

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Vliv opakovaného podání flubendazolu na  
biotransformaci anthelmintik u ovce domácí**

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

Hradec Králové, 2008

Martin Rudol

# Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt.....	6
1 Úvod.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Ovce domácí (Ovis aries).....	9
2.2 Helmintózy hospodářských zvířat.....	10
2.2.1 Haemonchóza.....	10
2.3 Anthelmintika.....	11
2.3.1 Benzimidazolová anthelmintika.....	11
2.3.1.1 Flubendazol.....	12
2.4 Biotransformace xenobiotik.....	17
2.4.1 Biotransformační enzymy.....	18
2.4.2 Reakce 1. fáze biotransformace.....	19
2.4.2.1 Redukce xenobiotik.....	19
2.4.2.2 Enzymy redukující karbonylovou skupinu.....	20
2.4.2.2.1 Aldoketoreduktasy.....	20
2.4.2.2.2 Reduktasy se středně dlouhým řetězcem.....	21
2.4.2.2.3 Reduktasy s krátkým řetězcem.....	21
2.4.3 Reakce 2. fáze biotransformace.....	22
2.4.4 Faktory ovlivňující biotransformaci.....	23
2.4.5 Modulace aktivit biotransformačních enzymů.....	24
2.5 Chromatografie.....	25
2.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	26
2.5.1.1 Složení HPLC.....	26
3 Cíl práce.....	30
4 Experimentální část.....	31
4.1 Pokusná zvířata a biologický materiál.....	31
4.2 Přístroje.....	31
4.3 Chemikálie.....	32
4.4 Pracovní postupy.....	33
4.4.1 Příprava pufrů, zásobních roztoků a mobilní fáze.....	33

4.4.2	Příprava subcelulárních frakcí.....	34
4.4.3	BCA stanovení bílkoviny.....	35
4.4.4	Testování <i>in vitro</i> biotransformace flubendazolu.....	36
4.5	HPLC.....	38
4.5.1	Parametry metody.....	38
4.5.2	HPLC analýza vzorků.....	38
5	Výsledky.....	40
6	Diskuze.....	57
7	Závěr.....	62
8	Seznam použitých zkratk.....	63
9	Literatura.....	64

# Abstrakt

Haemonchóza je častá parazitární infekce přežvýkavců vyvolaná vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*). Parazitóza, stejně jako jiné patologické stavy, může ovlivnit aktivitu biotransformačních enzymů a tím i metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Úkolem této diplomové práce bylo testovat a porovnat *in vitro* biotransformaci anthelmintika flubendazolu v játrech a tenkém střevě ovcí zdravých a ovcí postižených haemonchózou. Cílem bylo také zjistit, jaký vliv na biotransformaci flubendazolu má délka infekce a pohlaví zvířat .

Experimentální zvířata byla rozdělena do pěti skupin (zdraví samci, zdravé samice, samice s haemonchózou 7 týdnů, samci s haemonchózou 7 týdnů a samci s haemonchózou 11-týdnů). Z jater a mukózy tenkého střeva experimentálních zvířat byly připraveny subcelulární frakce (cytosol a mikrosomy), které byly inkubovány s flubendazolem. Po inkubaci a extrakci bylo množství flubendazolu a jeho metabolitů analyzováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Parazitóza ovcí způsobená vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*) ovlivnila *in vitro* biotransformaci flubendazolu. V játrech a střevech zvířat postižených haemonchózou byly zjištěny nižší aktivity enzymů katalyzujících přeměnu flubendazolu na redukovaný flubendazol než v játrech i střevech zdravých zvířat. Na *in vitro* biotransformaci flubendazolu měla vliv i délka infekce zvířat. V jaterních vzorcích byla aktivita reduktas flubendazolu u skupiny zvířat se 7-týdenní infekcí nižší než u skupiny 11 týdnů nemocných jedinců, zatímco ve střevních vzorcích měli berani nemocní kratší dobu vyšší aktivitu reduktas flubendazolu než dlouhodobě nemocní.

Byl zjištěn výrazný rozdíl v *in vitro* metabolismu flubendazolu mezi berany a ovcemi. Jaterní i střevní cytosol samců vykazoval významně vyšší aktivitu reduktas flubendazolu než cytosol samic.

Haemonchosis is common parasitic infection of small ruminants caused by *Haemonchus contortus*. Parasitosis, as well as the other pathological states, can affect the activity of biotransformation enzymes, which can result in changes of drugs and other xenobiotics metabolism. The aim of this project was to study and compare *in vitro* flubendazole biotransformation in liver and small intestine of healthy sheep and sheep with haemonchosis . The objective of this work was also to investigate the influence of infection length and animals gender on the flubendazole biotransformation .

Experimental animals were divided into five groups (healthy males, healthy females, males diseased for seven weeks, females diseased for seven weeks and males diseased for eleven weeks). Subcellular fractions (cytosol and microsomes) were prepared from liver and mucosa of small intestine. These fractions were incubated with flubendazole. After incubation and extraction, flubendazole and its metabolites were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Parasitosis of the sheep caused by *Haemonchus contortus* influenced *in vitro* biotransformation of flubendazole. In livers and small intestines of animals with haemonchosis, activities of flubendazole reducing enzymes were lower than in healthy animals. *In vitro* biotransformation of flubendazole was influenced by the infection length too. In liver samples from animals diseased for seven weeks, the activities of flubendazole reductases were lower than in eleven-week-diseased animals. In intestinal samples from seven-week-diseased animals, activity of flubendazole reductases was found higher than in eleven-week-diseased animals.

In flubendazole metabolism *in vitro*, the significant differences between males and females were observed. Much higher activities of flubendazole reductases were detected in cytosol from rams than in cytosol from ewes.

# 1 Úvod

Choroby způsobené červy jsou aktuální u všech obratlovců. Parazitičtí helminté způsobují v živočišné produkci značné ekonomické ztráty. Snižují výnosy masa, mléka i vlny, dochází k úhynům zvířat. Většina těchto ztrát je zapříčiněna gastrointestinálními parazity. Mezi nejrozšířenější a ekonomicky nejzávažnější nákazy patří i haemonchóza, jejímž původcem je vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*). Tento parazit je rozšířen téměř celosvětově. Největší výskyt onemocnění způsobených vlasovkou je v teplých oblastech s dostatkem srážek, ale tyto infekce postihují také hospodářská zvířata v oblastech vyloženě suchých a také můžeme na onemocnění způsobené *Haemonchem* narazit i v zemích blízko polárního kruhu. Typickými příznaky infekce bývá vyhublost a anémie, přičemž může dojít až k úhynu zvířete.

Mezi nejčastěji používané látky při léčbě haemonchózy patří benzimidazolová anthelmintika, mezi která můžeme zařadit i flubendazol. Tento derivát benzimidazolu je celosvětově rozšířen především ve veterinární medicíně.

Patologické stavy, včetně parazitóz, mohou modulovat (indukovat nebo inhibovat) biotransformační enzymy. V případě indukce dochází ke zvýšení metabolické aktivity enzymů. U inhibice je tomu přesně naopak, dochází ke snížení aktivity biotransformačních enzymů. Tyto jevy mohou změnit farmakologické a toxikologické účinky léčiv. Může např. dojít ke zvýšení plazmatické hladiny léčiva s rizikem toxického působení nebo naopak ke snížení plazmatické koncentrace se snížením terapeutického efektu, což může mít za následek až selhání léčby. U potravinových zvířat je navíc riziko nečekaného prodloužení eliminace léčiva a jeho metabolitů či změny metabolické cesty, což může zapříčinit přítomnost cizorodých látek v živočišném produktu. Proto je třeba studovat biotransformaci anthelmintických léčiv nejen u zdravých jedinců, ale také u zvířat postižených parazitózou. V předložené diplomové práci byla studována a porovnávána biotransformace benzimidazolového anthelmintika flubendazolu u zdravých ovcí a u ovcí postižených haemonchózou.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Ovce domácí (*Ovis aries*)

Vědecká klasifikace

- Říše: živočichové (Animalia)
- Kmen: strunatci (Chordata)
- Třída: savci (Mammalia)
- Řád: sudokopytníci (Artiodactyla)
- Podřád: přežvýkaví (Ruminantia)
- Čeleď: turovítí (Bovidae)
- Podčeleď: kozy a ovce (Caprinae)
- Rod: ovce (*Ovis*)
- Druh: *Ovis aries*, plemeno Merino landschaf

Biologické údaje:

- Název pohlaví (označení kastráta): bahnice, beran (skopec)
  - Pohlavní dospělost (měsíc): 5 – 9
  - Délka říje / cyklu (dny): 1 – 2 / 17
  - Povaha cyklu (období roku): sezónní polyestrie (léto, podzim)
  - Délka březosti (dny): 150
  - Označení porodu / počet mláďat: bahnění / 1 – 3
  - Hmotnost narozeného mláděte (kg): 1,5 – 3,5
- (Lamka a Ducháček, 2006)

Ovce domácí je malým domestikovaným přežvýkavcem, chovaným hlavně pro vlnu, maso a mléko. Výjimečně se používaly nebo používají i pro dopravu lehčích břemen. Protože nejsou tak náročné jako skot, chovají se i v horských nebo suchých oblastech (<http://www.wikipedia.org>).

Ovce byla domestikována již v mladší době kamenné. Bylo zjištěno, že se běžně vyskytovala v Jerichu už v 7. tisíciletí př. Kr. V jiných částech Asie byla domestikovaná forma chována od 4. tisíciletí př. Kr., na Sibiři od konce 3. tisíciletí př. Kr. a v Číně od první poloviny 2. tisíciletí př. Kr. Na území českých zemí

nacházíme nálezy ovčích kostí z nejstaršího období doby měděné (<http://www.savci.upol.cz/teorie/domest.htm>).

Ovce jsou stádní zvířata a obvykle se vyskytují ve skupinách velkých od dvou do sto kusů. Jsou to velmi tichá, neagresivní zvířata s rozvinutým sociálním chováním

([www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis\\_ammon.html](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_ammon.html)).

## 2.2 Helmintózy hospodářských zvířat

Helmintózy jsou infekční choroby způsobené červy nebo jejich infekčními stádii. Zvířata jsou hostitelem červů, jejichž vývojové cykly probíhají ve vnitřním prostředí hostitele a mezihostitele (biohelmintózy) nebo v životním prostředí zvířat (geohelmintózy). Vztah červa a hostitele je vztahem parazitickým. Choroby způsobené červy jsou aktuální u všech obratlovců, negativními dopady parazitózy zvířat jsou nepřímé i přímé ztráty v jejich užitkovosti (chovatelská, produkční, reprodukční) (Lamka a Ducháček, 2006).

Nejrozšířenější helmintózy jsou působeny třemi třídami červů: tasemnicemi (Cestodes), hlísticemi (Nematodes) a motolicemi (Trematodes) (Lamka a Ducháček, 2006).

Prevence a léčba helmintóz zvířat zahrnuje kombinaci zoohygienických opatření a využívání velmi rozsáhlé skupiny léčiv s anthelmintickými účinky (Lamka a Ducháček, 2006).

### 2.2.1 Haemonchóza

Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) - vědecká klasifikace:

- říše: živočichové (Animalia)
- kmen: hlístice (Nematoda)
- třída: Secernentea
- řád: měchovci (Strongylida)
- čeleď: Trichostrongylidae
- rod: Haemonchus
- druh: Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*)



Vlasovka slézová je běžně se vyskytující parazit a je to jeden z nejvíce patogenních nematod přežvýkavců. Dospělý červ žije v mukóze poslední části žaludku přežvýkavců, slézu, a živí se krví ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Samičky mohou naklást za jeden den přes 5000 vajíček, která jsou dále vylučována z těla hostitele společně s výkaly. Po vylíhnutí z vajíčka vzniká několik larválních stádií, které vyústí v L3 formu, která je pro zvířata infekční ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). K nákaze dojde náhodným pozřením potravy kontaminované larvami helmintů (Kořínková K., 2006). Přes gastrointestinální trakt se larvy dostanou až do slézu, kde vzniká konečné dospělé stádium, které může způsobovat vyhublost, anémii nebo až smrt infikovaných zvířat (Ghisi et al., 2007).

Haemonchóza způsobuje rozsáhlé ekonomické ztráty farmářům na celém světě, obzvláště v teplých klimatických oblastech, kde jsou nejpříznivější podmínky pro život vlasovky slézové ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Léčba haemonchózy je založena na podávání anthelmintik, ale velkým problémem je zvyšující se rezistence vůči těmto chemickým agens ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

## **2.3 Anthelmintika**

Anthelmintika jsou látky používané pro eliminaci helmintů z organismu. Většinou jsou to látky syntetického, někdy biosyntetického původu (Lamka a Ducháček, 2006). Podobně jako helminti jsou dělena také anthelmintika. Proti tasemnicím se používají anticestoda, proti hlísticím antinematoda a proti motolicím antitrematoda (Lincová et al., 2002). Mnohá anthelmintika mohou mít současně účinky proti více třídám červů nebo i proti původcům zevních parazitóz. Antiparazitární přípravky jsou často založeny na kombinaci anthelmintik nebo anthelmintik a antiectoparazitik (Lamka a Ducháček, 2006).

### **2.3.1 Benzimidazolová anthelmintika**

Benzimidazolová anthelmintika jsou veterinární léčiva široce používaná pro prevenci a léčbu parazitických infekcí. Mezi první objevené benzimidazoly patří thiabendazol, který byl uveden do praxe přibližně před 40 lety a široce se používal

proti gastrointestinálním hlísticím. Později se objevily alternativy thiabendazolu např. mebendazol a také benzimidazoly obsahující sulfidickou a sulfoxidovou funkční skupinu. Tyto benzimidazoly nabízely širší spektrum účinku a vyšší účinnost. Do této skupiny můžeme zařadit např. albendazol. (Danaher et al., 2007)

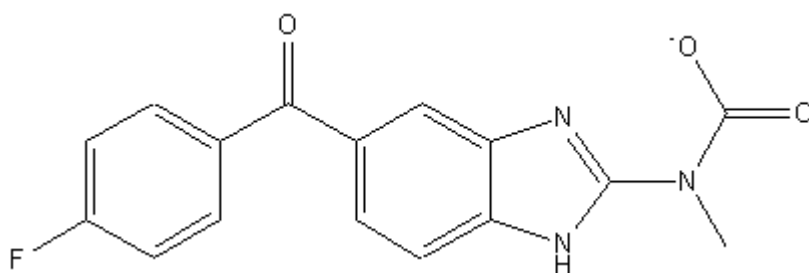
Benzimidazoly jsou léčiva s antinematodní, z části s antitrematodní i anticestodní (výjimečně i antimykotickou) aktivitou. Používají se především ve veterinární medicíně, pro tuto indikaci jim patří dle ATC klasifikace kód Q09AA (veterinária-anthelmintika). V humánní medicíně se z derivátů benzimidazolu k terapii helmintóz používají pouze mebendazol, albendazol a thiabendazol, kód ATC je P02CA (Velík et al., 2004).

Mechanismus účinku je založen na inhibici  $\beta$ -tubulinových subjednotek nezbytných pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Jejich narušená tvorba se projeví žádoucím poškozením funkčnosti celé parazitární buňky. Afinita benzimidazolů k parazitárnímu typu  $\beta$ -tubulinu je mnohonásobně vyšší než k  $\beta$ -tubulinu buňek ošetřovaných zvířat, což umožňuje účinné dávkování benzimidazolů bez vedlejších projevů u léčených zvířat (Lamka a Ducháček, 2006).

Většina léčiv této skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky i ovocidně. Anthelmintická aktivita je závislá na délce přetrvávání terapeutických koncentrací v tělních tekutinách a tkáních. U monogastričních zvířat (např. kočka, pes, prase) je třeba využít pro dosažení požadované účinnosti léčiva jeho opakovaného podání, u polygastričních zvířat (skot, ovce, kůň) lze benzimidazoly podávat i jednorázově. (Lamka a Ducháček, 2006).

### **2.3.1.1 Flubendazol**

Flubendazol, chemicky methyl-[5-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát, je důležitý zástupce benzimidazolových anthelmintik. Sumární vzorec:  $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ .



Obr.1. Strukturní vzorec flubendazolu (překresleno dle <http://www.wikipedia.org>)

Flubendazol je širokospektré anthelmintikum vhodné pro použití jak v humánní, tak veterinární medicíně. V dnešní době slouží pouze jako veterinární léčivo. Používá se pro léčbu parazitických onemocnění hlavně u prasat, dále u kuřat, krocánů a lovných ptáků (Moreno et al., 2004).

### Fyzikálně-chemické vlastnosti

Flubendazol je fluor-analog mebendazolu, z toho vyplývá, že tyto dvě látky mají velmi podobné vlastnosti. Jako čistá chemická látka je flubendazol šedobílý až nažloutlý prášek. Molekulová hmotnost je 313,29. Flubendazol je jen velmi málo rozpustný ve vodě (<10 mg/l). Rozpustnost v organických rozpouštědlech (ethanol, diethyleter, dichlormethan, hexan, toluen) je taky nízká. Flubendazol je lépe rozpustný v kyselině mravenčí (340,5 g/l), dimethylsulfoxidu (15 g/l) a dimethylformamidu (5,6 g/l). Rozdělovací koeficient oktanol-voda, vyjádřený jako  $\log P$ , je 3,0. Flubendazol má dvě ionizační konstanty  $pK_{a1}=3,6$  (imidazolový dusík) a  $pK_{a2}=9,6$  (karbamátový dusík) (Lampo et al., 1996).

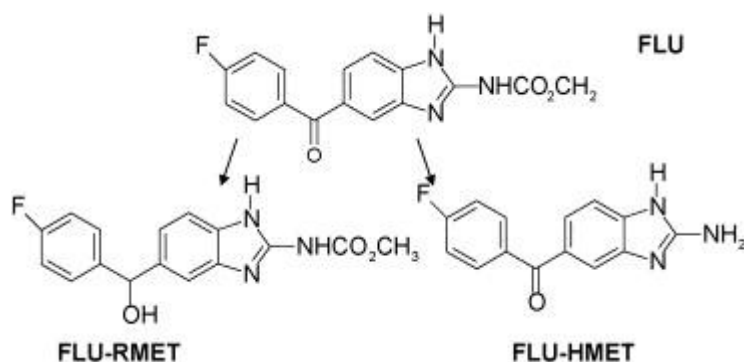
### Aplikace

Z důvodu velmi malé rozpustnosti ve vodě nemůže být flubendazol podáván parenterálně, je vhodný pouze pro perorální aplikaci (Nobilis et al., 2007). Dostupných je několik lékových forem jako tablety, pasta, pelety nebo premix pro přípravu medikovaných krmiv (Moreno et al., 2004).

### Distribuce a metabolismus

Po perorálním podání se flubendazol pouze omezeně vstřebává z gastrointestinálního traktu (GIT). V játrech stejně jako v GIT podléhá

biotransformaci. Při hydrolýze dochází k dekarbamoylaci a vzniká hydrolyzovaný flubendazol. Druhou biotransformační reakcí je redukce, při které dochází k redukcí karbonylové skupiny a vzniká redukovaný flubendazol. Metabolity a nezměněná parentní látka jsou vylučovány do žluči a následně exkretovány ve fekáliích. Přibližně 2% dávky jsou vylučovány v nezměněné formě nebo jako metabolity do moči (Nobilis et al., 2007).



Obr.2. Hlavní metabolity flubendazolu (Danaher et al., 2007)

### Spektrum účinku

Flubendazol je anthelmintikum se širokým spektrem a vysokou účinností proti všem významným druhům helmintů vyskytujících se u prasat. U prasat byla anthelmintická aktivita flubendazolu hodnocena na základě 61 klinických pokusů, které byly provedeny v různých podmínkách chovu, včetně základních stád (prasnice a kanci), odstavu a výkrmu. Pomocí flubendazolu, s využitím různých léčebných plánů, mohou být efektivně léčeny všechny významné druhy helmintóz: *Ascaris suum* (škrkavka prasečí), *Oesophagostomum dendatum* (zubovka prasečí), *Hyostrongylus rubidus* (vlasovka prasečí), *Metastrongylus apri* (plicnivka prasečí), *Strongyloides ransomi* (hádě prasečí) a *Trichuris suis* (tenkohlavec prasečí). Účinnost léčby se pohybuje kolem 95-100% (Janssen Animal Health).

Tab.1. Přehled výsledků pokusů

Druhy helmintů	Účinnost proti dospělým stádiím	Účinnost proti vývojovým stádiím	Ovocidní účinnost
<i>Ascaris suum</i>	+++	+++	+++
<i>Oesophagostomum dendatum</i>	+++	+++	+++
<i>Hyostromylus rubidia</i>	+++	+++	+++
<i>Metastrongylus apri</i>	+++	ND	ND
<i>Strongyloides ransomi</i>	+++	ND	ND
<i>Trichuris suis</i>	+++	ND	ND

+++ = 95% až 100% účinnost, ND = data nejsou dostupná

Z předcházející tabulky vyplývá, že flubendazol je silné anthelmintikum, které zabíjí dospělé helminty, jejich nedospělá stádia a stejně tak i jejich vajíčka (Janssen Animal Health).

### Toxikologie flubendazolu

Flubendazol byl testován v několika studiích na toxicitu: studie akutní a subchronické toxicity, reprodukční studie (neplodnost, embryotoxicita, teratogenita, před- a poporodní toxicita), mutagenita (*in vivo* a *in vitro*), karcinogenita a tolerance (Lampo et al., 1996).

Zvýšené dávky byly testovány u kanců, prasnic, selat a výkrmu. Nepodařilo se prokázat žádné nežádoucí účinky na chování, růst, konverzi krmiva nebo některý z reprodukčních parametrů (Janssen Animal Health).

Kanci byli před připouštěním ošetřováni dávkou 3mg/kg denně po dva měsíce a prasnice byly ošetřovány v období od říje do porodu stejnou dávkou. Nebyly prokázány žádné nežádoucí účinky na reprodukční výkon, které by souvisely s léčivem (Janssen Animal Health).

Bez jakýchkoliv záporných vlivů na reprodukci byly prasnice od 8. do 50. dne březosti ošetřovány denně dávkou 30 ppm flubendazolu v krmivu.

Bez vedlejších účinků byly prasnice ošetřovány během celé březosti dávkou 200 ppm flubendazolu v krmivu.

Bez vedlejších účinků na reprodukci dostávaly prasnice denně, během prvních 10 týdnů březosti, 50 mg flubendazolu/kg ž. hm.

Specifické experimenty také prokázaly, že flubendazol nemá žádný mutagenní ani teratogenní potenciál.

Stejně vysoká úroveň tolerance byla demonstrována i u dalších zvířecích druhů, jako jsou psi, kočky, kuřata, krůty, perličky a bažanti (Janssen Animal Health).

### **Bezpečnost pro spotřebitele**

Na základě výsledků bezpečnostních a farmakokinetických studií Evropské komise bylo možno stanovit maximální reziduální limity (MRL), které mohou být obsaženy v tkáních určených k potravinovým účelům, a které nepředstavují zdravotní rizika pro spotřebitele (Janssen Animal Health).

Tab.2. Stanovené hodnoty MRL flubendazolu

svalovina	50 µg/kg
kůže + tuk	50 µg/kg
játra	400 µg/kg
ledvina	300 µg/kg

U prasat léčených obvyklou dávkou (30 ppm flubendazolu v krmivu po 5 respektive 10 dnech) může být doporučena ochranná lhůta 5 dní. Je však důležité zdůraznit, že za stanovení ochranných lhůt pro léčivé přípravky odpovídají místní, národní autority. Pro prasata je v České republice stanovena ochranná lhůta 5 dní a na Slovensku 14 dní (Janssen Animal Health).

## 2.4 Biotransformace xenobiotik

Biotransformace je nedílnou součástí farmakokinetického procesu. Obecným principem biotransformace je změna struktury léčiva (xenobiotika) s cílem usnadnit jeho eliminaci z organismu. Biotransformační přeměnou vzniká nová látka (metabolit, konjugát), která má pozměněnou strukturu a jiné fyzikálně-chemické vlastnosti. Tím však může získat i jinou biologickou aktivitu a její chování v organismu může být odlišné od chování původní látky. Aktivita biotransformačních enzymů zásadním způsobem ovlivňuje toxikologické a farmakologické vlastnosti léčiva. Znalost enzymů, které jsou zodpovědné za biotransformaci každého potenciálního léčiva, má velký význam pro předpověď a poznání nežádoucích účinků a interakcí. V popředí vědeckého zájmu je proto poznání biotransformačních enzymů, pochopení mechanismů jednotlivých reakcí a využití těchto znalostí při vývoji nových léčiv s maximálními účinky žádoucími a minimem účinků nežádoucích (Szotáková, 2005).

Biotransformační přeměny a její důsledky jsou náplní jednoho z biochemických oborů – xenobiochemie. Ta studuje metabolické přeměny látek tělu cizích a enzymy, které tyto přeměny katalyzují. Zkoumá vlivy, které aktivitu biotransformačních enzymů mohou měnit. Odhaluje strukturu i vlastnosti metabolitů xenobiotik, zvláště jejich biologickou aktivitu. Přispívá k pochopení mechanismu účinku xenobiotika a studuje jejich vliv na důležité metabolické cesty endogenních látek (eobiotik) (Kvasničková, 1995).

Z hlediska farmakologického účinku léčiva může při biotransformaci dojít ke dvojí přeměně: 1) biodeaktivaci, kdy vytvořený metabolit nebo konjugát léčiva má nižší nebo žádný biologický účinek a 2) bioaktivaci, kdy se původní léčivo mění na metabolit, který je farmakologicky více účinný nebo toxický (Lincová et al., 2002).

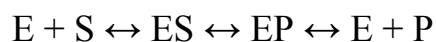
Metabolismus xenobiotik lze rozčlenit do několika fází. V první fázi jsou do struktury xenobiotika oxidačními, redukčními nebo hydrolytickými reakcemi zavedeny či odhaleny reaktivnější funkční skupiny. V druhé fázi dochází ke konjugaci s endogenními sloučeninami. Za třetí fázi metabolismu xenobiotik je v současné době považován transport xenobiotik a jejich metabolitů či konjugátů přes cytoplazmatickou membránu pomocí membránových přenašečů (Velík et al., 2004).

## 2.4.1 Biotransformační enzymy

Téměř všechny reakce v živých organismech jsou umožňovány katalytickým efektem biologických katalyzátorů – enzymů. Ty pracují jako ostatní („nebiologické“) katalyzátory, ale v některých důležitých aspektech se od nich liší. Jsou vysoce účinné – reakční rychlost enzymově katalyzovaných reakcí bývá někdy až o několik řádů vyšší. Umožňují reakce i za mírných podmínek – za poměrně nízkých teplot, za normálního atmosférického tlaku a při neutrálních hodnotách pH. Jsou snadno regulovatelné, což je pro život za měnících se podmínek okolí nezbytně nutné (Ledvina et al., 2004).

Svou povahou jsou to bílkoviny. Část molekuly, která je pro reakci zcela nezbytná, se nazývá aktivní centrum enzymu. Bílkovinná část molekuly se nazývá apoenzym. Některé enzymy mají navíc nebílkovinnou součást (koenzym). Jako koenzymy obvykle slouží deriváty vitamínů skupiny B. Koenzym se obvykle váže v blízkosti aktivního centra a intenzivně se účastní katalyzované reakce. Sem se vážou i induktory a inhibitory, které významně ovlivňují rychlost enzymové reakce (viz dále) (Ledvina et al., 2004).

Látka, jejíž přeměnu enzym katalyzuje, se nazývá substrát (S), který je následně přeměňován na produkt (P). Je nutné si uvědomit, že enzym není pasivním účastníkem reakce, ale velice aktivně se na ní podílí. Vytváří se substrátem komplex enzym-substrát (ES), který je přeměněn na komplex enzym-produkt (EP), a po jeho rozštěpení se enzym uvolňuje v původní podobě, schopný katalyzovat přeměnu další molekuly substrátu (Ledvina et al., 2004):



Hlavním místem biotransformace léčiv jsou játra (avšak i jiné orgány, např. ledviny, gastrointestinální trakt, kůže, plíce), která mají významnou metabolickou aktivitu. Přeměna léčiv v játrech je velmi důležitá pro léčiva podávaná perorálně. „Efekt prvního průchodu játry“ významně limituje dostupnost léčiv silně metabolizovaných v játrech. Enzymy s biotransformační aktivitou jsou v buňce umístěny především v endoplazmatickém retikulu a cytosolu, ale tato aktivita byla zjištěna také v mitochondriích, v membráně buněčného jádra a plazmatické membráně (Katzung, 1994).



## 2.4.2 Reakce 1. fáze biotransformace

Jak již bylo zmíněno, do první fáze biotransformace můžeme zařadit reakce oxidační, redukční a hydrolytické.

Při oxidačních reakcích dochází k zavedení hydroxylové skupiny do struktury léčiva, tvorbě epoxidů, N-oxidů či S-oxidů, dealkylaci, deaminaci, dehalogenaci, desulfuraci v závislosti na chemické struktuře původního léčiva. Všechny tyto reakce vyžadují přítomnost molekulárního kyslíku a koenzymu NADPH event. NADH. Katalýzu zprostředkovává převážně enzymatický systém cytochromů P450 a flavinové monooxygenasy. Kromě těchto enzymatických systémů jsou oxidační reakce katalyzovány i pomocí jiných enzymů. Mezi nejvýznamnější patří alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, xanthinoxidasa nebo aminooxidasy (Gibson a Skett, 2001).

Redukční reakce jsou katalyzovány cytosolickými i mikrosomálními enzymy. Tyto reakce vyžadují NADPH nebo NADH. Při redukčních reakcích se redukuje karbonylová, nitro- a azoskupina, N-oxidy, sulfoxidy či dochází k redukční dehalogenaci. Těchto reakcí se účastní např. alkoholdehydrogenasa, aldo/ketoreduktasy, nitro- a azoreduktasy, glutathionreduktasa, cytochromy P450 a další (Lincová et al., 2002).

K reakcím hydrolytickým patří hydrolytické štěpení esterové vazby, vazby C-N (amidy, karbamáty, hydrazidy) a hydrolytická dehalogenace. Zúčastněné enzymy jsou např. arylesterasy, karboxyesterasy, acetylerasy, karboxyamidasy či epoxidhydrólasy (Lincová et al., 2002).

### 2.4.2.1 Redukce xenobiotik

V živočišném organismu jako v organismu striktně aerobním jsou obecně preferovány spíše oxidační než redukční procesy. Stejně tak i v metabolismu xenobiotik mají oxidační přeměny kvantitativně největší význam. V posledních letech ale bylo zjištěno, že i redukce patří k hlavním metabolickým přeměnám řady významných léčiv a jiných xenobiotik, proto jsou nyní intenzivně studovány mechanismy redukčních přeměn a enzymové systémy, které tyto reakce katalyzují (Szoťáková, 2005).

Během redukční přeměny enzym mění fyzikálně-chemické vlastnosti xenobiotika, což následně může ovlivnit celý farmakologický resp. toxikologický proces i konečné důsledky. Redukcí xenobiotika tak může dojít (Parkinson, 2001):

- k deaktivaci xenobiotika
- k aktivaci xenobiotika
- k detoxikaci xenobiotika
- k toxikaci xenobiotika

#### **2.4.2.2 Enzymy redukující karbonylovou skupinu**

Enzymy podílející se na redukci karbonylu jsou řazeny do tří proteinových nadrodin:

- dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)
- dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
- aldoketoreduktasy (AKR)

(Jez a Penning, 2001)

Charakteristickou vlastností reduktas je jejich subcelulární lokalizace v cytosolu. Společným rysem všech reduktas karbonylu je jejich závislost na pyridinových nukleotidech. Většina z těchto enzymů preferuje jako koenzym NADPH, výjimkou je např. alkoholdehydrogenasa, která využívá NADH (Testa, 1995).

##### **2.4.2.2.1 Aldoketoreduktasy (AKR)**

Aldoketoreduktasy jsou nadrodinou NADPH-dependentních oxidoreduktas s mnoha fyziologickými úlohami. Nacházejí se u obratlovců, bezobratlých, rostlin, prvoků, hub i u bakterií. Typický zástupce nadrodiny je monomerní  $(\alpha/\beta)_8$ -barelový protein s asi 320 aminokyselinovými zbytky, který využívá NADPH a metabolizuje širokou škálu substrátů v aktivním centru obsahujícím katalytickou tetradu tyrosinu, lysinu, aspartátu a histidinu (Jez a Penning, 2001).

Původně byly enzymy označovány jménem podle substrátové specifiky. To ale vedlo k určitým nejasnostem, proto byla navržena nová klasifikace AKR na základě porovnání aminokyselinové sekvence. Tato nomenklatura je systematická a flexibilní a dovoluje zařazovat další nové členy do této rostoucí enzymové nadrodiny (Jez et al., 1997).

#### **2.4.2.2.2 Reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)**

##### **Alkoholdehydrogenasy (ADH)**

Alkoholdehydrogenasy jsou enzymy, které se účastní metabolismu alkoholu (hlavně ethanolu). Byly nalezeny dva hlavní systémy – mikrosomální cytochrom P450 (CYP2E1) a cytosolická alkoholdehydrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1) (Deuster et al., 1999). Substrátová specifita ADH zahrnuje jak alifatické alkoholy, tak aromatické i alicyklické hydroxylové sloučeniny, endogenní i exogenní (Oppermann a Maser, 2000).

Rozlišujeme osm podrodin ADH s různou tkáňovou distribucí a substrátovou specifitou. Většina z nich využívá jako koenzym NAD. U člověka byly nalezeny tři isoformy ADH1 (ADH1A, ADH1B, ADH1C), u hlodavců pouze jedna isoforma (Deuster, 2000).

##### **Aldehyddehydrogenasy (ALDH)**

Enzymy z ALDH rodiny katalyzují NADP-dependentní oxidace aldehydů. Rodinu tvoří 12 různých podrodin ALDH s různou substrátovou specifitou, strukturálními vlastnostmi a tkáňovou distribucí. Podjednotky ALDH mají obvykle 500 aminokyselinových zbytků a jejich aktivní místo obsahuje katalytický cystein. Aldehyddehydrogenasy se účastní katalýzy reakcí ve třech různých fyziologických úlohách: detoxikace, intermediární metabolismus a osmotická ochrana buněk (Petersen a Lindahl, 1997).

#### **2.4.2.2.3 Reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)**

SDR enzymy obsahují asi 250 aminokyselinových zbytků a většinou jsou v dimerní nebo tetramerní formě (Jornvall et al., 1995). Dalším charakteristickým strukturálním znakem je tetráda Asn, Ser, Tyr, Lys v aktivním místě SDR (Oppermann et al., 2003).

##### **Karbonylreduktasa (CR)**

Redukce karbonylu je zprostředkována *in vivo* nejen dehydrogenasami, ale také množstvím enzymů působících jako reduktasy. Karbonylreduktasami jsou souhrnně nazývány aldehydreduktasy a ketoreduktasy, jež tvoří skupinu enzymů známou jako karbonylreduktasa (CR). CR katalyzují NADPH-dependentní redukce

řady biologicky a farmakologicky aktivních substrátů, endogenních látek i xenobiotik (Testa, 1995).

Karbonylreduktasy byly nalezeny v každé analyzované tkáni. Nacházejí se u bakterií, kvasinek, hmyzu, rostlin i živočichů. U člověka se vyskytují ve všech tkáních, nejvyšší aktivitu však vykazují v játrech, tenkém střevě, mozku a ledvinách. Subcelulární lokalizace karbonylreduktas je primárně cytosolická (Forrest a Gonzales, 2000).

### 2.4.3 Reakce 2. fáze biotransformace

Biotransformační reakce 2. fáze se nazývají reakce konjugační nebo syntetické. Při nich dochází za účasti enzymů, obecně zvaných transferasy, k vytvoření kovalentní vazby mezi funkční skupinou původního léčiva či metabolitu z 1. fáze a konjugačním činidlem. Konjugační činidla vznikají v těle z živin v procesu intermediárního metabolismu. Vytvářejí se polární konjugáty, ve většině případů neaktivní, které jsou rychle vylučovány do moče nebo stolice. Někdy ale mohou vzniknout i toxicky působící konjugáty. Konjugáty léčiv s vyšší molekulovou hmotností se vylučují z větší části do žluče a mohou se v přítomnosti střevních reduktas štěpit na původní látku. Konjugační reakce probíhají zejména v játrech, ledvinách nebo plicích (Lincová et al., 2002).

Tab.3. Přehled 2. fáze biotransformace (Gibson, Skett, 2001)

Typ konjugace	Endogenní látka	Transferása
Glukuronidace	UDP-glukuronová kyselina	UDP-glukuronyltransferasa
Acetylace	Acetyl-CoA	N-acetyltransferasa
Konjugace s glutathionem	Glutathion	GSH-S-transferasa
Konjugace s glycinem	Glycin	Acetyl-CoA-glycintransferasa
Konjugace se sulfátem	Fosfoadenosyl-	Sulfotransferasa
Metylace	S-adenosylmethionin	Transmetylasy

## 2.4.4 Faktory ovlivňující biotransformaci

Biotransformaci xenobiotik ovlivňuje řada faktorů fyziologických i patologických. Tyto faktory lze rozdělit na dvě hlavní skupiny: faktory inter- a intraindividuální. Faktory interindividuální podmiňují rozdíly v biotransformaci xenobiotik u různých jedinců, během života jedince však zůstávají neměnné. Mezi tyto faktory můžeme zařadit druh, pohlaví, genetické predispozice. Faktory intraindividuální rovněž způsobují změny v biotransformaci xenobiotik a během života jedince se mění. Do této skupiny můžeme zařadit např. věk, biologické rytmy, hormonální změny, těhotenství, patologické stavy, výživa, medikace, životní prostředí, stres, kouření nebo alkohol (Testa, 1995).

Všechny tyto faktory způsobují obrovskou variabilitu v zastoupení a aktivitě biotransformačních enzymů a jsou příčinou velkých rozdílů v biotransformaci xenobiotik u různých jedinců. Tyto rozdíly mohou být jak kvantitativní tak kvalitativní. V případech kvantitativního rozdílu je k přeměně xenobiotika využívaná stejná metabolická cesta, pouze se liší rozsah přeměny. Kvalitativní rozdíly jsou způsobené zapojením odlišných metabolických drah do biotransformace xenobiotika. Variabilita v metabolismu léčiv je často příčinou selhání terapie či mnohých nečekaných a nežádoucích reakcí na léčiva (Szotáková, 2005).

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující metabolismus xenobiotik patří druhově specifický výskyt biotransformačních enzymů. Výzkum metabolických přeměn xenobiotik je z největší části založen na experimentální práci s laboratorními zvířaty *in vivo* a *in vitro*. Hlavním problémem v extrapolaci dat získaných z pokusů na laboratorních zvířatech jsou značné mezidruhové rozdíly v zastoupení a aktivitě příslušných enzymů způsobené různou hladinou exprese genů kódujících biotransformační enzymy. Změny (někdy zcela nepatrné) v aminokyselinovém složení jsou příčinou velkých mezidruhových rozdílů v substrátové specifitě a v indukovatelnosti daného enzymu (Szotáková, 2005).

Kromě mezidruhových rozdílů v metabolismu xenobiotik existují i rozdíly mezi příslušníky jednoho druhu. Tento jev se nazývá genetický polymorfismus (Gibson G.G., Skett P., 2001). Klasický případ genetického polymorfismu je N-acetylace antituberkulotika izoniazidu. Z hlediska rychlosti eliminace izoniazidu acetylací můžeme pacienty rozdělit do dvou skupin: rychlí a pomalí acetylátoři. Příčinou je enzym N-acetyltransferasa, který má v játrech pomalých acetylátorů

zřetelně sníženou aktivitu ve srovnání s aktivitou nalezenou u acetylátorů rychlých. Toto je velice významné hlavně pro pacienty, kteří metabolizují izoniazid pomalu, protože je u nich velká pravděpodobnost kumulace léčiva v organismu, což může mít za následek výskyt nežádoucích účinků (Lüllmann et al., 2003).

Mezi významné faktory patří i věk. Velmi mladí nebo staří jedinci jsou zvýšeně vnímaví k farmakologickému nebo toxickému působení léčiv. Příčinou jsou rozdíly nejen v metabolismu, ale i absorpci, distribuci a eliminaci léčiv. Pomalejší metabolismus může být způsoben sníženou aktivitou metabolických enzymů nebo sníženou dostupností nezbytných endogenních kofaktorů (Katzung, 1994).

Metabolismus léčiv rovněž ovlivňují akutní nebo chronická onemocnění, která mění buněčnou architekturu nebo funkci jater. Mezi ně patří steatóza, alkoholická hepatitida, cirhóza jater, hemochromatóza, chronická nebo akutní hepatitida, biliární cirhóza a akutní virová nebo polévková hepatitida. V závislosti na závažnosti těchto onemocnění dochází k poškození jaterních enzymů metabolizujících léčiva, zvláště mikrosomálních oxidas, a tudíž ke značnému ovlivnění eliminace léčiv (Katzung, 1994).

Faktory zevního prostředí se rovněž podílejí na individuálních variacích metabolismu léčiv. Kuřáci cigaret metabolizují některá léčiva rychleji než nekuřáci z důvodu enzymové indukce (viz dále). Pracovníci v průmyslu, vystavení působení některých pesticidů, metabolizují určité léčivé látky rychleji než neexponovaní jedinci. Takové rozdíly ztěžují určení účinných a bezpečných dávek léků, majících úzké terapeutické rozmezí (Katzung, 1994).

#### **2.4.5 Modulace aktivit biotransformačních enzymů**

Jedním z důsledků parazitózy může být změna aktivity biotransformačních enzymů. Jestliže dojde ke snížení aktivity enzymů podílejících se na biotransformaci xenobiotik, mluvíme obecně o inhibici. Ta se může projevit zvýšením plazmatických hladin léčiv a možným výskytem nežádoucích účinků léčiv (Šavlík et al., 2005). Inhibice metabolismu xenobiotik v důsledku parazitózy může být způsobena několika příčinami: destrukcí již existujících enzymů, inhibicí syntézy biotransformačních enzymů nebo může dojít k zamezení vazby enzymu na substrát, čímž dojde k jeho inaktivaci (Gibson a Skett, 2001).

Naproti tomu při indukci dochází ke zvýšení aktivity biotransformačních enzymů, což má za následek urychlení metabolismu a dochází tak k poklesu plazmatických hladin léčiv. Indukce může tedy vést ke snížení účinků léčiva až k úplnému selhání léčby (Šavlík et al., 2005). Indukovatelnost představuje strategicky významnou vlastnost prakticky všech biotransformačních enzymů, neboť indukci je nutno chápat jako obranný mechanismus organismu před chemickým stresem, který může způsobit přítomnost parazita v organismu. Nárůst aktivity biotransformačního enzymu je většinou důsledkem zvýšení exprese příslušného genu (tzv. transkripční mechanismus indukce), snížení degradace proteinu nebo stabilizace mRNA (netranskripční mechanismy indukce). Indukce může mít významné farmakologické a toxikologické důsledky. Modulací aktivit biotransformačních enzymů je pozměněna intenzita i doba trvání účinku léčiv (Szotáková, 2005).

## 2.5 Chromatografie

Chromatografie je fyzikální separační metoda. Základním mechanismem separace je rozdělování jednotlivých komponentů mezi pevnou a mobilní fázi. V průběhu separačního procesu dochází k opakované sorpci a desorpci částic, přičemž rozdíly v separaci částic jsou výsledkem různých distribučních konstant (Poole a Poole, 1993).

Rozlišujeme několik základních chromatografických metod, a to podle charakteru mobilní fáze. V plynové chromatografii je mobilní fází inertní plyn, v superkritické chromatografii slouží jako mobilní fáze superkritické medium, které má vlastnosti charakteristické pro plyn i kapalinu. Superkritické medium je v podstatě plyn, jehož tlak i teplota jsou nad kritickou hodnotou. A v kapalně chromatografii se jako mobilní fáze používá kapalina s nízkou viskozitou. Stacionární fáze je obecně pórovitý, granulovaný prášek ve formě pevné homogenní vrstvy, která je nanášena na vnitřní povrch kolony. Sorbenty jsou obvykle pevné látky s velkým povrchem (silikagel), na který jsou navázány dlouhé alkylové řetězce hydrofobního charakteru (C8-C18). Toto je příklad chemicky vázané stacionární fáze, které mají v dnešní době největší využití. Velice perspektivní jsou chirální kolony, které umožňují analyzovat opticky aktivní látky (Poole a Poole, 1993).

Chromatografické metody můžeme rozdělovat i podle jiných měřítek jako je provedení, rozlišujeme kolonové (HPLC, GC) a plošné provedení (TLC, PC), nebo

podle mechanismu separace. V tomto případě rozlišujeme chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou a gelovou (Poole a Poole, 1993).

Výsledkem chromatografického procesu je chromatogram, což je záznam průběhu chromatografického procesu (Poole a Poole, 1993).

Chromatografii můžeme využít pro kvalitativní a kvantitativní analýzu separované směsi. To znamená, že můžeme identifikovat jednotlivé složky směsi a také zjistit jejich relativní koncentraci (Poole a Poole, 1993).

## **2.5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je jedna z nejprogresivnějších analytických metod. Má velice široké spektrum využití, uplatňuje se prakticky ve všech vědních oborech. Jedná se o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. Vysokoučinná kapalinová chromatografie má řadu předností, jedná se o velkou rychlost analýzy, vysokou citlivost stanovení, pro analýzu je potřeba minimální množství vzorku a v neposlední řadě je celý proces analýzy možno zautomatizovat (Poole a Poole, 1993).

### **2.5.1.1 Složení HPLC**

HPLC je vysoce komplexní přístroj, který se skládá z několika základních částí:

- zásobníky mobilní fáze
- degasser
- čerpadlo
- autosampler
- programovací jednotka
- kolona
- detektor
- počítač



### **Zásobníky mobilní fáze**

Zásobníky mobilní fáze jsou nádoby, ve kterých je uchovávána mobilní fáze v průběhu analýzy. Mohou být vyrobeny z různých materiálů (sklo, plast) a jejich počet je nejčastěji od jedné do tří (<http://www.hplc.cz>).

### **Degasser (odplyňovací zařízení)**

Mobilní fáze nesmí obsahovat bubliny vzduchu a jiných plynů, protože by docházelo k ovlivnění průběhu analýzy a ke zkreslení výsledků. Odplynění a odvzdušnění mobilní fáze zajistí reprodukovatelné retenční časy, reprodukovatelný objem nástřiku, stabilní průtok mobilní fáze, nízký šum základní linie a vysokou citlivost detektorů. K odvzdušnění dochází na základě několika mechanismů, a to vakuová filtrace a sonifikace, probublávání mobilní fáze heliem nebo vakuový degasser (<http://www.hplc.cz>).

### **Čerpadlo**

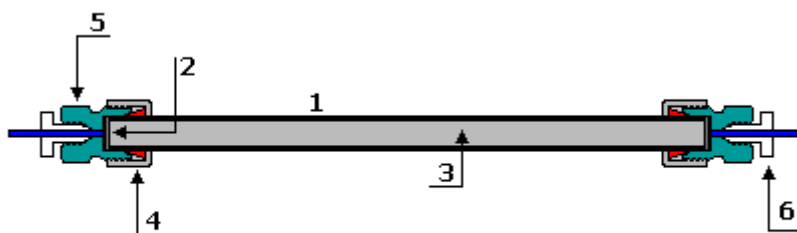
Základní funkcí čerpadla je vedení mobilní fáze ze zásobníků na kolonu. Čerpadla pracují pod velkými pracovními tlaky ( v rozmezí 1- 60 MPa) a zajišťují konstantní průtok mobilní fáze. U čerpadla je důležitá velká přesnost a reprodukovatelnost průtoku v celém rozsahu pracovních tlaků, z tohoto důvodu je čerpadlo jedna z finančně i výrobně nejnáročnějších součástí HPLC. (<http://www.hplc.cz>)

### **Autosampler**

Autosampler umožňuje automatické dávkování série vzorků nebo nástřik jednotlivých vzorků. Automatické dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěné vialky uzavřené pryžovým septem. Vzorek je dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů nebo pomocí několika třicestných ventilů. K zamezení kontaminace vzorků se používá oplach jehly. (<http://www.hplc.cz>)

## Kolona

Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná stacionární fází, přičemž na kolonu jsou kladeny určité požadavky. Musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plast nebo sklo. (<http://www.hplc.cz>)



Obr.3. Složení HPLC kolony (překresleno dle <http://www.hplc.cz>)

HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny převlečeným ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavicí (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).

## Detektor

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují efluent. Detektory zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celou detektoru. Detektory se nejčastěji dělí na detektory koncentrační a hmotnostní (<http://www.hplc.cz>)

Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu  $dm/dV$  nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v efluentu  $dm/dt$  do detektoru (<http://www.hplc.cz>).

Jiný způsob dělení je na detektory nedestrukční a detektory destruktivní. V nedestrukčních detektorech nedochází k chemické změně detekované komponenty, v destruktivních detektorech se detekovaná komponenta ireverzibilně mění (<http://www.hplc.cz>).

V současné době jsou v podstatě všechny typy detektorů používaných pro HPLC koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin, a to na detektory selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty, a na detektory univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti efluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty (<http://www.hplc.cz>).

Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky:

- Možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost)
- Odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí
- Vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- Robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty
- Umožnit gradientovou eluci

Vlastní typy detektorů:

- UV/VIS detektor
- Fluorescenční detektor
- Refraktometrický detektor
- Elektrochemický detektor
- Hmotnostní detektor

(<http://www.hplc.cz>).

### 3 Cíl práce

Úkolem předložené diplomové práce bylo testovat *in vitro* biotransformaci anthelmintika flubendazolu v játrech a tenkém střevě ovcí zdravých a ovcí postižených haemonchózou.

Cílem bylo:

- porovnat biotransformaci flubendazolu v játrech a střevech ovce
- zjistit, zda parazitóza způsobená vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*) ovlivňuje *in vitro* biotransformaci flubendazolu v játrech nebo tenkém střevě
- posoudit, jestli má délka infekce vliv na biotransformaci flubendazolu
- zjistit, zda má pohlaví zvířete vliv na biotransformaci flubendazolu a na její případné změny způsobené haemonchózou

## 4 Experimentální část

### 4.1 Pokusná zvířata a biologický materiál

Species, na kterém byla prováděna experimentální část této diplomové práce, byla ovce domácí (*Ovis aries*), plemeno Merino landschaf.

Byly vytvořeny tři skupiny ovcí:

- sk. **A** (3 samci + 3 samice) – kontrolní skupina, zdravé ovce
- sk. **C** (4 samci + 4 samice) – ovce se 7-týdenní parazitózou experimentálně vyvolanou larvami *Haemonchus contortus*
- sk. **E** (4 samci) – ovce s 11-týdenní parazitózou vyvolanou larvami *Haemonchus contortus*

Na začátku pokusu byly ovce staré 3-4 měsíce (asi 30kg živé váhy). Infikace byla realizována perorální suspenzí s 5000 larvami L3 *H. contortus*.

Po usmrcení zvířat byla do pěti minut vyjmuta játra, levý lalok byl rozdělen na malé kousky a zmrazen v tekutém dusíku během transportu do laboratoře. Dále byla vyjmuta část tenkého střeva (1,5m od duodena). Po vypláchnutí střevního obsahu fyziologickým roztokem následovalo zmrazení materiálu v tekutém dusíku. Játra a střevo byla uložena do hlubokomrazícího boxu (-80°C).

### 4.2 Přístroje

- laboratorní předvážky Kern KB
- analytické váhy Scaltec SBC 22
- pH metr Thermo Orion model 410A
- pH metr Jenway model 3020
- hlubokomrazící box Ultra-low freezer So-low
- centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- centrifuga Beckman Coulter
- centrifuga Eppendorf 5415D

- Eppendorf concentrator 5301
- Eppendorf Thermomixer Comfort
- ultrazvuková lázeň NETZ K2
- třepačka Multi-vortex V-32
- míchačka Variomag Mono
- čtečka Biorad
- pipety Biohit Proline
- vakuové filtrační zařízení SUPLECO, filtr s velikostí pórů 0,45 $\mu$ m
- zdroj vakua Laboport KNF
- HPLC – Shimadzu
  - řídicí jednotka SCL-19A<sub>VP</sub>
  - autosampler SIL-10AD<sub>VP</sub>
  - vysokotlaká pumpa LC-10AD<sub>VP</sub>
  - zařízení pro temperování kolony CTO-10AC<sub>VP</sub>
  - kolona LiChroCART 250-3 LiChrospher 60 RP-select B (5 $\mu$ m)
  - degasser GT 154 (Vakuum)
  - fluorescenční detektor RF-10A<sub>XL</sub>
  - počítač vybavený softwarem Shimadzu Class-VP

## 4.3 Chemikálie

- draselno – fosfátový pufr 0,025M pH 3,0
- Na – fosfátový pufr 0,1M pH 7,4
- roztok A (NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bichoninová kyselina v 0,1M NaOH)
- roztok B (4% CuSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O)
- roztok C (vznikne smícháním roztoku A a B v poměru 50:1)
- roztok hovězího sérového albuminu (BSA) 1%
- standard FLU
- standard FLU, redukovaný
- standard ABZ
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- NADPH

- amoniak
- octan ethylnatý
- dihydrogenofosforečnan draselný
- kyselina o-fosforečná
- acetonitril
- methanol
- isopropylalkohol
- destilovaná voda
- redestilovaná voda

## 4.4 Pracovní postupy

### 4.4.1 Příprava pufrů, zásobních roztoků a mobilní fáze

#### Sodno-fosfátový pufr

Nejprve byly připraveny jednotlivé složky: 1000ml 0,1M roztoku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (navážka 35,8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) a 250ml 0,1M roztoku dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (navážka 3,9g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Za stálého míchání a kontroly pH byly tyto roztoky slévány, až bylo dosaženo požadované hodnoty pH 7,4.

#### Draselno-fosfátový pufr

Navážka 3,4022g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustila v redestilované vodě v odměrné baňce na 1000ml. Po doplnění vody po rysku se vzniklý roztok důkladně protřepal, aby došlo k rozpuštění všech krystalků dihydrogenfosforečnanu. Následně se pomocí kyseliny o-fosforečné upravilo pH na požadovanou hodnotu 3,0 a vzniklý pufr se přefiltroval přes filtr s velikostí pórů 0,54 $\mu\text{m}$ .

#### Zásobní roztok NADPH

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky NADPH 9,996mg ve 4ml redestilované vody. Koncentrace zásobního roztoku NADPH pak byla 3,0mM.

### **Zásobní roztoky flubendazolu**

K přípravě roztoků flubendazolu byl použit zásobní roztok flubendazolu o koncentraci 1500 $\mu$ M, který byl připraven rozpuštěním 2,345mg FLU v 5ml DMSO. Další roztoky vznikly ředěním stávajícího roztoku.

600 $\mu$ l roztoku o koncentraci 500 $\mu$ M byl připraveno smísením 200 $\mu$ l 1500 $\mu$ M roztoku FLU se 400 $\mu$ l DMSO. Pro přípravu 1000 $\mu$ l roztoku o koncentraci 150 $\mu$ M bylo použito 100 $\mu$ l 1500 $\mu$ M roztoku FLU a 900 $\mu$ l DMSO. Pro přípravu 600 $\mu$ l 50 $\mu$ M roztoku bylo použito 20 $\mu$ l 1500 $\mu$ M roztoku FLU a 580 $\mu$ l DMSO a nakonec 1000 $\mu$ l 15 $\mu$ M roztoku bylo připraveno smísením 10 $\mu$ l 1500 $\mu$ M roztoku flubendazolu s 590 $\mu$ l DMSO.

Z roztoků o koncentracích flubendazolu 500, 150, 50 a 15 $\mu$ M byly odebrány vždy 3 $\mu$ l a přepipetovány do reakční směsi, jejíž objem pak byl 300 $\mu$ l. Z toho vyplývá, že v reakční směsi byl flubendazol v požadovaných koncentracích 5, 1,5, 0,5 a 0,15 $\mu$ M.

### **Mobilní fáze**

K přípravě mobilní fáze pro achirální HPLC analýzu byl použit 0,025M draselno-fosfátový pufr pH 3,0, který byl smíšen s acetonitrem v poměru 7:3. Vzniklá mobilní fáze byla dobře promíchána a na 15min umístěna do ultrazvukové lázně pro lepší homogenizaci a odvzdušnění.

## **4.4.2. Příprava subcelulárních frakcí**

Vzorky jater léčených a neléčených ovcí byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu. Po mírném roztátí při laboratorní teplotě byly játra rozstříhány na malé kousky a rozváženy po 5g. V chladícím boxu byly zhomogenizovány a zředěny 0,1M Na – fosfátovým pufrem pH 7,4 v poměru 1:6 (tzn. 5g jater v 30ml pufre).

Vzorky střev byly rovněž vyndány z hlubokomrazícího boxu a po rozmrazení byly rozstříhány podélně. Pro účel získání mikrosomů a cytosolu s obsahem biotransformačních enzymů se použila pouze střevní mukóza seškrábnuta z vnitřní strany střev. 10g této mukózy bylo zhomogenizováno a zředěno Na – fosfátovým pufrem pH 7,4 v poměru 1:3 (tzn. 10g mukózy v 30ml pufre).

Následný postup byl u jater i střev stejný. Nejdříve byly v předchlazené (4°C) centrifuze Heraeus centrifugovány při 5000g 20min. Supernatant z prvního točení



byl znovu centrifugován ale při 20000g 60min. Následně byl supernatant opatrně přelit do kyvet pro ultracentrifugu Beckman a v ní točen při 105000g 65min.

Supernatant, který vznikl po třetí centrifugaci, byl požadovaný cytosol. Ten byl slit do kádinek a za stálého míchání rozpipetován po 1,1ml do mikrozkušavek.

Peletu po třetí centrifugaci tvořily mikrosomy. Pro jejich přečištění se opět zředily 30ml pufru, zhomogenizovaly a ultracentrifugovaly při 105000g 60min. Mikrosomy v získané peletě se zhomogenizovaly s 5ml Na-fosfátového pufru s 20% (v/v) obsahem glycerolu. Takto zhomogenizované mikrotomy byly slity do kádinek, ponořeny do ultrazvukové lázně pro lepší homogenizaci a za stálého míchání rozpipetovány po 1,1ml do mikrozkušavek.

Mikrozkušavky s cytosolem i mikrosomy byly do dalšího použití uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80°C.

#### **4.4.3. BCA stanovení bílkoviny**

Princip metody spočívá v tom, že proteiny reagují s  $\text{Cu}^{2+}$  v alkalickém prostředí. Měďnaté ionty přechází na měďné ionty  $\text{Cu}^{1+}$ , které vytváří v prostředí kolem pH 10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchoninic acid). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu se měří spektrofotometricky při 562nm.

Pro vlastní stanovení koncentrace bílkoviny byly mikrosomy a cytosol zředěny 20x redestilovanou vodou. Takto byly připraveny dvě ředění a z každého ředění pak čtyři paralelní vzorky, celkem tedy osm paralelních vzorků pro jedny mikrotomy nebo cytosol.

Do každé jamky na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 10 $\mu$ l vzorku bílkoviny a 200 $\mu$ l pracovního roztoku C, který v čas potřeby vznikl naředěním roztoku A ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BCA v 0,1M NaOH) a roztoku B (4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) v poměru 50:1. Slepé vzorky obsahovaly místo bílkoviny 10 $\mu$ l destilované vody. Vzorky na destičce byly dobře promíchány a inkubovány 30min při 37°C.

Po inkubaci byla na čtečce Biorad změřena absorbance při 562nm proti destilované vodě. Od zjištěných hodnot byly odečteny průměry slepých vzorků. Po sestrojení kalibrační křivky byly vypočteny koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích.

K sestavení kalibrační křivky byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) 1%, příprava proběhla dle následujícího rozpisu:

Tab. 4. Rozpis pro přípravu vzorků k sestavení kalibrační křivky

	<b>koncentrace BSA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>roztok 1% BSA (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>destilovaná voda (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

#### **4.4.4. Testování *in vitro* biotransformace flubendazolu**

##### **1. Příprava reakční směsi:**

Prvním krokem v přípravě vzorků pro HPLC analýzu byla příprava reakční směsi. Reakční směs tvořily čtyři základní složky: flubendazol, 0,1M Na-fosfátový pufr pH 7,4, NADPH a cytosol.

Navážka flubendazolu byla rozpuštěna v příslušném množství dimethylsulfoxidu, čímž vznikl zásobní roztok flubendazolu. 3 $\mu\text{l}$  tohoto roztoku pak byly přeneseny do mikrozkuhavky. Následně bylo přidáno 97 $\mu\text{l}$  0,1M Na-fosfátového pufru pH 7,4, 100 $\mu\text{l}$  3mM roztoku NADPH a 100 $\mu\text{l}$  cytosolu obsahujícího biotransformační enzymy. Konečný objem reakční směsi byl vždy 300 $\mu\text{l}$ .

Celkově byly pro inkubace použity čtyři různé koncentrace flubendazolu (0,15; 0,5; 1,5 a 5 $\mu\text{M}$ ) a jaterní nebo střevní cytosol z pěti různých skupin zvířat (A,C,E,A',C'). Každý typ inkubační směsi byl připraven ve čtyřech paralelních vzorcích.

Současně byly ještě připraveny dva druhy slepých vzorků: biologické (bez flubendazolu) a chemické (bez cytosolu) slepé vzorky.

Biologické slepé vzorky: 3μl DMSO  
97μl Na-fosfátového pufru pH 7,4  
100μl 3mM NADPH  
100μl cytosolu

Chemické slepé vzorky: 3μl substrátu (zásobní roztok flubendazolu)  
97μl Na-fosfátového pufru pH 7,4  
100μl 3mM NADPH  
100 μl NA-fosfátového pufru pH 7,4

Biologické slepé vzorky neobsahovaly substrát, který by mohl být metabolizován. Proto tyto vzorky slouží ke zjištění, jestli nedochází k interferenci mezi analyzovaným metabolitem a endogenní látkou obsaženou v cytosolu.

Chemické slepé vzorky bez cytosolu s biotransformačními enzymy slouží k odhalení případných neenzymových přeměn substrátu v průběhu inkubace a zpracování vzorku.

## **2. Inkubace cytosolu s flubendazolem:**

Uzavřené mikrozkušavky byly vloženy do inkubátoru Eppendorf Thermomixer Komfort, kde za stálého třepání a při teplotě 37°C probíhala inkubace po dobu 30-ti minut. Po uplynutí této doby bylo do reakční směsi přidáno 30μl amoniaku, čímž došlo k zastavení reakce. Následně byly eppendorfky přeneseny do ledové lázně, k reakční směsi bylo přidáno 700μl octanu ethylatého. Obsah byl intenzivně třepán na třepačce po dobu dvou minut, následovala centrifugace 3min při 5000g. Z každého vzorku byla odebrána vrchní ethylacetátová vrstva, která byla přenesena do vialek. Vialky byly umístěny do koncentrátoru, kde při 45°C došlo k úplnému odpaření rozpouštědla.

## **3. Konečná úprava vzorků:**

Do vialek z odparkem bylo napipetováno 400μl mobilní fáze, která vznikla smísením acetonitrilu s redestilovanou vodou v poměru 3:7. Vialky byly uzavřeny víčkem s pryžovým septem a umístěny do ultrazvukové lázně na 5min, aby došlo k úplnému rozpuštění odparku v mobilní fázi. Poté byly vialky umístěny do zásobníku autosampleru v HPLC.

## 4.5 HPLC

### 4.5.1 Parametry metody

- přístroj: Shimadzu
- kolona: LiChroCART 250-3 LiChrospher 60 RP-select B (5 $\mu$ m)
- fluorescenční detektor RF-10A<sub>XL</sub>
- detekce: fluorescenční  $\lambda_{EX} = 300\text{nm}$   
 $\lambda_{EM} = 360\text{nm}$
- nástřik: 10  $\mu$ l
- délka analýzy: 25 min
- teplota: 25 °C
- tlak: 19,1 MPa
- průtok mobilní fáze: 0,7 ml/min
- mobilní fáze: acetonitril : fosfátový pufr pH 3,0 v poměru 3 : 7

### 4.5.2 HPLC analýza vzorků

Cílem bylo zjistit koncentrace flubendazolu ve vzorcích připravených výše popsaným postupem. Po zapnutí přístroje byla kolona, která je jinak uchovávána ve směsi acetonitrilu a redestilované vody v poměru 7:3, promývána nejprve směsí acetonitrilu a redestilované vody v opačném poměru tedy 3:7 po dobu 45min. Následně byla promývána čistou mobilní fází složenou z acetonitrilu a draselno-fosfátového pufru pH 3,0 dalších 45min. Po dostatečném promytí kolony a ustálení pracovního tlaku byly do zásobníku na vzorky vloženy vialky.

V počítači pomocí operačního software Shimadzu Class-VP byly navoleny příslušné parametry metody. Byla vytvořena sekvence obsahující 36 vzorků. Pro každou koncentraci flubendazolu byla vytvořena vždy nová sekvence. Poté byla spuštěna analýza vzorků dané sekvence, která trvala 25min. Po ukončení práce byly ze zásobníku vyndány vialky se vzorky a kolona se promývala 45min směsí vody a acetonitrilu v poměru 7:3 a potom dalších 45min směsí vody a acetonitrilu v poměru 3:7.

Jednotlivé metabolity byly identifikovány na základě retenčních časů referenčních látek.

Množství jednotlivých metabolitů bylo vypočteno na základě již dříve sestrojené kalibrační křivky.

## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení bílkoviny

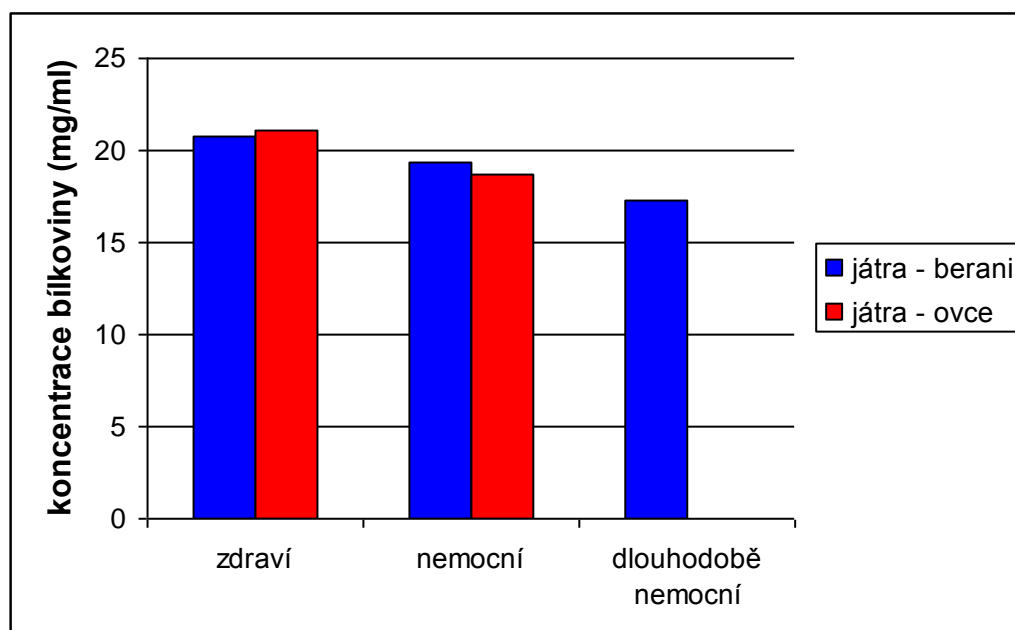
Koncentrace bílkoviny byla stanovována v cytosolické frakci jater a střev zdravých, nemocných a dlouhodobě nemocných ovcí a beranů metodou BCA, která byla popsána v kapitole 4.4.2.

Na základě kalibrační křivky byly ze zjištěných absorbancí (po odečtení průměrné absorbance slepých vzorků) vypočteny hodnoty koncentrace bílkoviny v jednotlivých vzorcích.

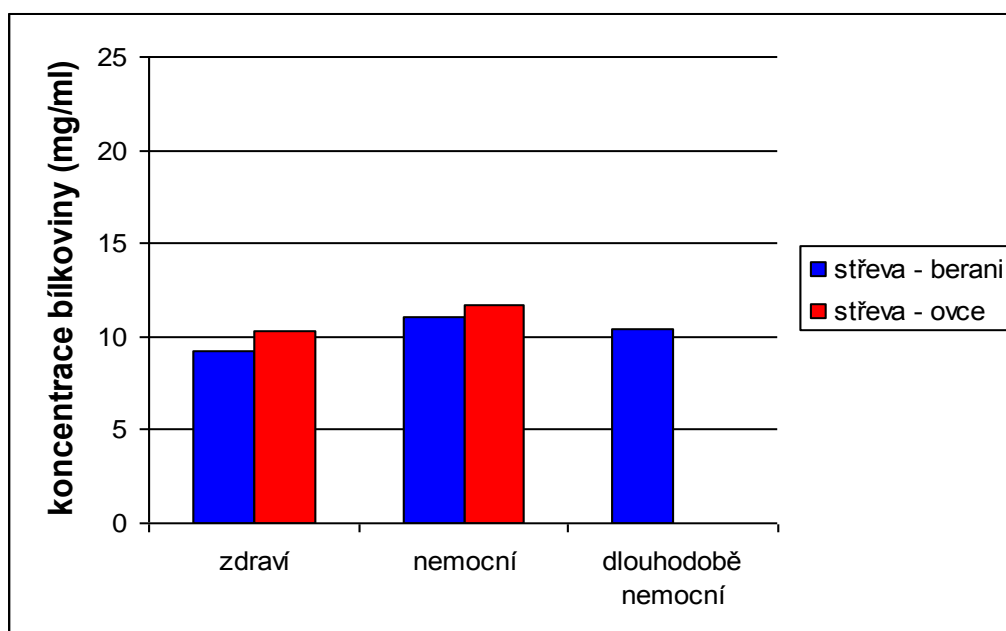
Tab.5. Koncentrace bílkoviny v jaterních a střevních vzorcích zdravých, nemocných a dlouhodobě nemocných ovcí a beranů.

koncentrace bílkoviny (mg/ml)			
	zdraví	nemocní	dlouhodobě nemocní
játra - berani	20,8	19,4	17,3
játra - ovce	21,1	18,7	- *
střeva - berani	9,2	11,1	10,4
střeva - ovce	10,3	11,7	- *

\* Skupina dlouhodobě nemocných zvířat byla složená pouze z beranů



Obr.4. Koncentrace bílkoviny v jaterních vzorcích beranů a ovcí



Obr.5. Koncentrace bílkoviny ve střevních vzorcích beranů a ovcí

Z obrázků 4 a 5 vyplývá, že není signifikantní rozdíl v koncentraci bílkoviny mezi samci a samicemi. Rovněž je vidět, že ani zdravotní stav zvířete příliš neovlivní koncentraci bílkoviny, ale podstatný rozdíl lze zaznamenat mezi jaterními a střevními vzorky, přičemž koncentrace bílkoviny v cytosolu ze střev je podstatně nižší.

## 5.2 Sledování vlivu parazitózy na biotransformaci flubendazolu

Vliv parazitózy na biotransformaci flubendazolu byl zjišťován na základě srovnávání výsledků u zdravých a nemocných zvířat.

Tab.6. Vliv haemonchózy na metabolismus flubendazolu v játrech samců

Samci (játra) - 5uM FLU		
zdravotní stav	specifická aktivita (pmol/min/mg)	SD
zdraví (skup. A)	13,4	1,2
nemocní (skup. C)	6,5	0,3

Tab.7. Vliv haemonchózy na metabolismus flubendazolu v játrech u samic

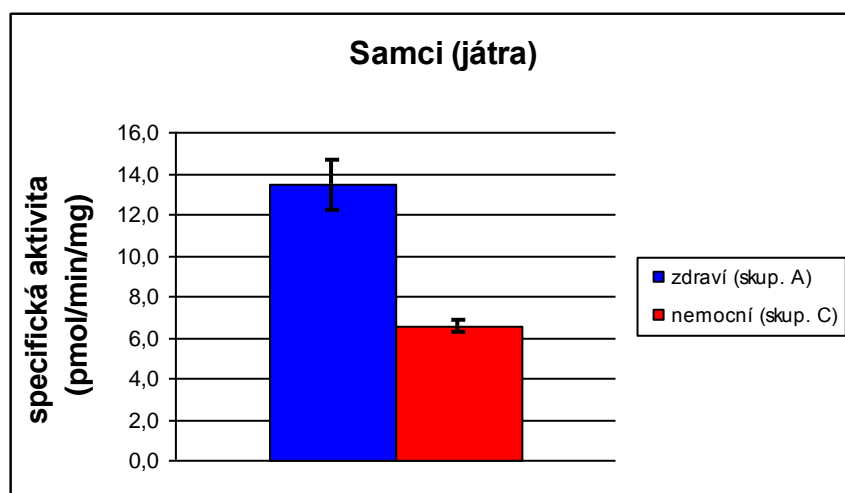
<b>Samice (játra) - 5uM FLU</b>		
<b>zdravotní stav</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
zdraví (skup. A')	4,0	1,1
nemocní (skup. C')	3,1	0,3

Tab.8. Vliv haemonchózy na metabolismus flubendazolu ve střevech u samců

<b>Samci (střeva) - 5uM FLU</b>		
<b>zdravotní stav</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
zdraví (skup. A)	20,2	2,7
nemocní (skup. C)	17,0	0,3

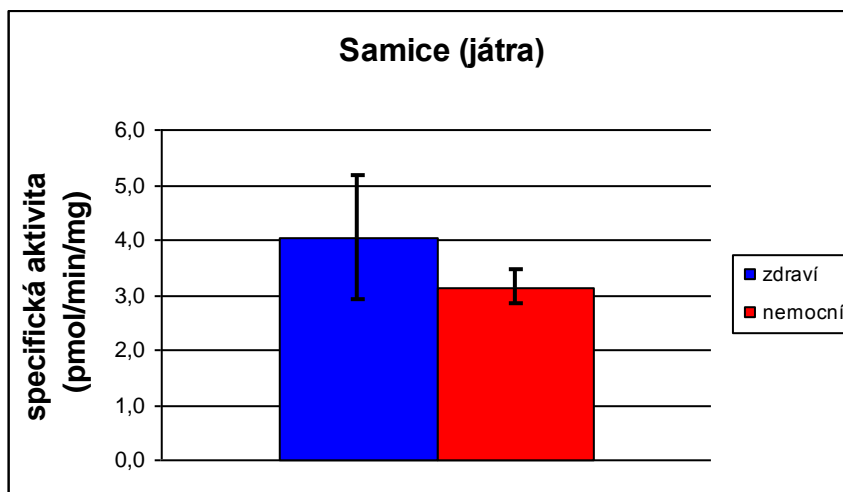
Tab.9. Vliv haemonchózy na metabolismus flubendazolu ve střevech u samic

<b>Samice (střeva) - 5uM FLU</b>		
<b>zdravotní stav</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
zdraví (skup. A')	18,3	2,4
nemocní (skup. C')	11,7	1,9

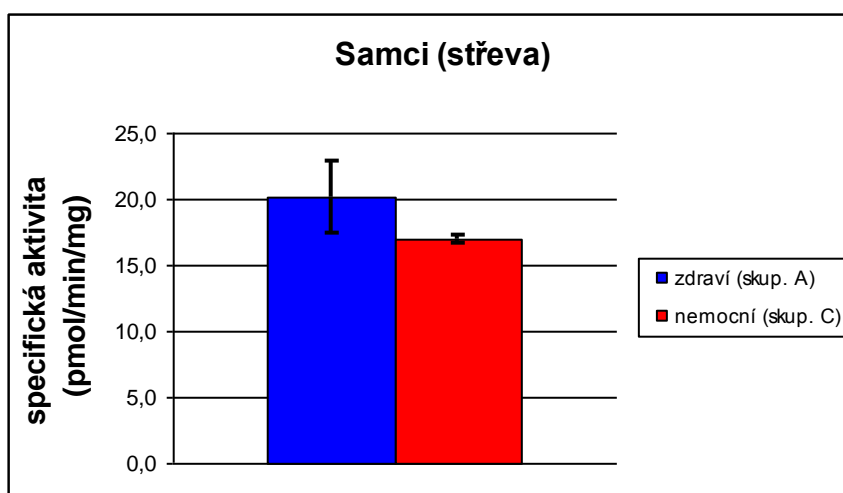


Obr.6. Vliv zdravotního stavu na metabolismus flubendazolu v játrech u samců

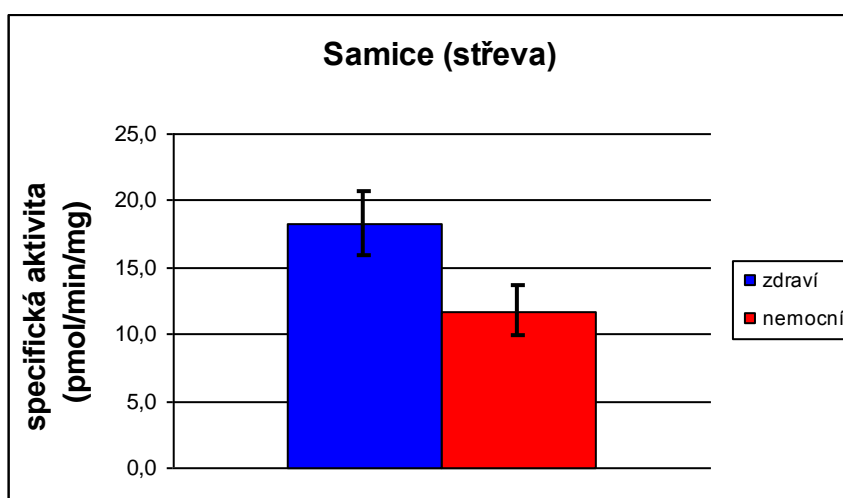




Obr.7. Vliv zdravotního stavu na metabolismus flubendazolu v játrech u samic



Obr.8. Vliv zdravotního stavu na metabolismus flubendazolu ve střevech u samců



Obr. 9. Vliv zdravotního stavu na metabolismus flubendazolu ve střevech u samic

Z předešlých tabulek a obrázků zcela jasně vyplývá, že vlivem haemonchózy dochází ke snížení metabolismu flubendazolu, přičemž rychlost metabolismu je snížena průměrně o 30%.

### 5.3 Stanovení vlivu délky onemocnění na biotransformaci flubendazolu

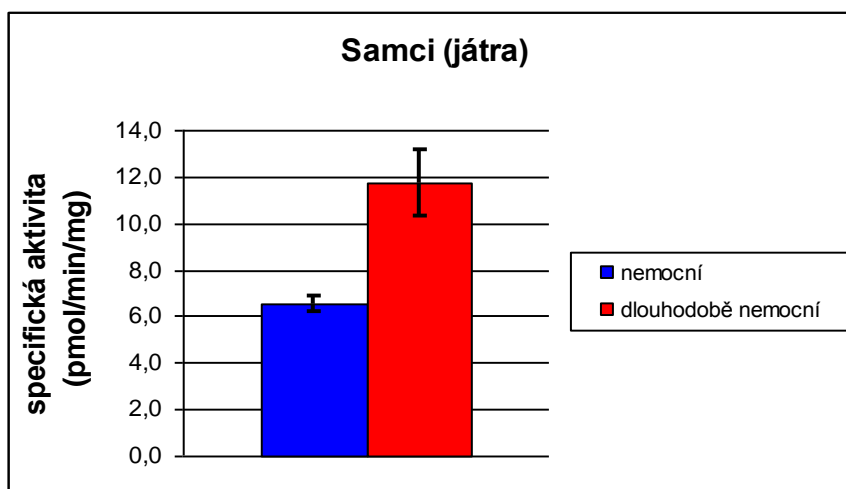
Při zjišťování vlivu délky onemocnění byly srovnávány ovce nemocné sedm týdnů a ovce, u nichž probíhala haemonchóza po dobu jedenácti týdnů.

Tab.10. Vliv délky onemocnění na metabolismus flubendazolu v játrech samců

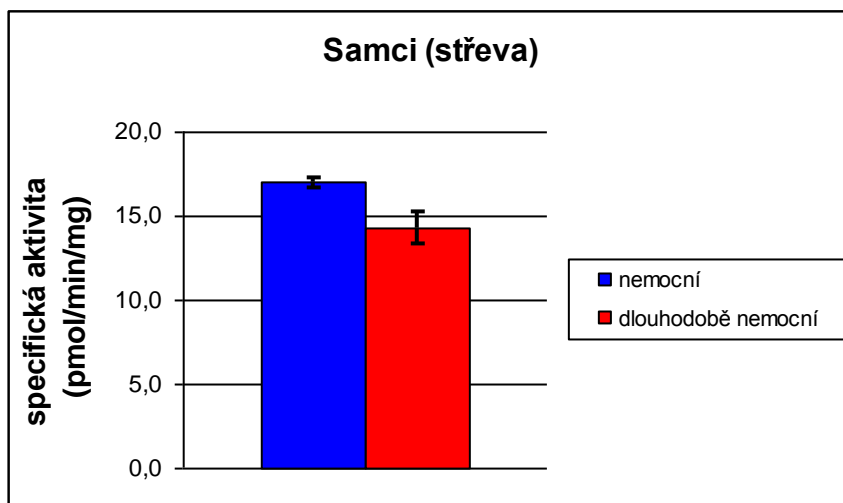
Samci (játra) - 5uM FLU		
zdravotní stav	specifická aktivita (pmol/min/mg)	SD
nemocní	6,5	0,3
dlouhodobě nemocní	11,7	1,4

Tab.11. Vliv délky onemocnění na metabolismus flubendazolu ve střevech samců

Samci (střevo) - 5uM FLU		
zdravotní stav	specifická aktivita (pmol/min/mg)	SD
nemocní	17,0	0,3
dlouhodobě nemocní	14,3	1,0



Obr.10. Vliv délky onemocnění na metabolismus flubendazolu v játrech samců



Obr.11. Vliv délky onemocnění na metabolismus flubendazolu ve střevech samců

Z předchozích obrázků je jasné, že i délka onemocnění ovlivňuje metabolismus flubendazolu. Zatímco v játrech je aktivita biotransformačních enzymů menší u krátkodobě nemocných jedinců, ve střevech je tomu přesně naopak. V játrech došlo ke snížení rychlosti metabolismu u krátkodobě nemocných jedinců přibližně o 44% a ve střevech je rychlost metabolismu krátkodobě nemocných zvířat zvýšena o 16%.

## 5.4 Stanovení vlivu pohlaví na biotransformaci flubendazolu

Při stanovování vlivu pohlaví byli porovnáváni ovce a berani. Srovnávána byla zvířata jak zdravá, tak i nemocná.

Tab.12. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu v játrech zdravých zvířat

skupina A (játra) - 5uM FLU		
pohlaví	specifická aktivita (pmol/min/mg)	SD
samci	13,4	1,2
samice	4,0	1,1

Tab.13. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu ve střevech zdravých zvířat

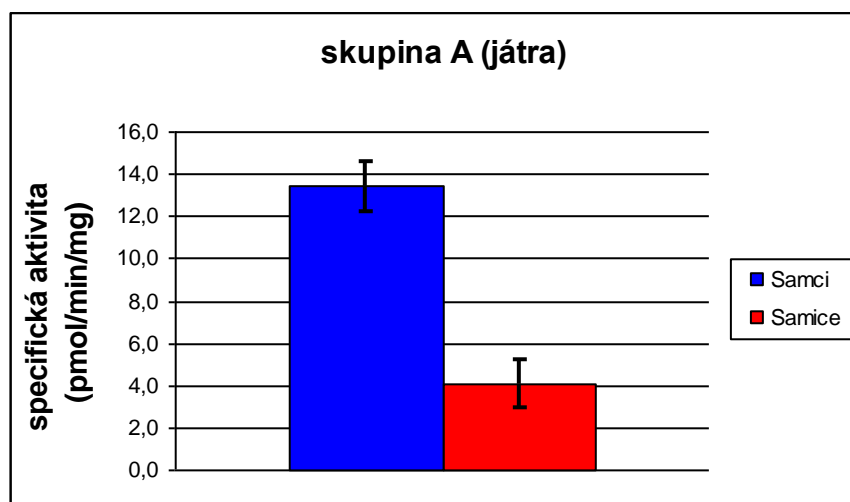
<b>skupina A (střevo) - 5uM FLU</b>		
<b>pohlaví</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
samci	20,2	2,7
samice	18,3	2,4

Tab.14. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu v játrech nemocných zvířat

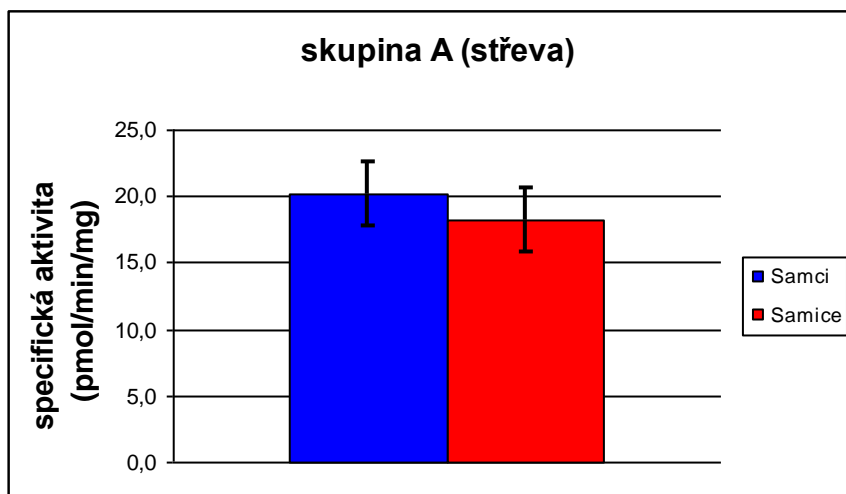
<b>skupina C (játra) - 5uM FLU</b>		
<b>pohlaví</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
samci	6,5	0,3
samice	3,1	0,3

Tab.15. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu ve střevech nemocných zvířat

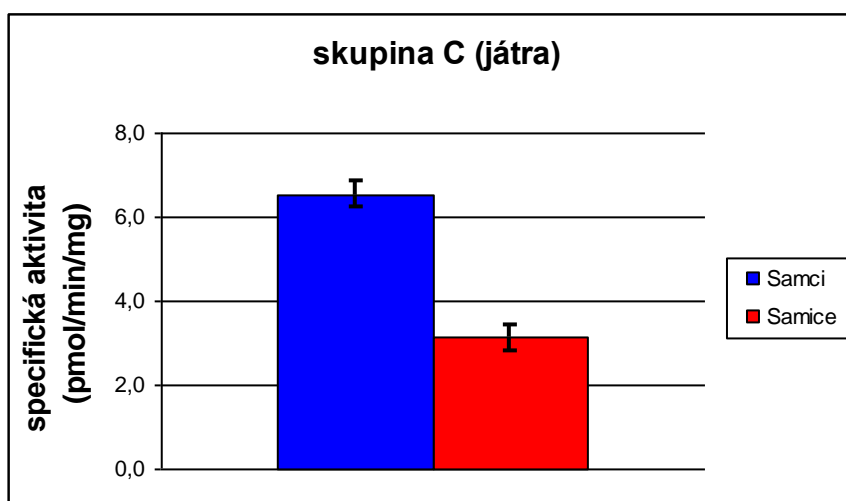
<b>skupina C (střevo) - 5uM FLU</b>		
<b>pohlaví</b>	<b>specifická aktivita (pmol/min/mg)</b>	<b>SD</b>
samci	17,0	0,3
samice	11,7	1,9



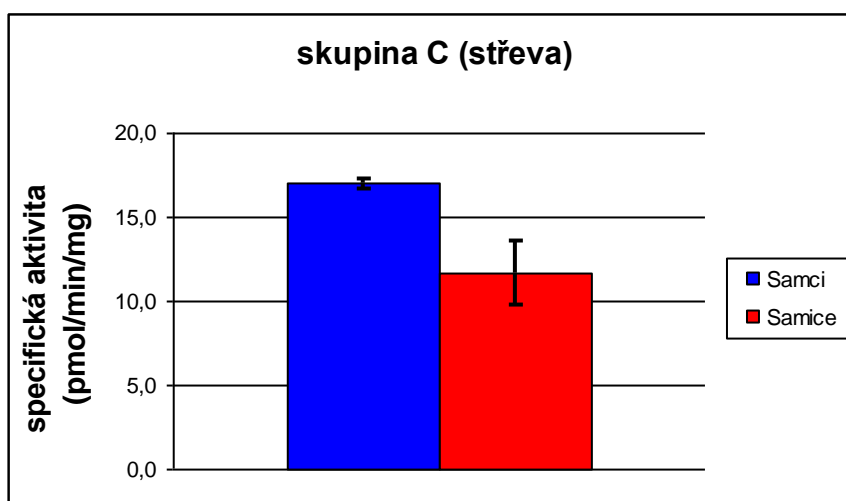
Obr.12. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu v játrech zdravých zvířat



Obr.13. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu ve střevech zdravých zvířat



Obr.14. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu v játrech nemocných zvířat



Obr.15. Vliv pohlaví na metabolismus flubendazolu ve střevech nemocných zvířat

Z obrázků 12 až 15 je patrné, že existuje rozdíl v biotransformaci flubendazolu mezi samci a samicemi, přičemž berani metabolizují flubendazol obecně rychleji než ovce. Porovnáme-li jaterní a střevní vzorky zdravých zvířat, tak v játrech zdravých ovcí byla enzymová aktivita nižší přibližně o 70%, zatímco ve střevech zdravých ovcí byl zaznamenán rozdíl v enzymové aktivitě 10%. Co se týče nemocných jedinců, tak v játrech ovcí byla enzymová aktivita nižší o 52%, a ve střevech ovcí byla aktivita biotransformačních enzymů menší o 31% oproti beranům.

## 5.5 Enzymová kinetika

### 5.5.1 Kinetika tvorby redukovaného flubendazolu v jaterních vzorcích

Tab.16. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech zdravých beranů

skupina A (játra)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	-	-
0,15	5,2	0,8		
0,5	15,1	0,6		
1,5	7,9	1,1		
5,0	93,0	8,2		

Tab.17. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech nemocných beranů

skupina C (játra)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	-	-
0,15	1,5	0,5		
0,5	14,3	2,9		
1,5	7,8	1,3		
5,0	42,3	1,9		

Tab.18. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech dlouhodobě nemocných beranů

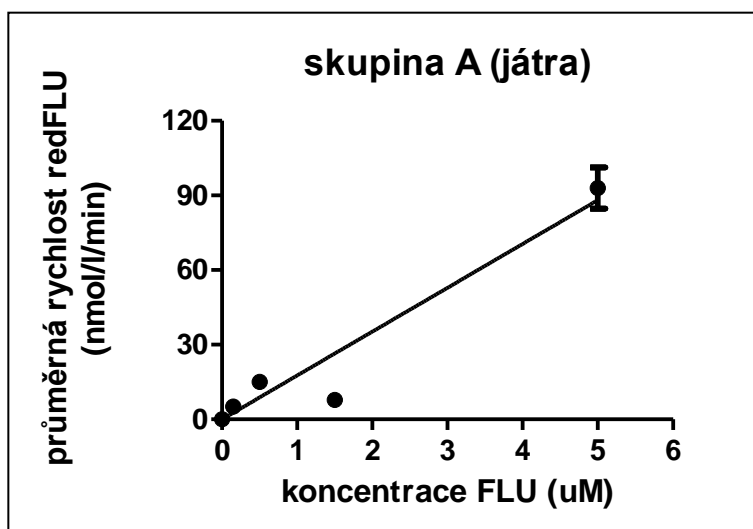
skupina E (játra)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	-	-
0,15	2,7	1,5		
0,5	13,8	3,7		
1,5	12,4	1,3		
5,0	67,5	8,2		

Tab.19. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech zdravých ovcí

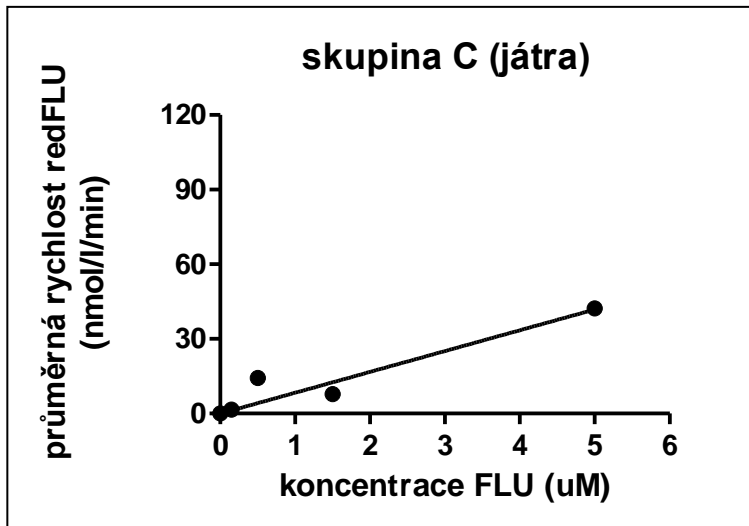
skupina A' (játra)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	66,6	6,9
0,15	1,7	0,7		
0,5	11,4	1,9		
1,5	8,0	0,4		
5,0	28,4	8,0		

Tab.20. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech nemocných ovcí

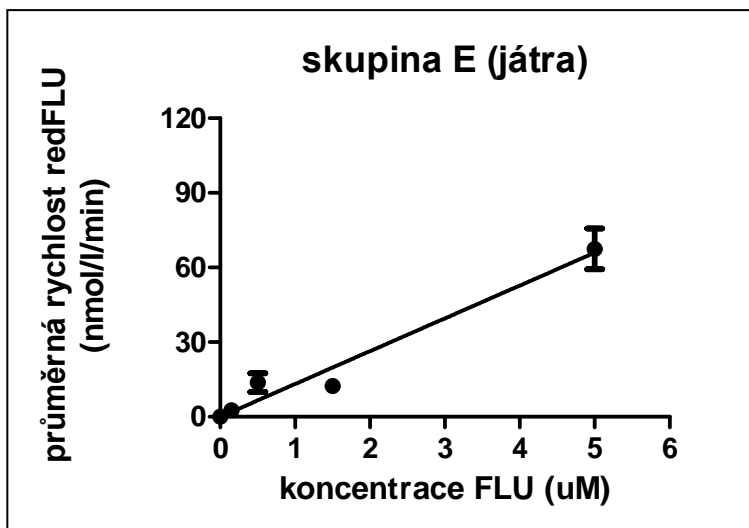
skupina C' (játra)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	20,1	0,5
0,15	0,9	0,1		
0,5	15,1	4,8		
1,5	11,2	4,1		
5,0	19,6	1,9		



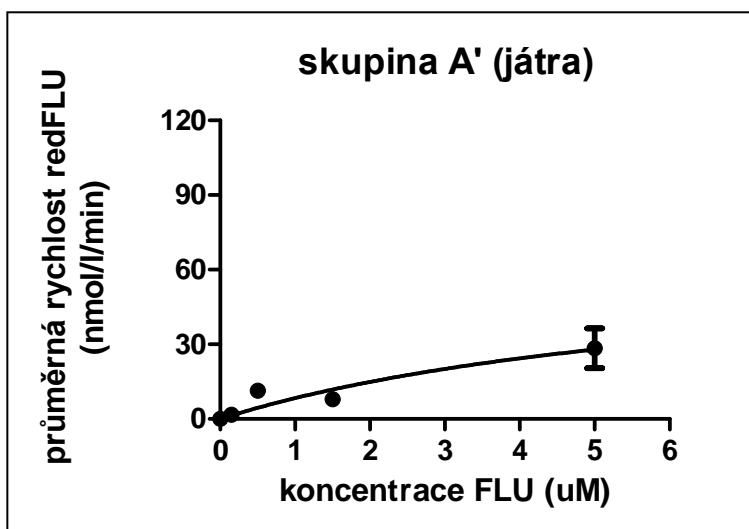
Obr.16. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech zdravých beranů



Obr.17. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech nemocných beranů

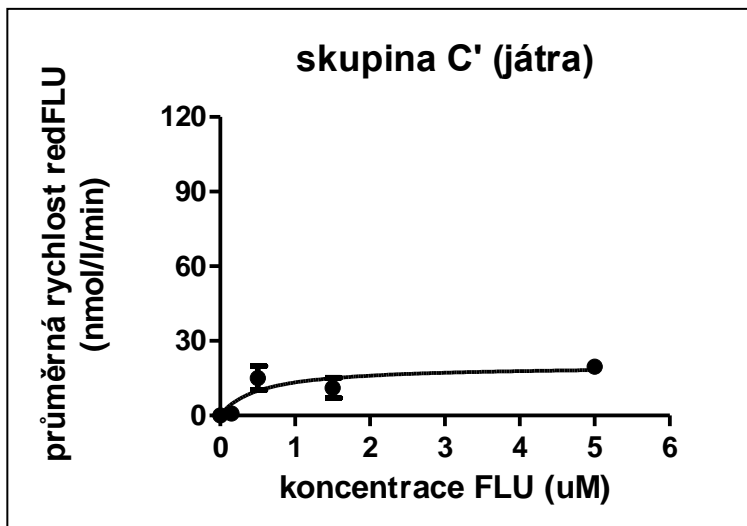


Obr.18. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech dlouhodobě nemocných beranů



Obr.19. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech zdravých ovcí





Obr.20. Kinetika tvorby redukovaného FLU v játrech nemocných ovcí

### 5.5.2 Kinetika tvorby redukovaného flubendazolu ve střevních vzorcích

Tab.21. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech zdravých beranů

skupina A (střevo)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	$V_{max}$	$K_M$
0,0	0,0	0,0	83,8	1,7
0,15	6,3	0,5		
0,5	16,6	1,2		
1,5	42,4	3,2		
5,0	61,9	8,3		

Tab.22. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech nemocných beranů

skupina C (střevo)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	$V_{max}$	$K_M$
0,0	0,0	0,0	85,3	1,7
0,15	4,6	0,5		
0,5	18,1	1,1		
1,5	41,5	1,5		
5,0	62,8	1,0		

Tab.23. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech dlouhodobě nemocných beranů

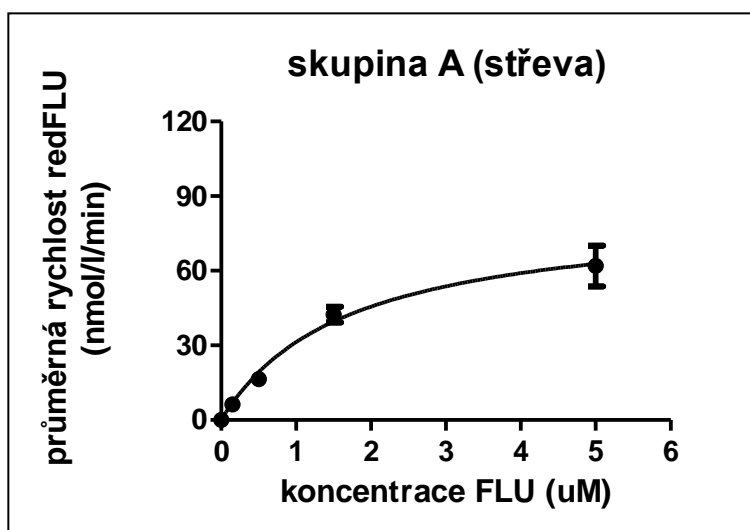
skupina E (střeva)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	62,7	1,0
0,15	5,4	0,8		
0,5	17,3	1,0		
1,5	45,0	3,2		
5,0	49,6	3,3		

Tab.24. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech zdravých ovcí

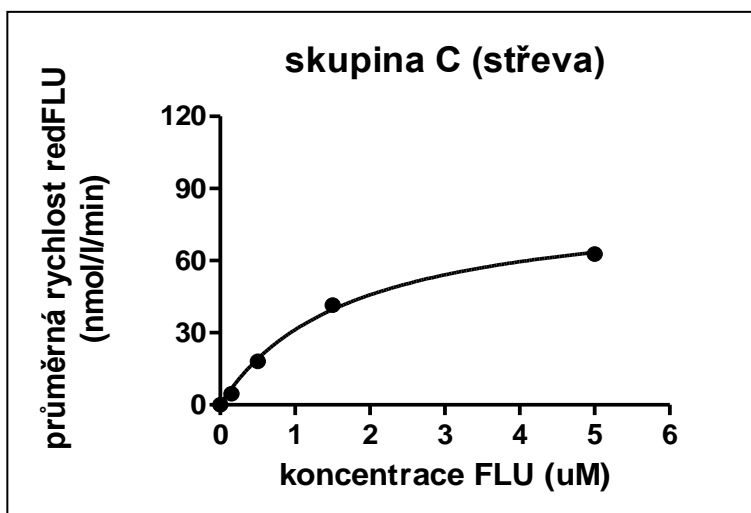
skupina A' (střeva)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	81,8	1,3
0,15	5,3	1,0		
0,5	18,8	1,2		
1,5	48,1	1,2		
5,0	62,7	8,2		

Tab.25. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech nemocných ovcí

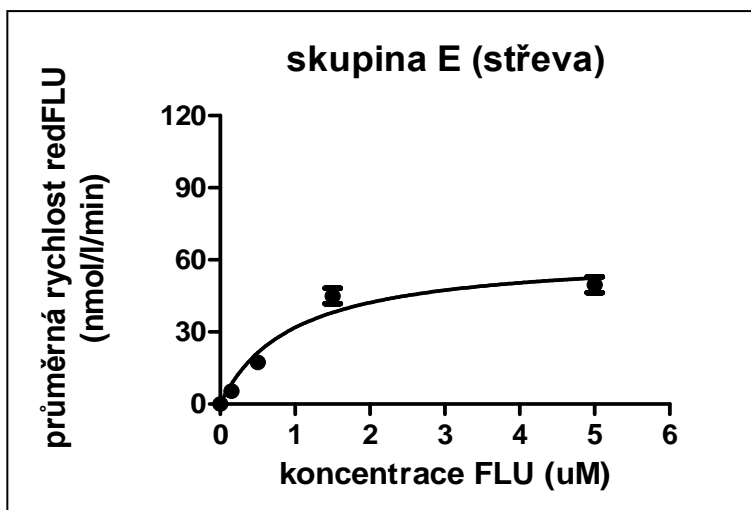
skupina C' (střeva)				
koncentrace FLU (uM)	rychlost (nmol/l/min)	SD	V <sub>max</sub>	K <sub>M</sub>
0,0	0,0	0,0	57,8	0,8
0,15	4,1	0,8		
0,5	19,2	1,8		
1,5	47,4	2,7		
5,0	45,6	7,3		



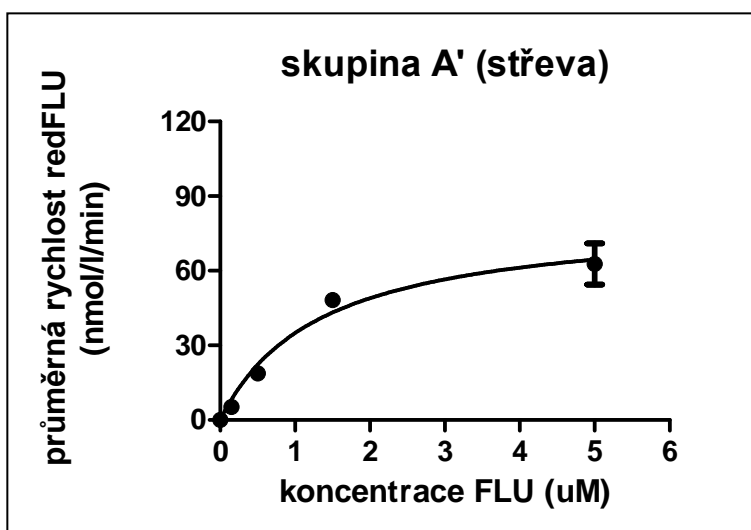
Obr.21. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech zdravých beranů



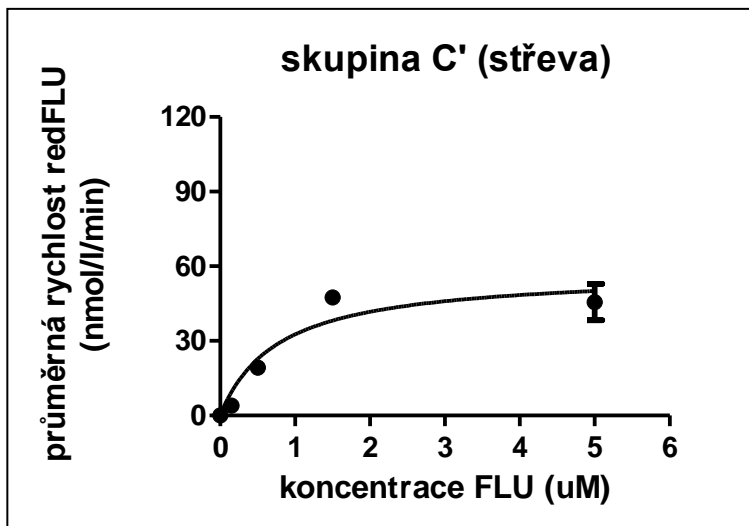
Obr.22. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech nemocných beranů



Obr.23. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech dlouhodobě nemocných beranů



Obr.24. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech zdravých ovcí

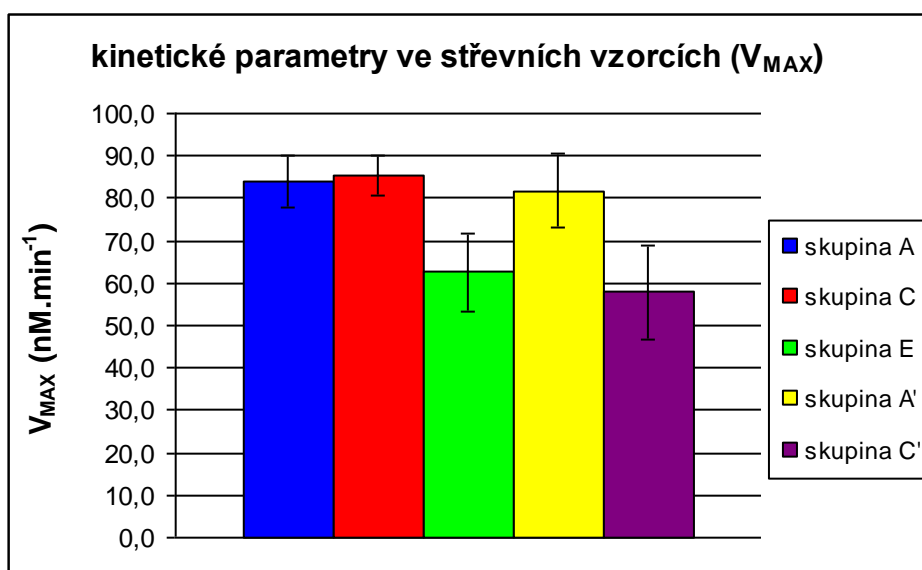


Obr.25. Kinetika tvorby redukovaného FLU ve střevech nemocných ovcí

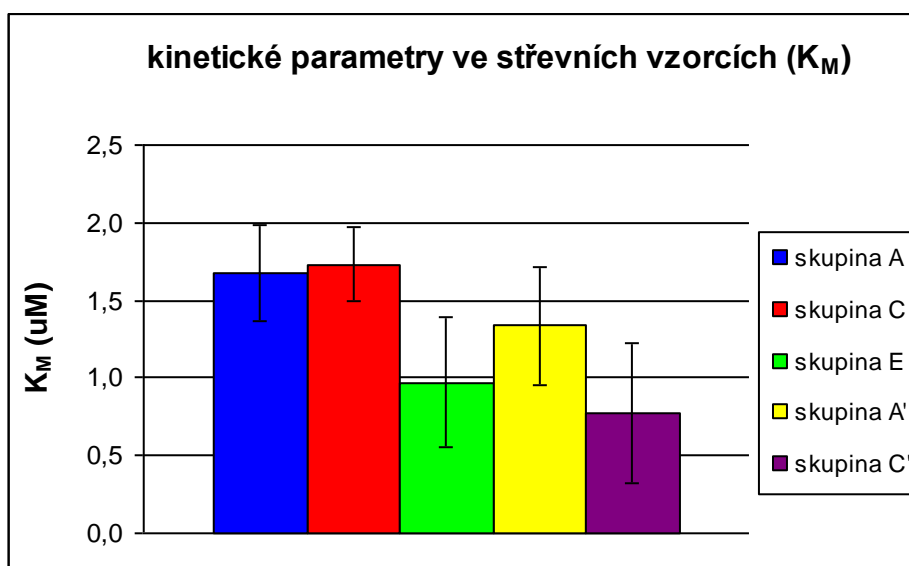
### 5.5.2.1 Kinetické parametry

Tab.26. Kinetické parametry ve střevních vzorcích

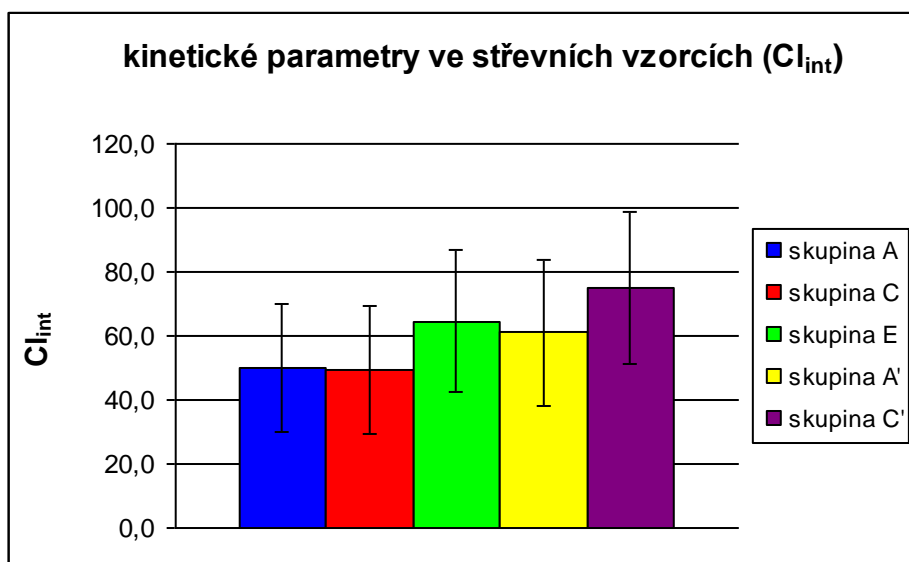
	$V_{MAX}$ (nM.min <sup>-1</sup> )	SD ( $V_{MAX}$ )	$K_M$ (μM)	SD ( $K_M$ )	$CI_{int}$	SD ( $CI_{int}$ )
skupina A	83,8	6,1	1,7	0,3	50,0	20,0
skupina C	85,3	4,8	1,7	0,2	49,3	19,9
skupina E	62,7	9,2	1,0	0,4	64,6	22,0
skupina A'	81,7	8,7	1,3	0,4	61,1	22,8
skupina C'	57,8	10,9	0,8	0,5	74,9	23,9



Obr.26. Kinetické parametry (maximální rychlost)



Obr.27. Kinetické parametry (Michaelisova konstanta)



Obr.28. Kinetické parametry (játerní clearance)

Z obrázku 26 je patrné, že rychlost redukce flubendazolu je prakticky totožná u skupin A (zdraví berani), C (berani nemocní 7 týdnů) a A' (zdravé ovce), určitý pokles byl zaznamenán u skupin E (berani nemocní 11 týdnů) a C' (ovce nemocné 7 týdnů). Porovnáme-li maximální rychlosti u samců (skupiny A, C, E), zjistíme, že rozdíl mezi zdravými a nemocnými zvířaty je prakticky zanedbatelný, k poklesu rychlosti redukce dochází až s prodlužující se délkou infekce. U samic byl pokles rychlosti zaznamenán už po 7 týdnech onemocnění.

Na obrázku 27 můžeme porovnávat velikost afinity enzymu k substrátu, přičemž nejvyšší afinitu k flubendazolu vykazovaly střevní redukční enzymy z nemocných samic (skupina C') a dlouhodobě nemocných samců (skupina E).

Jaterní clearance je dalším důležitým parametrem, z kterého lze odhadnout, jak rychle se játra dokáží očistit od dané látky. Z obrázku 28 můžeme vyčíst, že sledované skupiny se v tomto parametru signifikantně nelišily díky velkým směrodatným odchylkám.

## 6 Diskuze

Metabolismus léčiv může být ovlivněn mnoha patologickými stavy. Protože játra jsou hlavním orgánem metabolismu xenobiotik, nejvýznamnější změny v metabolismu léčiv působí onemocnění jater. Jaterní choroby ve většině případů snižují schopnost jater metabolizovat léčiva. Je několik možných příčin: může dojít ke snížení aktivity enzymů v játrech, ovlivnění průtoku krve játry nebo ke vzniku hypoalbuminémie, která vede ke snížení vaznosti léčiv na plasmatické proteiny. Prakticky jen u první příčiny, tedy snížení enzymové aktivity, dochází k přímému ovlivnění metabolismu léčiv. U dalších dvou případů se jedná pouze o nepřímé ovlivnění, ale výsledek může být totožný (Gibson a Skett, 2001).

Vliv na metabolismus léčiv nemusejí mít jen onemocnění jater, ale i jiné nemoci. Většinou se jedná o hormonální poruchy např. diabetes mellitus, hypertyreóza, insuficience nadledvin a mnoho dalších. V nedávné době bylo zjištěno, že i generální infekce způsobené např. *Listeria monocytogenes* ve značné míře ovlivní metabolismus léčiv (Gibson a Skett, 2001).

Rovněž i parazitické infekce mohou modifikovat schopnost hostitele metabolizovat léčiva a jiná xenobiotika. Změny v expresi a/nebo aktivitě biotransformačních enzymů, vyvolané parazitární infekcí, mohou mít značné farmakologické, toxikologické nebo fyziologické důsledky. Jedním z důsledků parazitózy může být snížení aktivity (inhibice) enzymů metabolizujících léčiva, což může mít za následek prodloužený účinek léčiv, zvýšení rizika nežádoucích účinků a delší setrvání léčiva v živočišných produktech. Rovněž může dojít k opačnému jevu, tedy ke zvýšení aktivity enzymů (indukci), která může způsobit zrychlenou deaktivaci léčiva a selhání léčby.

V minulých letech byl na Farmaceutické fakultě UK studován vliv dikroceliózy na biotransformační enzymy a metabolismus anthelmintika albendazolu u muflona. Původcem dikroceliózy je motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*), která parazituje v jaterních žlučových kanálcích hostitele. K léčbě dikroceliózy se používá benzimidazolové anthelmintikum albendazol. Bylo zjištěno, že infekce mladých muflonů dikroceliózou zvyšuje v určité míře aktivitu flavinových monooxygenas a oxidaci albendazolu a naopak významně snižuje aktivitu glutathion-S-transferasy v játrech (Skálová et al. 2007). U starých muflonek dikrocelióza

způsobila nejen významný pokles aktivity glutathion-S-transferasy, ale rovněž i signifikantní snížení aktivit UPD-glukuronosyltransferas a cytochromu P4503A (Křížová et al. 2008). Infekce zvířat jaterním parazitem motolicí kopinatou může tedy významně ovlivnit metabolismus veterinárních léčiv.

V současném projektu pracovníků Farmaceutické fakulty je studován vliv haemonchózy, gastrointestinální parazitózy přežvýkavců, na aktivitu jaterních a střevních biotransformačních enzymů a *in vitro* metabolismus anthelmintik u ovce domácí.

Haemonchóza je parazitární infekce vyvolaná vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*). K léčbě tohoto onemocnění se často využívají benzimidazolová anthelmintika. Flubendazol je širokospektré benzimidazolové anthelmintikum, které se ve velké míře používá ve veterinární medicíně prasat a drůbeže. Flubendazol je však účinný i na parazitózy malých přežvýkavců a mohl by být využíván i při terapii haemonchózy. Z tohoto důvodu je velice důležité poznat i biotransformaci flubendazolu u zvířat postižených haemonchózou, aby byla nastavena co nejracionalnější terapie, tzn. aby léčba haemonchózy pomocí flubendazolu byla efektivní s minimem vedlejších nežádoucích účinků, a aby se omezilo riziko vzniku rezistence helmintů vůči anthelmintické léčbě.

Biotransformace léčiv probíhá ve dvou základních fázích, kdy nejprve dochází k pozměnění struktury léčiva, což má za následek vznik polárnějšího metabolitu, který je v druhé fázi biotransformace konjugován s endogenní látkou a následně vyloučen z organismu (Velík et al., 2004). V první fázi biotransformace flubendazolu dochází k redukci karbonylové skupiny a k hydrolýze karbamátové skupiny. Stejná biotransformační cesta byla popsána i pro mebendazol, další benzimidazolové anthelmintikum strukturně podobné flubendazolu (Moreno et al., 2004). Obecně se předpokládá, že při redukci karbonylové skupiny dochází k deaktivaci anthelmintika, a že se tímto způsobem organismus chrání před toxickými účinky reaktivních aldehydů a ketonů. Zatím ještě nejsou dostupné žádné informace o anthelmintické aktivitě metabolitů flubendazolu. Protože však metabolity mebendazolu mají ve srovnání s parentní látkou významně nižší aktivitu, lze usuzovat, že při redukci flubendazolu dochází k jeho deaktivaci stejně jako tomu je u mebendazolu, což je strukturně velice blízká látka (Cvilink et al., 2008).

Úkolem předložené diplomové práce bylo testovat a porovnat *in vitro* biotransformaci anthelmintika flubendazolu v játrech a tenkém střevě ovcí zdravých



a ovcí postižených haemonchózou. Cílem tedy bylo zjistit, jaký vliv má parazitóza na biotransformaci flubendazolu, jestli je rozdíl v metabolismu flubendazolu v játrech a střevech, jaký vliv na biotransformaci má pohlaví testovaných zvířat nebo délka infekce.

Pro *in vitro* experimenty byly z jater ovcí připraveny subcelulární frakce (cytosolické), které obsahovaly biotransformační enzymy. Tyto frakce byly inkubovány se substrátem (flubendazol o koncentracích 0,15; 0,5; 1,5 a 5  $\mu$ M). Jako maximální koncentrace flubendazolu byla zvolena hodnota 5  $\mu$ M, při vyšších koncentracích již dochází k neúplnému rozpuštění FLU v inkubační směsi, což by mohlo negativně ovlivnit výsledky experimentu.

Množství vzniklého redukovaného flubendazolu se stanovovalo na základě achirální HPLC analýzy. Koncentrace redukovaného flubendazolu byly získány z kalibrační křivky, kde se použil redukovaný flubendazol jako vnější standard. Byl zkoušen i albendazol jako vnitřní standard, ale na chromatogramu se objevily, kromě píku albendazolu, další neidentifikovatelné píky, které interferovaly s píkem stanovovaného redukovaného flubendazolu. Z tohoto důvodu nebyl albendazol používán jako vnitřní standard.

Získané koncentrace byly následně přepočteny na rychlosti a specifické aktivity, které byly použity pro vyhodnocení výsledků. Pro porovnávání výsledků u jednotlivých skupin zvířat byly použity výsledky experimentů při koncentraci nejvyšší, tedy 5  $\mu$ M.

Vliv parazitózy na biotransformaci flubendazolu byl zjišťován na základě srovnávání výsledků u zdravých a nemocných zvířat. Z výsledků jasně vyplývá, že vlivem haemonchózy došlo ke snížení *in vitro* metabolismu flubendazolu v cytosolu jater i tenkého střeva, přičemž rychlost metabolismu je snížena průměrně o 30%. Ačkoli pokles aktivit reduktas flubendazolu o 30% není z farmakologického hlediska příliš významný, nicméně svědčí o tom, že infekce způsobená vlasovkou slézovou dokáže ovlivnit metabolismus anthelmintika flubendazolu jak ve střevech, tak i v játrech. Protože se vlasovka se vyskytuje pouze v žaludku přežvýkavců, může jaterní a střevní enzymy ovlivnit pouze nepřímo prostřednictvím uvolňovaných chemických látek, nikoli přímou destrukcí jaterní tkáně jako například motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*). I když pokles aktivit enzymů redukujících karbonylovou skupinu flubendazolu není příliš výrazný, je zde určitá možnost, že by se eliminace flubendazolu mohla zpomalit natolik, aby se rezidua tohoto

anthelmintika vyskytla v potravinách určených pro běžného spotřebitele. Ochranná lhůta pro flubendazolem léčená prasata je v České republice stanovena na 5 dní, zatímco třeba na Slovensku byla tato doba prodloužena na 14 dní, což je určitě bezpečnější (Janssen animal Health).

Při zjišťování vlivu délky onemocnění byly srovnávány ovce nemocné sedm týdnů a ovce, u nichž probíhala haemonchóza po dobu jedenácti týdnů. Zatímco v játrech je aktivita biotransformačních enzymů metabolizujících flubendazol o 44% nižší u 7-týdnů nemocných jedinců než u zvířat 11-týdnů nemocných, ve střevech je tomu přesně naopak: aktivita střevních reductas flubendazolu byla o 16% vyšší u 7-týdnů nemocných jedinců než u zvířat 11-týdnů nemocných.

Pro stanovení vlivu pohlaví byli porovnáváni ovce a berani. Srovnávána byla zvířata jak zdravá, tak i nemocná. Bylo zjištěno, že existuje rozdíl v biotransformaci flubendazolu mezi samci a samicemi, přičemž berani metabolizují flubendazol obecně rychleji než ovce. V játrech zdravých ovcí byla rychlost redukce flubendazolu nižší přibližně o 70% než v játrech zdravých beranů, zatímco ve střevech zdravých zvířat byl zaznamenán rozdíl v rychlosti redukce flubendazolu mezi samci a samicemi jen 10%. Co se týče nemocných jedinců, tak v játrech ovcí byla aktivita reductas flubendazolu nižší o 52% než v játrech beranů, a ve střevech ovcí byla aktivita reductas flubendazolu menší o 31% oproti beranům. Z toho vyplývá, že aktivita reductas flubendazolu v jaterních vzorcích je u samců více než dvojnásobná než u samic, zatímco ve střevních vzorcích není tento rozdíl tolik výrazný.

Kinetika enzymových reakcí vychází ze závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, přičemž základními zjišťovanými parametry byly maximální rychlost ( $V_{MAX}$ ) a Michaelisova konstanta ( $K_M$ ). U jaterních vzorků ale neodpovídala závislost rychlosti na koncentraci substrátu kinetice Michaelis-Mentenové, proto nemohly být zjištěny kinetické parametry  $V_{MAX}$  a  $K_M$ .

Ve střevech byla maximální rychlost redukce flubendazolu prakticky totožná u skupin A (zdraví berani), C (berani nemocní 7 týdnů) a A' (zdravé ovce), určitý pokles byl zaznamenán u skupin E (berani nemocní 11 týdnů) a C' (ovce nemocné 7 týdnů). Porovnáme-li maximální rychlosti u samců (skupiny A, C, E), zjistíme, že k poklesu rychlosti redukce flubendazolu došlo až u zvířat s dlouhodobou haemonchózou. U samic byl pokles rychlosti redukce flubendazolu ve střevním cytosolu zaznamenán už po 7 týdnech onemocnění.

Afinita enzymu k substrátu se vyjadřuje pomocí Michaelisovy konstanty, přičemž platí, že čím nižší je  $K_M$ , tím větší má enzym afinitu k substrátu. Nejvyšší afinita střevních cytosolových reductas k flubendazolu byla zaznamenána u skupiny nemocných samic (skupina C') a skupiny dlouhodobě nemocných samců (skupina E)

Jaterní clearance je dalším důležitým parametrem, z kterého lze odhadnout, jak rychle se játra dokáží očistit od dané látky. Sledované skupiny se v tomto parametru signifikantně nelišily díky velkým směrodatným odchylkám.

## 7 Závěr

Parazitóza ovčí způsobená vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*) ovlivnila *in vitro* biotransformaci flubendazolu. V játrech a střevech zvířat postižených haemonchózou byly zjištěny nižší aktivity enzymů katalyzujících přeměnu flubendazolu na redukovaný flubendazol než v játrech i střevech zdravých zvířat.

Na *in vitro* biotransformaci flubendazolu měla vliv i délka infekce zvířat. V jaterních vzorcích byla aktivita reductas flubendazolu u skupiny zvířat se 7-týdenní infekcí nižší než u skupiny dlouhodobě nemocných jedinců, zatímco krátkodobě nemocní berani měli ve střevních vzorcích vyšší aktivitu reductas flubendazolu než dlouhodobě nemocní.

Byl zjištěn výrazný rozdíl v *in vitro* metabolismu flubendazolu mezi berany a ovce. Jaterní i střevní cytosol samců vykazoval významně vyšší aktivitu reductas flubendazolu než cytosol samic.

## 8 Seznam použitých zkratek

ABZ	albendazol
ACN	acetonitril
ADH	alkoholdehydrogenasy
AKR	aldoketoreduktasy
ALDH	aldehyddehydrogenasy
BCA	bicinchoninic acid
BSA	hovězí sérový albumin
CR	karbonylreduktasa
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
E	enzym
EP	komplex enzym-produkt
ES	komplex enzym-substrát
FLU	flubendazol
FLU-HMET	hydrolyzovaný flubendazol
FLU-RMET	redukováný flubendazol
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinný kapalinový chromatograf
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
MRL	maximální reziduální limity
NAD	nikotiamidadenindinukleotid
NADH	redukováná forma nikotiamidadenindinukleotidu
NADPH	redukováná forma nikotiamidadenindinukleotidfosfátu
ND	nebylo detekováno
P	produkt
PC	papírová chromatografie
S	substrát
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
TLC	plošná chromatografie

## 9 Literatura

- Colin F. Poole a Salwa K. Poole, Chromatography Today, Elsevier science Publisher B.V., 1993, s.2-3
- Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběnová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L., Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology*, Volume 151, Issues 2-4, 2008, s.242-248
- Danaher M. et al., Review of methodology for the determination of benzimidazol residuem in biological matrice, *Journal of Chromatography B*, 845, 2007, s.2
- Deuster G., Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid, *Eur. J. Biochem.* 267, 2000, s.4315-4324
- Deuster G., Farres J., Felder M.R., Holmes R.S., Hoog J.O., Pares X., Plapp B.V., Yin S.J., Jornvall H., Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family, *Biochem. Pharmacol.* 58, 1999, s.389-395
- Forrest G.L., Gonzalez B., Karbonyl reduktase, *Chem. Biol. Interact.* 129, 2000, s.21-40
- Ghisi M., Kaminsky R., Mäser P., Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes, *Veterinary parasitology*, Volume 144, Issues3-4, s.313-320
- Gibson G.G., Skett P., Introduction to Drug Metabolism, Nelson Thornes Publisher, United Kingdom, 2001, s.3-168
- <http://www.wikipedia.org>
- <http://www.savci.upol.cz/teorie/domest.htm>
- [http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis\\_mon.html/](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_mon.html/)
- Janssen Animal Health, Flubenol 5%., informační leták
- Jez J.M.a Penning T.M, The aldo-keto reduktase (AKR) superfamily: an update. *Chem.-Biol. Interact.* 130-132, 2001, s.499-525

- Jez J.M., Flynn T.G, Penning T.M., A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily, *Biochem. Pharmacol.* 54, 1997, s.639-647
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., Gonzalez-Duarte R., Jeffery J., Ghosh D., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochem.* 34, 1995, s.6003-6013
- Katzung G. B., *Základní a klinická farmakologie*, 1994, s.48-58
- Kořínková K., *Obecná parazitologie*, Ústí nad Labem, 2006. s.38
- Křížová V., Lamka J., Szotáková B., Vokřál I., Srpová M., Urbánková M., Kubíček V., Nobilis M., Skálová L. Dicrocoeliosis of old mouflon ewes-effect on biotransformation enzymes and metabolism of anthelmintics *in vitro*. *Open Vet Sci J.* 2, 2008, s.23-31
- Kvasničková E., *Xenobiochemie*, Praha, Karolinum, 1995, s.
- Lamka J., Ducháček L. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Karolinum, 2006. s.61-69
- Lampo A., Vanparys Ph., Van Cauteren H., Report on the safety documentation of flubendazol, Department of Toxikology. Janssen Research Foundation, 1996, s.2-12
- Ledvina M., et al., *Biochemie pro studující medicíny*, Praha, Karolinum, 2004, s.31
- Lincová D. et al., *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, 2002, s.601
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M., *Farmakologie a toxikologie*, Georg Thieme Verlag, 2003, s.51-52
- Moreno L. et al., Integrated pharmacological assessment of flubendazole potential for use in sheep: disposition kinetice, liver metabolism and parasite diffusion ability, *Journal of Veterinary Pharmacol. Therap.* 27, 299-308, 2004, s.300
- Nobilis M. et al., Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices usány UV photodiode-array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, Volume 1149, Issue 1, 2007, s.112-120
- Oppermann U.C., Filling C., Hult M., Shafqat N., Wu X., Lindh M., Shafqat J., Nordling E., Kallberg Y., Persson B., Jörnvall H., Short-chain

dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update, Chem. Biol. Interact. 143-144, 2003, s.247-253

- Oppermann U.C., Maser E., Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes, Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reaction, Toxicology 144, 2000, s.71-81
- Parkinson A., Biotransformation of xenobiotics. In Casarett & Doull's: Toxicology, the basic science of poisons (Ed. Klaassen, C.D.), McGraw-Hill, Inc., 2001, s.133-224
- Petersen D.R., Lindahl R., Aldehyde dehydrogenases. In: Guengerich F.P. (Ed.), Comprehensive toxicology, Biotransformation, vol. 3, Pergamon Press, New York, s.97-118
- Skálová L., Křížová V., Cvilink V., Szotáková B., Štorkánová L., Velík J., Lamka J., Muflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effects of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver, Veterinary Parasitology, Volume 146, Issues 3-4, 2007, s.254-262
- Szotáková B., Biotransformační redukce léčiv s karbonylovou skupinou, 2005, s.2-20
- Šavlík M. et al., The effects of flubendazole and mebendazole on cytochromes P4501A in pheasant hepatocytes, Research in Veterinary Science, Volume 79, Issue 2, 2005, s.139-147
- Testa B., The metabolism of drugs and other xenobiotics, Academic press, London, 1995
- Velík J., et al., Benzimidazole drugs modulation of biotransformation enzymes, Veterinary Science 76, 2004, s.95-108