoma japonicum* eggs detected in host tissues', *BMC Infectious Diseases*, 17(1), s. 1–13.
- Gutiérrez, Stepien, Gutiérrez, Pérez-Hernández, Pardo, Pardo, Grazú & de la Fuente** (2017) 'Nanotechnology in drug discovery and development', In: *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Elsevier, ©2017, s. 264–295, ISBN 978-0-12-803201-5.
- Hayes, Bancroft, Goldrick, Portsmouth, Roberts & Grencis** (2010) 'Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*', *Science*, 328(5984), s. 1391–1394.
- Heath & Smyth** (1970) 'In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. serialis* from oncosphere to cystic larva', *Parasitology*, 61(3), s. 329–343.
- Hemphill, Stadelmann, Scholl, Müller, Spiliotis, Müller, Gottstein & Siles-Lucas** (2010) '*Echinococcus* metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes.', *Parasitology*, 137(3), p. 569–87.
- Van Heuten** (1972) 'Pharmacological aspects of tetramisole', In: *Comparative Biochemistry of Parasites*. Elsevier, ©1972, s. 101-115, ISBN 978-0-12-711050-9.
- Hockley & McLaren** (1973) '*Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm', *International Journal for Parasitology*, 3(1), s. 13–20.
- Hördegen, Cabaret, Hertzberg, Langhans & Maurer** (2006) 'In vitro screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay', *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), s. 85–89.
- Howe, Zöphel, Subbaraman, Unger, Held, Engleitner, Hoffmann & Kreidenweissa** (2015) 'Lactate as a novel quantitative measure of viability in *Schistosoma mansoni* drug sensitivity assays', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), s. 1193–1199.
- Huerta, de Aluja, Fragoso, Toledo, Villalobos, Hernández, Gevorkian, Acero, Díaz, Alvarez, Avila, Beltrán, García, Martínez, Larralde & Sciuotto** (2001) 'Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico', *Vaccine*, 20(1–2), s. 262–266.
- Hyung, Jun, Cha & Kim** (2006) 'A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells', *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1), s. 31–44.

- Ilanchelian & Ramaraj** (2011) 'Binding interactions of toluidine blue O with *Escherichia Coli* DNA: Formation of bridged structure', *Journal of Fluorescence*, 21(4), s. 1439–1453.
- Jackson. & Coop** (2000) 'The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes', *Parasitology*, 120(7), s. 95–107.
- Jain & Sobell** (1984) 'Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution.VIII. structures of two ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complexes containing ethidium: Cytidylyl(3' -5') guanosine', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1(5), s. 1179–1194.
- Jesudoss Chelladurai, Martin, Chinchilla-Vargas, Jimenez Castro, Kaplan & Brewer** (2020) 'Laboratory assays reveal diverse phenotypes among microfilariae of *Dirofilaria immitis* isolates with known macrocyclic lactone susceptibility status.', *PloS one*, 15(8), s. e0237150.
- Jones, Helm & Kusel** (1988) 'Variation in susceptibility of *Schistosoma mansoni* to damage by polycations', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 30(1), s. 35–44.
- Kapuściński & Szer** (1979) 'Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides', *Nucleic Acids Research*, 6(11), p. 3519–3534.
- Kass, Wang, Walrond & Stretton** (1980) 'Avermectin B1a, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(10), s. 6211–6215.
- Kenji, Minoru & Tohru** (1984) 'Viability and infectivity of protoscolices of *Echinococcus multilocularis* stored at different temperatures', *International Journal for Parasitology*, 14(6), s. 577–580.
- Köhler** (1991) 'The pathways of energy generation in filarial parasites', *Parasitology Today*, 7(1), s. 21–25.
- Kopper & Mansfield** (2010) 'Development of improved methods for delivery of *Trichuris muris* to the laboratory mouse', *Parasitology Research*, 107(5), s. 1103–1113.
- Lacey** (1988) 'The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles', *International Journal for Parasitology*, 18(7), s. 885–936.
- Lalli, Guidi, Gennari, Altamura, Bresciani & Ruberti** (2015) 'Development and validation of a luminescence-based, medium-throughput assay for drug screening in *Schistosoma mansoni*', *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), s. e0003484.
- Li Hsü, Hsü, Isacson & Cheng** (1977) '*Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*: Methylene blue test for the viability of schistosomula in vitro', *Experimental Parasitology*, 41(2), s. 329–334.
- Van Der Linden & Deelder** (1984) '*Schistosoma mansoni*: A diamidinophenylindole probe for in vitro death of schistosomula', *Experimental Parasitology*, 57(2), s. 125–131.
- Loghry, Yuan, Zamanian, Wheeler, Day & Kimber** (2020) 'Ivermectin inhibits extracellular vesicle secretion from parasitic nematodes', *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(2), s.e12036.
- Macháček, Šmídová, Pankrác, Majer, Bulantová & Horák** (2020) 'Nitric oxide debilitates the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* in mice, partly by inhibiting its vital peptidases', *Parasites and Vectors*, 13(1), s. 426.
- Magalhães, Machado, Morais, Bueno De Carvalho Moreira, Soares, Da Silva, Da Silva Filho & Rodrigues** (2009) 'In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms', *Parasitology Research*, 104(5), s. 1197–1201.
- Maggiore & Elissondo** (2014) 'In vitro cestocidal activity of thymol on *Mesocestoides corti* tetrathyridia and adult worms', *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, s. 1-14.
- Mahanty, Madrid & Nash** (2013) 'Quantitative screening for anticestode drugs based on changes in baseline enzyme secretion by *Taenia crassiceps*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), s. 990–995.

- Maichomo, Kagira & Walker** (2004) 'The point prevalence of gastro-intestinal parasites in calves, sheep and goats in Magadi division, south-western Kenya', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71(4), s. 257–261.
- Manneck, Braissant, Haggemuller & Keiser** (2011) 'Isothermal microcalorimetry to study drugs against *Schistosoma mansoni*', *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), s. 1217–1225.
- Mansour & Bickle** (2010) 'Comparison of microscopy and alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), s. e795.
- Manzini, Xodo, Barcellona & Quadrifoglio** (1985) 'Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids', *Nucleic Acids Research*, 13(24), s. 8955–8967.
- Maravilla, Garza-Rodriguez, Gomez-Diaz, Jimenez-Gonzalez, Toral-Bastida, Martinez-Ocaña, West, Molina, Garcia-Cortes, Kawa-Karasik, Romero-Valdovinos, Avila-Ramirez & Flisser** (2011) '*Chinchilla laniger* can be used as an experimental model for *Taenia solium* taeniasis', *Parasitology International*, 60(4), s. 364–370.
- Martin, Anderson & Jarrett** (1989) 'Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays.', *Australian veterinary journal*, 66(8), s. 236–240.
- Martin & Le Jambre** (1979) 'Larval paralysis as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*', *Veterinary Science Communications*, 3(1), s. 159–164.
- Marxer, Ingram & Keiser** (2012) 'Development of an in vitro drug screening assay using *Schistosoma haematobium* schistosomula', *Parasites and Vectors*, 5(1), s. 165.
- McElroy & Green** (1956) 'Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 64(2), s. 257–271.
- McKenna** (1996) 'Potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep', *New Zealand Veterinary Journal*, 44(2), s. 73–75.
- Merck** (2001) Merck Index (13), Royal Society of Chemistry, ©2001, ISBN 0-911910-13-1
- Mitsui & Kato** (2018) 'Application of non-fluorescent dyes to assess the antischistosomal effect of antimalarial drugs on *Schistosoma mansoni* adult worms', *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 71(5), s. 382–387.
- Mosmann** (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), s. 55–63.
- Mukherjee, Misra & Chatterjee** (1998) 'Development of in vitro screening system for assessment of antifilarial activity of compounds', *Acta Tropica*, 70(3), s. 251–255.
- Nayak, Gayen, Saini, Mukherjee & Sinha Babu** (2012) 'Molecular evidence of curcumin-induced apoptosis in the filarial worm *Setaria cervi*', *Parasitology Research*, 111(3), s. 1173–1186.
- New England Biolabs** (2005) Wolbachia Genome Project : Sequencing the *Brugia malayi* endosymbiont.
- Novobilský & Höglund** (2015) 'First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), s. 172–177.
- Núñez, Villalobos, Herrera, Navarrete-Perea, Méndez, Martínez-Maya, Bobes, Fragoso, Sciutto, Aguilar & del Arenal** (2018) 'Anti-GK1 antibodies damage *Taenia crassiceps* cysticerci through complement activation', *Parasitology Research*, 117(8), s. 2543–2553.
- O'Brien, Wilson, Orton & Pognan** (2000) 'Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity', *European Journal of Biochemistry*, 267(17), s. 5421–5426.
- van Oordt, Tielens & van den Bergh** (1988) 'The energy metabolism of *Schistosoma mansoni* during its development in the hamster', *Parasitology Research*, 75(1), s. 31–35.
- Pan** (1980) 'The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*', *Journal of Invertebrate Pathology*, 36(3), s. 307–372.

- Panic, Flores, Ingram-Sieber & Keiser** (2015) 'Fluorescence/luminescence-based markers for the assessment of *Schistosoma mansoni* schistosomula drug assays', *Parasites & Vectors*, 8(1), s. 624.
- de Paula Aguiar, Brunetto Moreira Moscardini, Rezende Morais, Graciano de Paula, Ferreira, Afonso, Belo, Tomie Ouchida, Curti, Cunha, Rodrigues & Magalhães** (2016) 'Curcumin generates oxidative stress and induces apoptosis in adult *Schistosoma mansoni* worms.', *PLoS ONE*, 11(11), s. e0167135.
- Paveley, Mansour, Hallyburton, Bleicher, Benn, Mikic, Guidi, Gilbert, Hopkins & Bickle** (2012) 'Whole organism high-content screening by label-free, image-based bayesian classification for parasitic diseases', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), s. 1762.
- Peak, Chalmers & Hoffmann** (2010) 'Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7), s. e759
- Perry & Feil** (1985) 'Observations on a novel hatching bioassay for *Globodera rostochiensis* using fluorescence microscopy', *Revue de Nématologie*, 9(3), s. 280–282.
- Perumal Samy & Ignacimuthu** (2000) 'Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India', *Journal of Ethnopharmacology*, 69(1), s. 63–71.
- Portugal & Waring** (1988) 'Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study', *BBA - Gene Structure and Expression*, 949(2), s. 158–168.
- Premachandran, Von Mende, Hussey & McClure** (1988) 'A method for staining nematode secretions and structures.', *Journal of Nematology*, 20(1), s. 70–78.
- Prichard** (1970) 'Mode of action of the anthelmintic thiabendazole in *Haemonchus contortus*', *Nature*, 228(5272), s. 684–685.
- Ramirez, Bickle, Yousif, Fakorede, Mouries & Nwaka** (2007) 'Schistosomes: Challenges in compound screening', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(1), s. 53–62.
- Randazzo & Costamagna** (2010) 'Coloración de azul de metileno como alternativa para determinar viabilidad de larvas libres de *Trichinella spiralis*', *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), s. 95–97.
- Ranjan, Athar, Vijayakrishna, Meena, Vasita & Jha** (2018) 'Deciphering the anthelmintic activity of benzimidazolium salts by experimental and in-silico studies', *Journal of Molecular Liquids*, 268, s. 156–168.
- Rinaldi, Loukas, Brindley, Irelan & Smout** (2015) 'Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM)', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), p. 141–148.
- Roehm, Rodgers, Hatfield & Glasebrook** (1991) 'An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT', *Journal of Immunological Methods*, 142(2), s. 257–265.
- Rotman & Papermaster** (1966) 'Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(1), p. 134–141.
- Roy, Joardar, Babu & Lyndem** (2020) '*Senna* plant generates reactive oxygen species (ROS) and induces apoptosis in *Hymenolepis diminuta*', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 238 (květen 2019), s. 111297.
- Rundquist, Olsson & Brunk** (1984) 'Cytofluorometric quantitation of acridine orange uptake by cultured cells', *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica - Section A Pathology*, 92(5), s. 303–309.
- Saini, Gayen, Kumar, Nayak, Mukherjee, Mukherjee, Pal & Babu** (2014) 'Antifilarial effect of ursolic acid from *Nyctanthes arbortristis*: Molecular and biochemical evidences', *Parasitology International*, 63(5), s. 717–728.
- Sampson** (1924) 'Determination of the resistance of leukocytes', *Archives of Internal Medicine*, 34(4), s. 490–502.

- Sarvel, A K, Kusel, Araújo, Coelho & Katz** (2006) 'Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*', in *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, ©2006 10(1), s. 289-292, ISSN 1678-8060
- Satou, Koga, Koike, Tada & Nikaido** (2001) 'Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*', *Veterinary Parasitology*, 99(4), s. 311–322.
- Senathilake, Karunanayake, Samarakoon, Tennekoon & de Silva** (2016) 'Rhizome extracts of *Curcuma zedoaria* Rosc induce caspase dependant apoptosis via generation of reactive oxygen species in filarial parasite *Setaria digitata* in vitro', *Experimental Parasitology*, 167, s. 50–60.
- Shen, Lai, Wilson, Chen, Wang, Yu, Li, He, Hide, Sun, Yang, Wu, Ayala & Lun** (2017) 'Nitric oxide blocks the development of the human parasite *Schistosoma japonicum*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(38), p. 10214–10219.
- Silbereisen, Tritten & Keiser** (2011) 'Exploration of novel in vitro assays to study drugs against *Trichuris* spp.', *Journal of Microbiological Methods*, 87(2), s. 169–175.
- Skelly, Stein & Shoemaker** (1993) 'Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60(1), s. 93–104.
- Smout, Kotze, Mccarthy & Loukas** (2010) 'A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), s. e885
- Stringfellow** (1988) 'An in vitro test for drug resistance in *Haemonchus contortus*', *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55(1), s. 19–23.
- Strote, Bokhof & Comley** (1993) 'Viability of *Onchocerca volvulus* in vitro', *Parasitology*, 107(2), s. 175–182.
- Sung & Dresden** (1984) 'Assessment of viability of *Schistosoma mansoni* miracidia by Congo red staining', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(6), s. 1178–1181.
- Sutherland, Leathwick, Brown & Miller** (1997) 'Prophylactic efficacy of persistent anthelmintics against challenge with drug-resistant and susceptible *Ostertagia circumcincta*', *Veterinary Record*, 141(5), s. 120–123.
- Sutherland & Learmonth** (1997) 'The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase', *Free Radical Research*, 27(3), s. 283–289.
- Thomé, Filippi-Chiela, Villodre, Migliavaca, Onzi, Felipe & Lenz** (2016) 'Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy', *Journal of Cell Science*, 129(24), s. 4622–4632.
- Tielens** (1994) 'Energy generation in parasitic helminths', *Parasitology Today*, 10(9), s. 346–352.
- Townson, Tagboto, McGarry, Egerton & Taylor** (2006) '*Onchocerca* parasites and *Wolbachia* endosymbionts: Evaluation of a spectrum of antibiotic types for activity against *Onchocerca gutturosa* in vitro', *Filaria Journal*, 5, s. 1–9.
- Tritten, Braissant & Keiser** (2012) 'Comparison of novel and existing tools for studying drug sensitivity against the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* in vitro', *Parasitology*, 139(3), s. 348–357.
- De Victorica & Galván** (2003) 'Preliminary testing of a rapid coupled methodology for quantitation/viability determination of helminth eggs in raw and treated wastewater', *Water Research*, 37(6), s. 1278–1287.
- Wadsö & Goldberg** (2001) 'Standards in Isothermal Microcalorimetry', *Pure Applied Chemistry*, 73(10), s. 1625–1639.
- Wang** (1974) 'The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium', *Journal of Molecular Biology*, 89(4), s. 783–801.

- Waring** (1965) 'Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids', *Journal of Molecular Biology*, 13(1), s. 269–282.
- Wimmersberger, Tritten & Keiser** (2013) 'Development of an in vitro drug sensitivity assay for *Trichuris muris* first-stage larvae', *Parasites and Vectors*, 6(1).
- Winckler** (1974) 'Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot', *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 6(3), s. III–89.
- Yan, Smout, Ju, Folley, Skinner, Mann, Loukas, Hu, Brindley & Rinaldi** (2018) 'Developmental sensitivity in *Schistosoma mansoni* to puromycin to establish drug selection of transgenic schistosomes', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(8).
- Yang & Hinner** (2015) 'Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins', In: *Methods in molecular biology*, Humana, ©2016, s. 29–53 ISSN 19406029