

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ METABOLISMUS  
ANTHELMINTIK**

disertační práce

**Hradec Králové, 2009**

**Mgr. Veronika Forstová (roz. Křížová)**

Práce prezentované v této disertační práci vznikly za finanční podpory Grantové agentury České republiky (grant číslo 524/06/1345 a 524/07/0611) a Fondu mobility Univerzity Karlovy.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura, z které jsem při zpracovávání čerpala, je uvedena v seznamu použité literatury a v práci řádně citována.

## **Poděkování**

## Obsah

Seznam použitých zkratk	4
1. Úvod	6
2. Teoretická část	7
2.1. Obecné aspekty biotransformace	7
2.2. Biotransformační enzymy	8
2.3. Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů/metabolismus xenobiotik	10
2.3.1. Mezdruhové rozdíly v metabolismu xenobiotik	11
2.3.2. Pohlaví	12
2.3.3. Genetické faktory	13
2.3.4. Věk	14
2.3.5. Výživa, alkohol	16
2.3.6. Modulace biotransformačních enzymů (enzymová indukce a inhibice chemickými látkami)	17
2.3.7. Patologické stavy	19
2.3.8. Životní prostředí, kouření	19
2.3.9. Hormonální změny, těhotenství	20
2.4. Faktory ovlivňující metabolismus anthelmintik	22
2.4.1. Mezdruhové rozdíly v biotransformačních enzimech a metabolismu anthelmintik	23
2.4.2. Rozdílnost v metabolismu a farmakokinetice anthelmintik u sameců a samic	27
2.4.3. Rozdíly ve farmakokinetice anthelmintik v závislosti na věku zvířat	29
2.4.4. Vliv stravy na farmakokinetiku anthelmintik	30
2.4.5. Vliv medikace na metabolismus a farmakokinetiku anthelmintik	32
2.4.6. Vliv onemocnění zvířat na farmakokinetiku anthelmintik	34
2.4.7. Těhotenství (březost) a farmakokinetika anthelmintik	37
2.4.8. Životní prostředí a metabolismus anthelmintik	36
3. Cíle práce	39
4. Výsledky	40
4.1. Vliv patologického stavu na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik	40
4.1.1. Vliv dikroceliózy na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik u ovce muflon	40
4.1.2. Vliv hemonchózy na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik u ovce domácí	43
4.2. Vliv léčby zvířat anthelmintikem na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik <i>in vitro</i>	45
4.3. Vliv pohlaví a věku zvířat na farmakokinetiku FLU	47
5. Závěr	50
6. Souhrn/Summary	52
7. Seznam použité literatury	55
8. Přílohy	
8.1. Seznam publikací vztahujících se k tématu disertační práce	
8.2. Seznam všech publikací	
8.3. Seznam prezentací na vědeckých setkáních	

## Seznam použitých zkratek

ABZ	albendazol
ABZSO	albendazol sulfoxid
ABZSO <sub>2</sub>	albendazol sulson
AKR	aldo-keto reduktasa
ANDH	acenaftenol dehydrogenasa
AUC <sub>(0-tz)</sub>	plocha pod křivkou plazmatická koncentrace vs. čas od podání do poslední koncentrace nad detekčním limitem
AUC <sub>tot</sub>	vypočtená plocha pod křivkou plazmatická koncentrace vs. čas od podání do ∞
BROD	7-benzyloxyresorufin <i>O</i> -dealkylasa
CBR	karbonyl reduktasa
C <sub>max</sub>	maximální koncentrace v plazmě
CXOH	chlorzoxazon hydroxylasa
CYP	cytochrom P450
DAUR	daunorubicin reduktasa
DCNB	1,2-dichloro-4-nitrobenzen
DMSO	dimetylsulfoxid
ECOD	7-ethoxycoumarin <i>O</i> -deethylasa
EROD	7-ethoxyresorufin <i>O</i> -dealkylasa
FBZ	fenbendazol
FLU	flubendazol
FLU-H	hydrolyzovaný flubendazol
FLU-R	redukovaný flubendazol
FMO	flavinové monooxygenasy
GALR	glyceraldehyd reduktasa
GI	gastrointestinální
GIT	gastrointestinální trakt
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSD	hydroxysteroid dehydrogenasa
i.r.	intraruminální podání
IVM	ivermektin
MBZ	mebendazol
METR	metyrapon reduktasa
MFCD	7-methoxy-4-trifluoromethylkumarin demethylasa
MROD	7-methoxyresorufin <i>O</i> -dealkylasa
MRT	mean residence time, čas setrvávání léčiva v těle
MTZ	methimazol
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAT	N-acetyltransferasa
NTB	netobimin (proléčivo albendazolu)
OFZ	oxfendazol, monooxidovaný FBZ, FBZSO
ORR	oracin reduktasa
OXB	oxibendazol
p.o.	perorální podání
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát

PCBs	polychlorované bifenyly
PROD	7- pentoxyresorufin <i>O</i> -dealkylasa
s.c.	subkutánní podání
SULT	sulfotransferasa
$t_{1/2}$	plazmatický poločas
TBSO	thiobenzamid-S-oxidasa
TCBZ	triklabendazol
TCDD	tetrachlordibenzodioxin
$T_{max}$	čas od podání léčiva po dosažení maximální koncentrace v plazmě
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UV	ultrafialový
12-LOH	12-hydroxylasa kyseliny laurové
6 $\beta$ -TOH	6 $\beta$ -testosteron hydroxylasa

## 1. ÚVOD

Parazitózy hospodářských i volně žijících zvířat představují v současné době celosvětový problém jak z hlediska počtu postižených jedinců, tak z hlediska rychlého rozvoje rezistence parazitů vůči dosud známým anthelmintikům. Helmintorezistence vzniká často v důsledku špatně prováděné medikace (poddávkování, příliš časté podávání anthelmintik ze stejné skupiny atd.) a to několika mechanismy – zrychlený eflux léčiva z těla parazita, změna cílového místa zásahu anthelmintika u parazita nebo ovlivnění biotransformačních enzymů parazita i hostitele.

V našich projektech se zabýváme úlohou biotransformačních enzymů parazita i hostitele v rozvoji rezistence parazitujících červů na benzimidazolová anthelmintika. Mezi velmi časté helmintózy malých přežvýkavců (ovce, koza, muflon) patří dikrocelióza způsobená motolicí kopinatou (*Dicrocoelium dendriticum*, Trematoda) a hemonchóza způsobená vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*, Nematoda). Parazitóza způsobuje zvířatům značné zdravotní potíže a chovatelům velké ekonomické ztráty. Jediným dostupným prostředkem v profylaxi či léčbě parazitózy je podávání anthelmintik.



**Obr.1** Muflon (*Ovis musimon*).  
Časté cílové species našich experimentů.  
Foto J. Lamka

Mezi nejčastěji podávaná patří anthelmintika s širokým spektrem účinku ze skupin benzimidazolů (např. albendazol, flubendazol, fenbendazol, thiabendazol) či avermektinů (ivermektin). Významnou roli v účinku terapie hrají biotransformační enzymy jak parazita tak hostitele. Aktivita biotransformačních enzymů může být obecně ovlivněna celou řadou faktorů. Poznání faktorů, které ovlivňují biotransformaci anthelmintik u cílových species, může napomoci bezpečnější i účinnější terapii parazitóz a snížit rozvoj rezistence. Studium

metabolismu anthelmintik a faktorů, které ho ovlivňují, je náplní mého doktorského studia a této disertační práce.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1. Obecné aspekty biotransformace**

Živé organismy přicházejí během svého života do neustálého kontaktu s chemickými látkami z okolního prostředí. Sloučeniny, které mohou být zdrojem energie, prekurzorů pro syntézu makromolekul, které mohou sloužit jako vitamíny a další životně nezbytné složky potravy, jsou považovány za látky tělu vlastní, tzv. eobiotika. Do organismů však vstupují i látky nežádoucí a tělu cizí, tzv. xenobiotika, z nichž řada může být pro organismus nebezpečná. Nejčastějšími xenobiotiky, se kterými se organismus setkává, jsou léčiva, potravní aditiva, agrochemikálie, průmyslové chemikálie a chemické zplodiny moderní lidské civilizace.

Zájem o metabolismus léčiv začal v 1. polovině 19. století, kdy byla kyselina hippurová (konjugát kyseliny benzoové s glycinem) nalezena v koňské moči. Roku 1841 Alexander Ure jako první pozoroval konverzi kyseliny benzoové na kyselinu hippurovou a navrhl ji k léčbě dny. Toto je považováno za první humánní metabolickou studii (Testa and Krämer, 2006).

Jako ochranu před nežádoucím působením chemických sloučenin si organismy během svého vývoje vytvořily enzymové systémy, které dokáží xenobiotika transportovat a chemicky přeměnit a tím snížit či zastavit jejich působení. Tento proces se nazývá metabolismus xenobiotik. Metabolismus xenobiotik zahrnuje transport a biotransformaci a účastní se ho transportní proteiny a biotransformační enzymy. Přeměna xenobiotik probíhá od látek nepolárních či málo polárních k látkám polárním, snáze vyloučitelným z organismu. Metabolismus xenobiotik probíhá ve třech fázích. V první fázi xenobiotikum podléhá reakcím oxidačním, redukčním či hydrolytickým. Ve druhé fázi je xenobiotikum či metabolit z první fáze konjugován s endogenní sloučeninou (kyselinou glukuronovou, glutathionem, aktivním sulfátem, S-adenosylmethioninem, různými aminokyselinami nebo mastnými kyselinami). Třetí fáze označuje transport xenobiotika, metabolitu či konjugátu přes membrány pomocí speciálních proteinových transportérů.

Biotransformační enzymy a transportní systémy se vyskytují prakticky ve všech buňkách organismu, v některých orgánech je však jejich aktivita vyšší. Kromě jater, která jsou hlavním orgánem biotransformace, jsou významnými metabolizujícími orgány plíce, ledviny, kůže, GIT, krev, placenta a mozek. Na biotransformaci xenobiotik se významnou měrou podílí i bakteriální intestinální mikroflóra. Z hlediska subcelulární lokalizace je možno biotransformační enzymy nalézt jak rozpuštěné v cytoplazmě, tak vázané na buněčné organely, nejčastěji na endoplazmatickém retikulu, dále na mitochondriích, v lysozomech, v obalech jádra nebo v plazmatické membráně (Testa and Caldwell, 1995).

Enzymy metabolizující xenobiotika mají na rozdíl od svých protějšků určených pro endogenní metabolismus vůči substrátům mnohem nižší selektivitu i specifitu účinku. Jeden enzym tak může přeměňovat řadu chemicky odlišných látek zavedením i více druhů substituentů do struktury xenobiotika. Typickou vlastností je taktéž indukovatelnost tj. zvýšení množství enzymu vyvolané kontaktem organismu s určitým xenobiotikem.

Obecně platí, že původní látka a metabolity či konjugáty se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi a farmakodynamickým efektem stejně jako toxicitou a farmakokinetickým chováním. Výskyt a aktivita biotransformačních enzymů určuje cestu a rozsah, kterým jsou léčiva a jiná xenobiotika metabolizována. Proto tedy enzymy metabolizující xenobiotika podstatně ovlivňují biologický efekt (žádoucí i nežádoucí) podávaných léčiv. V případě anthelmintik aktivita těchto enzymů jak u hostitelů tak u parazitických helmintů podstatně ovlivňuje farmakoterapii helmintóz.

Znalost metabolismu a enzymů účastnících se metabolismu každého léčiva je důležitá pro efektivní a bezpečnou farmakoterapii. U léčiv pro humánní používání je toto zkoumáno v průběhu preklinického a klinického zkoušení. Ve veterinární farmakologii nejsou obdobná data dostatečná. Navíc velké mezidruhové rozdíly významně omezují mezidruhovou extrapolaci dat.

## **2.2. Biotransformační enzymy**

Základnímu popisu biotransformačních enzymů 1. a 2. fáze se věnovalo mnoho prací, proto jsem jejich popis zde pojala velmi stručně.

Nejvýznamnější enzymy účastnící se 1. fáze biotransformace jsou cytochromy P450 (CYP), hemoproteiny vyskytující se ve všech živých organismech. Tisíce různých CYPů bylo identifikováno a zařazeno do několika rodin a podrodin podle sekvenční homologie genů.



CYPy obecně katalyzují monooxygenaci substrátů, ale jsou také schopné peroxidasové nebo reduktasové aktivity. Kromě metabolismu cizorodých látek, hrají též významnou roli v metabolismu endogenních látek (steroidů, mastných kyselin a prostaglandinů) (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001, Gibson and Skett, 2001, Dostálek, 2006).

Flavinové monooxygenasy (FMO) zprostředkovávají oxidaci mnohých xenobiotik, preferují substráty s nukleofilním dusíkovým či sírovým atomem. Rodina FMO genů je mnohem menší než rodina CYP a její fyziologická úloha je pouze málo známa, přesto je aktivita FMO významná v biotransformaci mnoha xenobiotik (Krueger and Williams, 2005).

Peroxidasy, monoaminoxidasy a xantinoxidasy představují další enzymy katalyzující oxidaci xenobiotik (Utrecht and Trager, 2007).

Alkoholy, aldehydy a ketony jsou metabolizovány prostřednictvím působení reduktas/dehydrogenas. Tyto enzymy jsou klasifikovány do tří proteinových skupin: dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenasy se středním řetězcem (MDR) a aldo-keto reduktasy (AKR) (Jez and Penning, 2001). Reduktasy/dehydrogenasy metabolizují jak xenobiotika, tak endogenní látky. Reduktivní biotransformace je méně častá než oxidační, ale v případě aldehydů, ketonů, chinonů, nitrosloúčenin, N-oxidů či S-oxidů může být redukce hlavní metabolickou cestou.

Mnohá xenobiotika, jako estery, amidy a epoxidy, podléhají hydrolytické biotransformaci. Několik hydrolas (např. acetylcholinesterasa, peptidasy), jejichž hlavní role je v endogenním metabolismu, mohou se též podílet na metabolismu xenobiotik (Testa and Mayer, 2003).

Většina metabolitů vytvořených během 1. fáze a xenobiotika obsahující příslušné funkční skupiny jsou konjugovány s endogenními látkami. Konjugací se obvykle do molekuly xenobiotika vnese hydrofilní ionizovatelná funkční skupina, čímž se stane více polární a lépe vyloučitelná z organismu ledvinami. Glukuronidace je nejčastější konjugační cesta u savců. Zprostředkovávají ji UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) ze dvou rodin. Typickými substráty UGT jsou eobiotické či xenobiotické alkoholy, fenoly či karboxylové kyseliny. Elektrofilní substráty jsou obvykle konjugovány s glutathionem prostřednictvím glutathion-S-transferasy (GST). Tyto enzymy chrání biomolekuly proti škodlivému působení elektrofilů byly nalezeny ve všech organismech, u kterých byla jejich přítomnost testována. Karboxylové kyseliny a aminy jsou substráty pro konjugaci s aminokyselinami. Aromatické aminy či hydroxylaminy mohou podléhat acetylaci díky N-acetyltransferasám (NAT). Dalším typem konjugačních reakcí je sulfatace zprostředkovaná sulfotransferasami (SULT) (Utrecht and Trager, 2007).

Hydrofilní konjugáty a metabolity nemohou projít přes lipidovou membránu, proto musí být transportovány pomocí specifických proteinových transportérů. Klíčovou roli v efluxu xenobiotik i eobiotik hrají ABC transportéry (ATP-binding cassette). Některé z těchto transportérů, jako např. P-glykoprotein (ABCB1) nebo multi-drug resistance proteins (ABCC1-6), jsou významné z hlediska rozvoje lékové rezistence (Quellette and Legare, 2003).

Všechny tyto tři systémy, enzymy 1.fáze, konjugační enzymy a transportéry, slouží k detoxifikaci potenciálně škodlivých xenobiotik a jejich aktivita je klíčová v efektu a účinnosti léčiv a jiných xenobiotik.

### **2.3. Faktory ovlivňující aktivitu biotransformačních enzymů/metabolismus xenobiotik**

V metabolismu léčiv a jiných xenobiotik byly zjištěny velké inter- i intra-individuální rozdíly, jež mohou být výsledkem faktorů genetických, vývojových, patologického stavu organismu, výživy a prostředí, mnohdy s velkým významem pro terapii. V současnosti jsou pečlivě studovány všechny vlivy, které působí na aktivitu biotransformačních enzymů. Rozdílná aktivita biotransformačních enzymů vede ve svém důsledku k variabilním plazmatickým a tkáňovým hladinám podaného léčiva či jiné cizorodé látky, což ovlivňuje vlastní terapeutický/toxický účinek látky na organismus (Lincová et al., 2002).

Inter-individuální faktory jsou faktory, které se liší mezi jedinci, zůstávají však neměnné během života jedince. Jsou to vlivy „zapsané“ do genomu.

Intra-individuální faktory jsou faktory, které se mohou měnit (a zpravidla mění) v průběhu života daného organismu. Jsou to vlivy mající příčinu ve fyziologických, patologických či vnějších okolnostech (Krämer and Testa, 2008, Gibson and Skett, 2001).

<b>Faktory ovlivňující metabolismus xenobiotik</b>	
<b>Inter-individuální faktory</b>	<b>Intra-individuální faktory</b>
druh	věk
pohlaví	výživa, alkohol
genetické faktory (polymorfismus)	medikace (enzymová indukce/inhibice) patologické stavy

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 kvalitativní tak kvantitativní. V případech kvantitativního rozdílu je k přeměně xenobiotika využívána stejná metabolická cesta, pouze se liší rozsah této 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 podaná léčiva.

### 2.3.1 Mezi druhové rozdíly v metabolismu xenobiotik

Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující kvalitativní i kvantitativní průběh metabolických cest xenobiotik v organismu náleží 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 k určení biotransformačních pochodů u jiných species jsou značné mezi druhové 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 mezi druhových rozdílů v substrátové specifitě a v indukovatelnosti/inhibovatelnosti daného enzymu (Fink-Gremmels and van Miert, 1996).

Nejpoužívanějším druhem experimentálního zvířete je potkan. Systematické porovnávání vlastností cytochromů P450 u potkana a člověka poukázalo na relativně nízkou homologii lidských a potkaních isoform (Souček and Gut, 1992). Z porovnání metabolismu některých léčiv u potkana a hospodářských zvířat je zřejmé, že ani pro predikci metabolismu veterinárních léčiv není potkan příliš ideální species. Mezi dalšími laboratorními zvířaty (myš, morče, křeček, králík) také nebylo nalezeno species použitelné jako univerzální model pro biotransformační studie veterinárních léčiv (Nebbia, 2001). Experimenty provedené na řadě species však zvyšují šanci nalézt relativně optimální model ke studiu určité konkrétní problematiky (Valles et al, 1995). Stále více se totiž ukazuje, že pouze pro konkrétní metabolickou přeměnu je šance nalézt modelové species co nejpodobnější cílovému druhu. Na základě mezi druhových porovnání je pak vybrán takový druh zvířete, u něhož výsledky experimentů umožní co nejpřesnější predikci studované metabolické přeměny daného léčiva u

cílového species. Nalezení vhodného modelového druhu má zásadní význam k získání těch metabolitů, jejichž chemická syntéza v dostatečném množství pro identifikaci a zkoušky biologických aktivit je prakticky nemožná či velmi obtížná.

Přestože jsou informace získané z experimentů na laboratorních zvířatech velmi cenné, pro registraci nových léčiv a přípravků jsou v humánní medicíně nezastupitelné experimenty s lidskými preparáty. V humánní toxikologii a farmakologii je navíc kladen obrovský důraz na detailní znalost enzymů zodpovědných za biotransformaci každého potenciálního léku i škodliviny u člověka.

Zcela neprávem je toto opomíjeno při vývoji a testování veterinárních léčiv. Přitom při farmakokinetických studiích jakýchkoli veterinárních léčiv je možnost extrapolace výsledků jak z laboratorních zvířat tak i z člověka na hospodářská zvířata značně problematická. Velmi komplikované je to především u druhů dominujících v užívání veterinárních léčiv – přežvýkavců. Jelikož jde často o léčiva podávaná enterální cestou, již zásadní rozdílnost ve fyziologii a anatomii zažívacího traktu způsobí odlišné chování léčiva v organismu. Závažnými odlišnostmi jsou až řádový rozdíl hmotnosti léčeného subjektu, užívání jednoduchých bolusových dávek, objem a složení potravy, odlišná chemie, mikrobiologie a objem zažívací soustavy, rozdílná biotransformace a distribuce léčiva. Dosud velmi málo byly také zkoumány důsledky dlouhodobé expozice při podání léčiva ve formě s dlouhodobým účinkem u přežvýkavců (Baggot and McKellar, 1994).

Veterinární farmakologie je navíc oproti farmakologii humánní v celé své podstatě komplikovaná velkým počtem a rozdílností cílových species. A tak i léčivo detailně po všech stránkách popsané u jednoho cílového druhu zůstává velkou neznámou pro použití u jiných cílových druhů. Toto je třeba mít na zřeteli nejen pro bezpečnou a efektivní farmakoterapii zvířat, ale i pro bezpečnou konzumaci živočišných produktů.

### **2.3.2 Pohlaví**

První zmínku o pohlavní rozdílnosti v metabolismu léčiv publikovali v roce 1932 Nicolas a Barron, kteří zjistili, že samice potkanů potřebují k navození spánku poloviční dávku barbiturátů oproti samcům (Gibson and Skett, 2001).

Vliv pohlaví na metabolismus byl popsán u mnoha léčiv a živočišných druhů (potkan, myš, opice, pes, kočka, pstruh) včetně člověka. Rozsah pohlavní rozdílnosti se liší dle species a konkrétní podané substance. Například u potkana byl v mnoha případech popsán vyšší oxidativní metabolismus u samců, u myši naopak u samic (Witkamp et al, 1991).

Pohlavní rozdílnost v metabolismu xenobiotik je významnou měrou dána rozdílností v přítomnosti (množství) různých isoformů cytochromu P450 u jedinců mužského a ženského pohlaví. Exprese sex-specifických isoformů CYP je komplexně hormonálně regulována (Mugford and Kedderis, 1998). Pohlavní rozdíly v metabolismu zřejmě vyplývají z odlišné hladiny pohlavních hormonů samců (androgeny) a samic (estrogeny a progesterony). Přítomnost sex-specifických isoenzymů je kontrolována růstovým hormonem, hormony gonád a hypotalamu.

Vliv pohlaví se projevuje jak ve farmakodynamice tak i ve farmakokinetice. V oblasti farmakokinetiky byly popsány rozdíly v biodostupnosti, distribuci, metabolismu a eliminaci určitých léčiv mezi samci a samicemi. Tyto rozdíly jsou dány odlišností v tělesné hmotnosti, objemu plazmy, rychlosti vyprazdňování žaludku, hladinou plazmatických proteinů, aktivitou CYP, funkcí transportérů léčiv a hodnotou clearance (Franconi et al, 2007).

Pohlavní rozdílnost v metabolismu xenobiotik je velmi významná z toxikologického pohledu. Nižší clearance látek u pohlaví s pomalejším metabolismem způsobí prodloužený biologický poločas a vyšší koncentraci látky v plazmě, což může působit toxicky. Naopak, pokud je toxický až metabolit, pohlaví s nižší metabolickou aktivitou je méně ovlivněno specifickou, chemicky indukovanou toxicitou (Mugford and Kedderis, 1998).

### **2.3.3 Genetické faktory**

Geneticky podmíněné rozdíly v metabolismu léčiv se odhalí pouze tehdy, když se ve skupině lidí, kteří dostávají stejnou dávku léčiva ve stejném dávkovacím schématu, vyskytnou jedinci s nečekanou a mimořádnou odpovědí na dané léčivo. Buď se léčivo odbourává velmi pomalu, čímž se zvyšuje riziko jeho kumulace (a tedy i výskytu toxických účinků) v organismu, anebo je léčivo biotransformováno příliš rychle a nemusí přitom dosáhnout ani terapeutických hladin (Kvasničková, 1995). Studium geneticky podmíněných předpokladů pro variabilitu účinnosti a bezpečnosti léčiv se zabývá relativně mladý vědní obor – farmakogenetika. Snaží se o individualizaci farmakoterapie tím, že hledá léčivo „šité na míru“ každému konkrétnímu pacientovi. Za cíl si klade zvýšit účinnost léčiva a zároveň snížit riziko vzniku nežádoucích účinků individualizací dávek léčiva.

Vzhledem ke geneticky podmíněným změnám metabolismu xenobiotik je možné nalézt v populaci dva fenotypy - pomalé a rychlé metabolizátory. Některá odborná literatura uvádí fenotypy tři - pomalé, středně rychlé (normální) a rychlé metabolizátory.

- Pomalí metabolizátoři

U těchto jedinců je defektní či částečně vadný gen pro daný biotransformační enzym, což vede k tvorbě nefunkčního enzymu a ke snížené rychlosti metabolismu léčiva. Důsledkem může být zvýšená biodostupnost léčiva nebo jeho zpomalená eliminace a přehnaná odpověď na podané léčivo.

- Rychlí metabolizátoři

Tito jedinci mají ve své genetické výbavě duplikovaný či amplifikovaný gen, který odpovídá za strukturu konkrétního enzymu. Dochází k rychlému odbourávání podané léčivé látky nebo naopak k rychlé bioaktivaci některých prokancerogenních cizorodých sloučenin.

Termín **genetický polymorfismus** enzymu vyjadřuje existenci různých variant téhož enzymu v populaci. Podstatou polymorfismu je mutace genu nesoucího informaci o struktuře daného enzymu. Vlivem mutací (často bodových) vzniká několik alelických variant. Důsledkem genetických rozdílů může být individuální citlivost vůči některým xenobiotikům, vznik různých onemocnění vyvolaných léčivou či vyšší riziko nádorových onemocnění (Kvasničková, 1995).

Příkladem výrazného enzymového polymorfismu je polymorfismus N-acetyltransferasy u lidí, ale i myši a králíků. Podle rychlosti acetylace se dělí populace na rychlé a pomalé acetylátory. Pomalý typ acetylace se projeví u homozygotních jedinců se dvěma recesivními alelami. U pomalých acetylátorů tuberkulotiků se výrazně projevuje toxicita podávaného isoniazidu.

#### 2.3.4 Věk

Je známo, že mladá, zvláště pak novorozená, a velmi stará zvířata jsou mnohem citlivější k účinku podaných léčiv než dospělá zvířata.

Rozdíly ve farmakokinetice léčiv mezi novorozenými mláďaty a dospělými zvířaty se liší dle druhu, substrátu a pohlaví. Farmakokinetické změny během dospívání jsou spojeny se změnami v absorpci, distribuci, metabolismu a renální exkreci. Jedním z nejvýznamnějších kinetických rozdílů je prodloužený eliminační poločas u novorozenců, který je způsoben zejména nezralostí jaterních biotransformačních cest a/nebo nevyvinutostí renálních exkretčních procesů. Je známo, že LD<sub>50</sub> je pro mnohá léčiva mnohem nižší u novorozenců než u dospělých laboratorních zvířat. Proto změněná farmakokinetika může zesílit a prodloužit

farmakologický efekt a /nebo vyústit v toxické působení, kde je poté požadováno snížení dávky léčiva (Nouws, 1992).

Po narození se různé metabolické cesty liší ve své aktivitě. Například oxidační aktivita některých CYP isoenzymů či konjugace s glukuronovou kyselinou nejsou po narození plně vyvinuté, zatímco acetylase u skotu a prasat je plně funkční. U telat se oxidační metabolismus vyvíjí postupně, záleží též na typu léčiva a složení stravy a plně funkční je asi ve věku 3-12 týdnů zvířat. Různé skupiny CYP isoenzymů se liší v rychlosti maturace. Je zajímavé, že krmení telat vlákninou stimuluje rychlost a rozsah oxidačního metabolismu, zatímco mléčná strava zpomaluje nárůst oxidační schopnosti jater. Plná glukuronyltransferasová aktivita je dosažena mezi 2 a 6 týdnem věku u hříbat, prasat, telat a dětí. Acetylační reakce u telat a prasat jsou plně funkční při narození, zatímco deacetylační se na úroveň dospělců dostanou až během 5-10 týdnů. Navíc velká deacetylační kapacita přežvýkavců a prasat vedla k nesprávnému úsudku, že tato zvířata jsou pomalí acetylátoři (Nouws, 1992).

Ve stáří se clearance léčiv snižuje z důvodu nižší metabolické schopnosti jater, nižšího množství mikrosomálních monooxygenasových enzymů, nižší velikosti jater (až o 24 - 35 %) a sníženému krevnímu průtoku játry (až o 35 %) (Wynne, 2005), dále nižší exkreční schopnosti ledvin. Zvyšuje se množství tělesného tuku a snižuje se množství vody, z čehož vyplývá větší distribuční objem lipofilních léčiv a nižší distribuční objem hydrofilních léčiv, s čímž souvisí nižší plazmatické koncentrace lipofilních a vyšší hydrofilních léčiv (Turnheim, 2004).

U léčiv, která nejsou metabolizována, není třeba dávky upravovat, léčiva, která se kumulují v některých tkáních, tuto úpravu potřebují. Léčiva, která jsou intenzivně metabolizována, by mohla mít delší eliminační poločas nebo by se mohla kumulovat po opakovaném podávání novorozencům. Pro tento typ léčiv se během prvních tří týdnů dávkovací interval prodlužuje dvojnásobně nebo se dávky léčiva snižují na polovinu dávky dospělých zvířat (Nouws, 1992).

Léčiva podaná novorozeným mláďatům zvířat s produkty pro lidský konzum (skot, ovce, koza, prase) mohou vykazovat odlišnou farmakokinetiku než dospělá zvířata stejného druhu. Nežádoucí důsledky, jako třeba suboptimální terapeutická koncentrace, toxický efekt, zbytky léčiva ve tkáních, mohou nastat, jestliže dávkovací schéma používané u dospělců je použito u mladých zvířat. Nezralost mechanismů absorpce léčiv (z ho traktu (GIT), parenterálně), distribuce léčiv (plazmatické proteiny, tuková tkáň, tělní tekutiny), role vývojových změn na biotransformaci léčiv v játrech a jiných orgánech, zralost exkrečních orgánů (během dospívání je popsána zvýšená rychlost clearance léčiv) – všechny tyto faktory

mohou mít vliv na rozdílný metabolismus léčiv nedospělých a dospělých zvířat. Farmakokinetické studie s konkrétními léčivy u cílových druhů jsou důležité ke stanovení racionálního používání léčiv u nedospělých zvířat s produkty pro lidský konzum (Schwark, 1992).

### 2.3.5 Výživa, alkohol

Z hlediska vlivu výživy můžeme složky potravy rozdělit na makrosložky (proteiny, tuky a cukry) a mikrosložky (vitamíny a minerály). Přítomnost **lipidů** v potravě je důležitá pro biotransformační enzymy, protože estery cholesterolu, triglyceridy, cholesterol, mastné kyseliny a fosfolipidy se účastní tvorby membrán, na které je většina biotransformačních enzymů vázána. Zejména mikrosomální monooxygenasy jsou lokalizovány na membránách endoplazmatického retikula buněk a fosfolipidy jsou nezbytné pro jejich aktivitu. Dieta bez tuků a bez nenasycených mastných kyselin podávaná tři týdny potkanům způsobila pokles aktivity cytochromu P450, aktivita mikrosomálních monooxygenas se upravila na normální hodnoty po opětovném podávání diety s obsahem tuků i nenasycených mastných kyselin (Kvasničková, 1995). Snížený přísun **proteinů** působí pokles aktivity oxidačních enzymů (Jorquera et al, 1996), což je zřejmě důsledkem sníženého množství celkového mikrosomálního proteinu. Efekt nižšího příjmu proteinů na metabolismus 2. fáze je komplexnější, některé aktivity vzrůstají, jiné klesají. **Cukry** mají jen malý přímý vliv na játerní metabolismus. **Vitamíny** jsou potřebné pro syntézu proteinů a lipidů, které jsou základními složkami enzymového systému. Proto není divu, že zejména deficiencie těchto složek může ovlivnit metabolickou schopnost. Mezi vitamíny, které ovlivňují metabolismus léčiv patří vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, E a K. Deficiencie **minerálů** (Ca, Mg, Fe, K, Cu, Zn, Se, I) má různý vliv na metabolismus léčiv a příslušné enzymy (Gibson and Skett, 2001.).

Složení stravy a potravní doplňky také mohou mít vliv na aktivitu biotransformačních enzymů a tak ovlivňovat metabolismus. Je třeba mít na zřeteli, že i některé běžně užívané rostlinné drogy, ovoce, poživatiny s obsahem kofeinu nebo alkohol mohou způsobit selhání farmakoterapie až závažně poškodit zdraví pacienta. K nejdůležitějším rizikovým faktorům ve výživě a životním stylu, interagujícími s metabolismem léčiv, patří maso připravované na dřevěném uhlí, grapefruit, obsahové látky rostlin čeledi Brassicaceae, třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*), některé exotické ovoce jako pomelo, karambola, granátová jablka, dále kofein, rovněž alkohol a kouření cigaret (viz. kapitola 2.3.8.). Je známo, že maso připravované na dřevěném uhlí obsahuje látky (produkty pyrolýzy z rozkladu aminokyselin,



hlavně tryptofanu), které indukují CYP1A. Stejný isoenzym indukuje též kofein, cigaretový kouř nebo indolové látky v růžičkové kapustě či zelí. Na indukci CYP1A je nutné nahlížet z toxikologického pohledu jako na možné zvýšené nebezpečí aktivace prekancerogenních látek na karcinogenní. Grapefruitová šťáva zvyšuje biologickou dostupnost léčiv, jejichž biotransformace je závislá na izoenzymu CYP3A4. Předpokládá se, že jedna nebo více chemických látek z grapefruitové šťávy je inhibítorem CYP3A izoenzymu v GIT. Třezalka naopak CYP3A indukuje. Vzhledem k významnosti CYP3A v metabolismu léčiv, je toto třeba mít na zřeteli. (Nekvindová a Anzenbacher, 2007, Gibson and Skett, 2001).

Chronické požívání alkoholu může vést k cirhotickému vzhledu jater s velkým množstvím hepatocytů nahrazených fibrózní tkání. Než dojde k tomuto stavu, může požívání alkoholu ovlivnit metabolismus léčiv různým způsobem.

Akutní požití alkoholu → Chronické požívání alkoholu → Alkoholová cirhóza  
(bez hepatocelulárních změn)

Inhibice

Indukce

Inhibice

Akutní expozice alkoholu obecně snižuje metabolismus. Ovlivňuje 1. i 2. fázi metabolismu. K ovlivnění 1. fáze přizpívá několikerým způsobem – kompetitivně se váže na CYP2E1, inhibuje tok elektronů z reduktasy na cytochrom, ovlivňuje poměr  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  a lipidické složení buňky. Ovlivnění 2. fáze není přes inhibici enzymu, ale v případě glukuronidace etanol zvyšuje poměr  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (prostřednictvím oxidace alkoholu alkohol dehydrogenasou), čímž je inhibována produkce kofaktoru UDP-glukuronové kyseliny (potřebuje  $\text{NAD}^+$ ). Chronická alkoholová expozice (bez patologických změn) je spojena se zrychleným metabolismem – zvýšené množství CYP2E1 (isoforma též indukovaná acetonem nebo při diabetes). Při cirhotických změnách v játrech je třeba počítat se zpomaleným metabolismem (Gibson and Skett, 2001).

Složení stravy a interakce mezi léčivem a potravou může též ovlivnit absorpci a tím biologickou dostupnost léčiv.

### **2.3.6 Modulace biotransformačních enzymů (enzymová indukce a inhibice chemickými látkami)**

Závažným důsledkem podávání řady farmakologicky aktivních látek nebo kontaktu s jinými chemickými látkami může být indukce nebo inhibice biotransformačních enzymů.

Indukce znamená vzrůst aktivity biotransformačních enzymů jako odpověď na přítomnost xenobiotika. Indukovatelnost představuje strategicky významnou vlastnost prakticky všech biotransformačních enzymů, neboť je nutno indukci biotransformačních enzymů chápat jako obranný mechanismus organismu před chemickým stresem. Tento vzrůst aktivity je zapříčiněn zvýšenou genovou expresí a/nebo snížením degradace hotových enzymů (tzv. transkripční a netranskripční mechanismus indukce) (Gibson and Skett, 2001). Proces indukce trvá vždy určitou dobu. Vzestup aktivity biotransformačního enzymu díky chemické indukci může odrážet dřívější, tedy nesoučasnou, přítomnost induktoru. Velikost indukce závisí na dávce (koncentraci) induktoru a době expozice. Indukční účinek xenobiotika je druhově specifický (Boobis et al, 1990). Některé induktory zvyšují aktivitu pouze jediného enzymu (isoformy), většina však působí souběžné zvýšení aktivity několika biotransformačních enzymů, event. včetně transportních systémů. Mechanismus indukčního působení je u několika nejznámějších induktorů detailně prozkoumán, u jiných je zatím pouze jen naznačen.

Inhibice znamená snížení aktivity biotransformačních enzymů v souvislosti s působením xenobiotika, na úrovni interakce enzymu s xenobiotikem či na úrovni přepisu genetické informace. Na rozdíl od indukce se inhibice projeví velmi rychle po podání inhibitoru. Délka inhibice pak závisí na mechanismu působení inhibitoru na enzym, v některých případech také na koncentraci inhibitoru a době expozice. Řada inhibitorů může vyvolat až ireverzibilní deaktivaci enzymu. Naopak při reverzibilní inhibici dochází po eliminaci inhibitoru z organismu k obnově původní funkce enzymu (Murray, 1992). Obdobně jako u induktorů, také účinek inhibitorů je výrazně druhově specifický a může být selektivní pouze k určitému enzymu, nebo může postihovat více biotransformačních enzymů.

Modulace aktivit biotransformačních enzymů může změnit účinek a biologický poločas současně i následně podávaných léčiv. Může se tak zvýšit plazmatická hladina účinné látky/látek s rizikem jejího toxického působení nebo se může plazmatická hladina dostat pod terapeutickou mez. Modulace aktivit biotransformačních enzymů může mít za následek i zvýšené riziko nežádoucích účinků (Pelkonen et al, 1998).

V případě léčby helmintóz, zvýšená aktivita biotransformačních enzymů hostitele (např. hospodářských zvířat) může způsobit snížení plazmatické hladiny anthelmintika, což může vyústit v selhání farmakoterapie. Toto snížení plazmatické hladiny aktivní substance zvyšuje šanci parazitů přežít po podání léčiva. Navíc při kontaktu parazita s nízkou dávkou anthelmintika dojde k aktivaci obranných mechanismů parazita a následným snížením

citlivosti parazitů na podávané anthelmintikum. Takto může indukce biotransformačních enzymů hostitele přispět k rozvoji lékové rezistence.

Modulace aktivit biotransformačních enzymů může způsobit prodloužení eliminace léčiva či jeho metabolitů nebo se může změnit biotransformační cesta. U zvířat s produkty určenými pro lidský konzum je zde pak riziko reziduí v živočišných produktech. Toto je třeba brát v úvahu při stanovování ochranných lhůt.

Modulace některých biotransformačních enzymů může vést ke zvýšené citlivosti na znečištěninu životního prostředí s následným rizikem rozvoje onemocnění.

Vzhledem k výše zmíněným závažným důsledkům by u všech používaných léčiv měl být indukční resp. inhibiční účinek pozorně sledovaným parametrem. V humánní farmakologii a toxikologii se tato problematika již intenzivně studuje, ve veterinární pouze ojediněle.

### **2.3.7 Patologické stavy**

Akutní nebo chronická onemocnění, která ovlivňují buněčnou architekturu nebo funkci jater, nepochybně ovlivňují jaterní metabolismus některých léčiv. Patří mezi ně steatóza, alkoholická hepatitida, aktivní nebo inaktivní alkoholická cirhóza, hemochromatóza, chronická aktivní hepatitida, biliární cirhóza, akutní virová nebo poléková hepatitida či karcinom jater. V závislosti na závažnosti těchto onemocnění dochází k poškození jaterních enzymů metabolizujících léčiva, zvláště mikrosomálních oxidas, a tak ke značnému ovlivnění eliminace léčiv.

Onemocnění srdce může omezením průtoku krve játry zhoršit dispozici léčiv, jejichž metabolismus je závislý na průtoku. Tato léčiva se totiž velmi snadno metabolizují v játrech a jejich jaterní clearance se v podstatě rovná průtoku krve játry (Katzung, 2006). Metabolismus léčiv může ovlivnit také onemocnění plic, endokrinní poruchy (hypo- nebo hyperthyroidismus, hypofyzální nedostatečnost, nedostatečnost kůry nadledvin, nádory hypofýzy, štítné žlázy a nadledvinek, diabetes, genetické abnormality pohlavního vývoje), infekce (bakteriální a virové) a zánět (Gibson a Skett, 2001).

### **2.3.8 Životní prostředí, kouření**

Aktivita biotransformačních enzymů také může být ovlivněna indukcí nebo inhibicí jinými látkami než léčivy. Vedle účinků vlastního léčiva či interakcí s léčivy současně

podávanými jsou opomíjeny látky, které se vyskytují v životním prostředí nebo které do těla přijímáme díky zlovyku našeho životního stylu - kouření.

Je mnoho chemických látek v životním prostředí, které potenciálně mohou ovlivnit metabolismus. Jsou to například těžké kovy (Pb, Hg, Cd), technické polutanty ( TCDD, PCBs), insekticidy a herbicidy nebo výfukové plyny. Těžkým kovům jsme vystaveni v nízkých koncentracích (např. Pb z olověných potrubí na vodu, kadmium v zelenině), ale dlouhodobě a je riziko kumulace v organismu. TCDD je polycyklická sloučenina, prekurzor mnoha herbicidů. Způsobuje indukci v metabolismu polycyklických uhlovodíků, UGT, či GST, indukuje tedy 1. i 2. fázi metabolismu. PCBs jsou velkou skupinou látek, kterých se používá ve výrobních průmyslech. Jejich molekula je buď planární nebo neplanární. Planární indukují jaterní metabolismus podobně jako polycyklické uhlovodíky, neplanární vykazují indukci fenobarbitalového typu. Pesticidy různých typů jsou přítomny ve vzduchu, vodě i potravě. Mohou být jak induktory, tak inhibitory metabolismu. Pro jejich rozšíření a setrvávání v přírodě a organismech je třeba počítat s jejich potenciálním ovlivněním metabolismu u lidí i zvířat. Výfukové plyny, podobně jako tabákový kouř, obsahují tisíce různých látek včetně alkanů a cyklických uhlovodíků jako benzen, toluen, xylen stejně jako polycyklické aromatické uhlovodíky. Tudíž není překvapením, že tato směs látek ve výfukových plynech indukuje metabolismus řady xenobiotik. Inhalace výfukového plynu indukovala 30-ti násobně EROD (CYP1A1) v potkaních játrech, ledvinách a plicích (Gibson and Skett, 2001).

Cigaretový kouř obsahuje více jak 3000 chemických látek z nichž některé jsou enzymovými induktory (např. benzo[*a*]pyren) a jiné inhibitory (CO, HCN). Přesto ale indukční efekt polycyklických aromatických sloučenin převažuje (Gibson and Skett, 2001).

### **2.3.9 Hormonální změny, těhotenství**

Hormonální kontrola metabolismu je komplexní proces, do něhož jsou zapojeny hormony hypofýzy, dřeně nadledvin, ovariální, štítné žlázy a pankreatu.

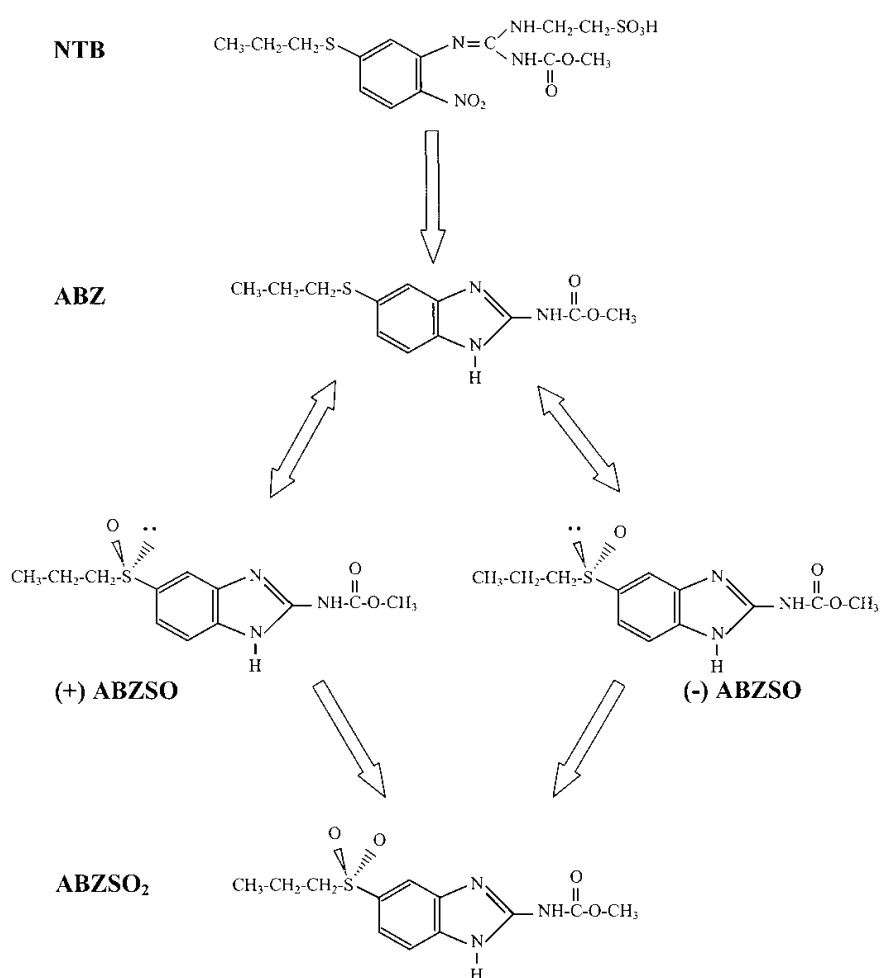
V těhotenství je hormonální rovnováha značně ovlivněná. Přestává menstruační cyklus a krevní hladiny peptidových a steroidních hormonů jsou jiné. U potkanů těhotenství způsobilo obecně snížený metabolismus xenobiotik, např 3-hydroxylaci kumarinu, ale komplexnější změny v metabolismu endogenního progesteronu (Gibson and Skett, 2001).

V průběhu těhotenství nedochází k výrazné změně ve velikosti jater ani k histologickým změnám jaterní tkáně, změny však pozorujeme v aktivitě biotransformačních

procesů CYP. Zvýšená hladina steroidních hormonů, charakteristická pro těhotenství, indukuje biotransformační procesy vázané na CYP (indukce je v blízkém vztahu k poměru estrogenů k progesteronu). Platí, že čím je látka lipofilnější, tím více je eliminační poločas v těhotenství prodloužen, a naopak, čím jsou látka hydrofilnější, tím je jejich poločas eliminace kratší. Těhotenstvím způsobené změny v aktivitě biotransformačních systémů se promítají i ve druhé fázi, pozorujeme zvýšenou UGT aktivitu (Dostálek, 2006).

## 2.4. Faktory ovlivňující metabolismus anthelmintik

Při popisu faktorů ovlivňujících metabolismus anthelmintik, jsem se zaměřila na výběr publikací souvisejících s metabolismem nejčastěji používaných anthelmintik u hospodářských zvířat, zvláště u malých přežvýkavců a skotu, případně u potkana jako často používaného laboratorního zvířete. K léčbě vnitřních parazitů se nejčastěji používají benzimidazolová anthelmintika (albendazol (ABZ), fenbendazol (FBZ), triklabendazol (TCBZ), flubendazol (FLU)) či ivermektin (IVM) ze skupiny avermektinů. Proto se právě těmito léčivými látkami zabývá i nejvíce autorů studujících faktory ovlivňující metabolismus anthelmintik.



**Obr.2** Schematický průběh metabolismu netobiminu (NTB), ABZ a albendazolsulfoxidu (ABZSO) (převzato z Capace et al, 2001). Pokud je podán NTB, jako lépe rozpustné pro léčivo ABZ, k cyklizaci dojde působením GI mikroflóry, ABZ je dále pomocí FMO a CYP3A sulfoxidován na ABZSO, který je v konečném kroku 1. fáze oxidován na albendazolsulfon (ABZSO<sub>2</sub>) katalýzou CYP1A.

Aktivitu biotransformačních enzymů lze sledovat inkubacemi subcelulárních frakcí *in vitro* se specifickými substráty enzymů nebo inkubacemi přímo s danými léčivy, jejichž metabolismus je studován. Lze též zjišťovat, zda látka podaná živému zvířeti ovlivní *in vitro* metabolismus nebo sledovat farmakokinetiku podaného léčiva *in vivo*. U parazitických červů se zjišťuje metabolismus látek v parazitech kultivovaných *ex vivo* v kultivačním mediu nebo po přípravě „subcelulárních frakcí“ z homogenátu jejich těl.

Porovnání hodnot enzymových aktivit nebo metabolismu léčiv naměřených různými laboratořemi je problematické z hlediska 1) různých plemen, věku, pohlaví, kastrace, složení stravy atd. experimentálních zvířat 2) metod použitých pro přípravu biologických vzorků 3) použitých analytických metod. Proto porovnávání výsledků pocházejících z různých laboratoří může vést ke klamným závěrům.

#### **2.4.1 Mezidruhové rozdíly v biotransformačních enzimech a metabolismu anthelmintik**

Metabolismus anthelmintik lze rozdělit do dvou velkých skupin – metabolismus u hostitelů helmintů a metabolismus u vlastních helmintů. Obě tyto skupiny jsou obrovské, ať počet druhů zvířat léčených anthelmintiky tak i počet druhů helmintů. Každý druh má pak svůj specifický enzymový aparát a tím i metabolismus léčiv. Obecně platí, že čím jsou druhy evolučně vzdálenější, tím více mají odlišný metabolismus cizorodých látek. Proto také metabolismus anthelmintik je značně odlišný u helmintů a u jejich hostitelů. Biotransformačními enzymy a metabolismem anthelmintik u helmintů se zabýval Mgr. Viktor Cvilink, PhD. ve své disertační práci a poznatky v této oblasti shrnuje přehledný článek (Cvilink et al, 2009). Ve své disertační práci jsem se zaměřila na metabolismus anthelmintik u hostitelů helmintů, tedy hlavně u hospodářských zvířat. I u příbuzných druhů zvířat, kde existují shodné rysy v anatomii a fyziologii, a kde lze podobný metabolismus léčiv předpokládat, se ne vždy předpoklad shoduje s realitou. Je tedy nutné metabolismus každého species sledovat samostatně. Rozdíly v metabolismu mohou být jak kvalitativní (rozdílné metabolické cesty), tak kvantitativní (např. rozdílné množství jednotlivých metabolitů či rozdílný poměr enantiomerů tvořených z prochirálního léčiva).

Mezidruhové porovnání bazální aktivity vybraných biotransformačních enzymů *in vitro* u samců divokých druhů přežvýkavých zvířat (jelen, srnec, daněk a muflon) provedli Machala et al (2003). Byly měřeny aktivity CYP 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 3A, 4A vůči relativně specifickým substrátům a daný protein byl prokazován western blottingem. Vysokou

aktivitu CYP1A vykazovaly mikrosomy daňka a srnce, naopak nízkou jaterní mikrosomy z muflona. Vyšší aktivita CYP3A byla u muflonů a daňků, CYP4A u srnců a muflonů. Dále u muflonů byly nejvyšší aktivity CYP3A, 2C, 2D a 2E což naznačuje, že muflon má nejvyšší biotransformační potenciál z těchto studovaných druhů.

Szotáková et al. (2004) porovnávali *in vitro* aktivity některých oxidačních, redukčních a konjugačních biotransformačních enzymů mezi prasaty, skotem, kozami a ovce. Šlo o jedince stejného stáří, zdravé, nekastrované samce. V mikrosomech skotu byla pozorována velmi vysoká EROD aktivita (odpovídající CYP1A) 5-10 x převažující ostatní, v ovčích mikrosomech byla naopak vysoká aktivita MFCD (CYP2C9) a 12-LOH (CYP4A). U prasat a ovčí pak byla nalezena vyšší aktivita 6 $\beta$ -TOH (CYP3A). Všechny druhy měly relativně vysoké aktivity reductas karbonylové skupiny. Aktivity konjugačních enzymů (UGT a GST) byly nejvyšší u ovčí.

Aktivitu biotransformačních hydrolytických a konjugačních enzymů porovnávali u skotu, jelenů a potkanů Sivapathasundaram et al (2003). Jaterní mikrosomální epoxid hydrolasa (specifický substrát benzo[*a*]pyren 4,5-oxid) byla u skotu a jelenů asi dvakrát vyšší než u potkanů. Naopak cytosolická GST (specifický substrát DCNB) byla u hospodářských zvířat nižší a zároveň byla nižší i glutathionreductasa a celkové množství glutathionu. Cytosolická sulfotransferasa (specifický substrát 2-naftol) byla vyšší u skotu v porovnání s potkanem. Aktivita UGT (specifický substrát 1-naftol) se nelišila mezi zkoumanými druhy.

Rozdíly v plazmatické biodostupnosti ABZSO, jako anthelminticky účinného metabolitu ABZ, mezi skotem a ovce byl popsán jak u podání proléčiva netobiminu (NTB) (Lanusse et al, 1993), tak po podání samotného ABZ (Delatour et al, 1990). Biodostupnost byla významně vyšší, biologický poločas a MRT významně delší u ovčí oproti skotu. Tyto rozdíly byly původně přisuzovány rozdílnému jaternímu metabolismu u obou species, kde se vyšší oxidační kapacita předpokládala u skotu. Ale nepublikovaná data Lanusseho et al (Lanusse et al, 1992) ukazují, že sulfoxidace ABZ byla rychlejší u ovčí, sulfonace se mezi těmito species nelišila. Lanusse a Prichard (1990) dokumentovali dlouhý eliminační poločas a delší setrvávání ABZSO v plazmě ovčí (po 100 hod po podání) než u skotu, kde byl ABZSO z plazmy eliminován během 30 – 36 hod po podání (Lanusse et al, 1991).

*In vitro* porovnání schopnosti jaterních mikrosomů ovčí a skotu oxidovat ABZ provedli Lanusse et al (1993). Ani proléčivo nNTB ani ABZSO<sub>2</sub> nebyly mikrosomy ovčí ani skotu biotransformovány. Toto naznačuje, že redukce a cyklizace NTB v ABZ po perorálním (p.o.) i po parenterálním podání je úlohou GI mikroflóry. Oxidace ABZ, methimazolu (MTZ) a thiourey jaterními mikrosomy ovčí spotřebovala významně více NADPH než stejná reakce



s mikrosomy skotu. To odpovídá rychlejší tvorbě ABZSO u ovčích mikrosomů oproti mikrosomům skotu. Tyto výsledky naznačují, že ovce mají vyšší potenciál oxidovat ABZ na ABZSO. Toto ale odporuje některým farmakokinetickým výsledkům provedených na těchto dvou species. Zdánlivá neshoda může být zapříčiněna rozdílným GI metabolismem benzimidazolů. ABZSO se koncentruje v GIT iont-trappingem díky pH gradientu plazma/GIT tekutina. Takto může být ABZSO zdrojem ABZ v GIT a může být zodpovědný za prodloužené setrvávání ABZSO v plazmě ovcí (100hod po podání NTB), zatímco v skotu je během 30-36 hod z plazmy odstraněn. Nižší redukční a vyšší oxidační kapacita GI mikroflóry skotu má za následek vyšší plazmatický poměr  $ABZSO_2/ABZSO$  pozorovaný u skotu oproti ovcím po podání NTB nebo ABZ (Lanusse et al, 1992). Zároveň Lanusse et al (1993) zkoušeli vliv antityroidální látky MTZ jako potenciálního inhibitoru ABZ sulfoxidace. Tyto *in vitro* výsledky se shodují s *in vivo* výsledky Lanusseho a Pricharda (1992). AUC, eliminační poločas a MRT ABZSO byly mnohonásobně vyšší u podání NTB v kombinaci s MTZ oproti podání samotného NTB u ovcí v porovnání se skotem.

Mezidruhové porovnání v *in vitro* metabolismu ABZ u jelena, skotu, ovcí a prasat (včetně jejich divokých příbuzných) bylo provedeno dříve na našem pracovišti (Velík et al, 2005). ABZ byl rychle metabolizován na ABZSO a ABZSO pomalu na  $ABZSO_2$  ve všech zkoumaných druzích zvířat. Poměr (+)/(-)-ABZSO byl větší než 1 u domácích zvířat, muflona a divokého prasete, menší než 1 naopak u jelenů, daňků a srnců. Celková sulfoxidace ABZ byla oproti ostatním druhům pomalejší u jelenovitých. Nekastrovaní domácí berani a mufloní berani měli nižší sulfoxidační aktivitu než skopci. Žádný rozdíl v tvorbě ABZSO nebyl zaznamenán mezi berany a mufloními berany, ale sulfonace probíhala rychleji u muflonů než u beranů a skopců. Sulfonace byly dvakrát rychlejší u býků oproti všem dalším druhům (Velík et al, 2005).

Mezidruhový je i rozdíl přítomnosti ABZ v plazmě po podání NTB ovcím (Cristofol et al, 1997a) a potkanům (Cristofol et al, 1997b). U ovcí detekován nebyl, u potkanů asi do 6. hod po podání, což naznačuje, že jaterní metabolismus ABZ je u monogastrických zvířat pomalejší než u polygastrů. Také v plazmě kuřat byl ABZ po podání této substance detekován (Csikó et al, 1996). Při studiu farmakokinetiky NTB a jeho metabolitů *in vivo* u koní byla zjištěna vysoká hladina ABZSO oproti  $ABZSO_2$ , což ukazuje na relativně pomalou oxidaci ABZSO na  $ABZSO_2$  (Gokbulut et al, 2009c). Naopak při studiu farmakokinetiky u koní licencovaných anthelmintik (FBZ, oxfendazolu (OFZ) a oxibendazolu (OXB)) bylo zjištěno, že plazmatická koncentrace účinných sulfoxidových metabolitů byla relativně nízká, byly rychle metabolizovány na neúčinné metabolity, které v plazmě převažovaly (McKellar et al,

2002, Gokbulut et al, 2002). Tyto rozdíly mohou způsobovat rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti absorpční schopnost jednotlivých léčiv z GIT koní.

Lanusse et al (1992) porovnávali metabolismus ABZ, ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> ruminální, abomasální a ileální tekutinou ovcí a skotu. Žádnou z těchto látek nemetabolizovala abomasální tekutina. Ruminální a ileální tekutina významnou měrou metabolizovaly ABZ a ABZSO jak u ovcí tak u skotu, naopak ABZSO<sub>2</sub> neovlivnily. Oxidace ABZ na ABZSO probíhala rychleji při inkubacích ruminální a ileální tekutiny skotu oproti ovcím. Redukce ABZSO na ABZ naopak probíhala rychleji u ovcí než u skotu. Takže oxidační aktivita obou tekutin byla větší u skotu a redukční u ovcí.

Enantioselektivita v metabolismu je známkou rozdílného množství nebo aktivity biotransformačních enzymů zapojených do metabolismu jednotlivých látek u různých species. Delatour et al (1991) porovnávali rozdíly v enantioselektivitě ABZSO po podání ABZ ovcím, kozám a skotu. Plazmatický profil metabolitů se poměrně významně lišil u jednotlivých druhů. AUC ABZSO bylo 7.5, 5.8 a 1.3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$  a ABZSO<sub>2</sub> 2.3, 3.3 a 2.4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$  v pořadí ovce, kozy, skot. Poměr AUC ABZSO/ABZSO<sub>2</sub> byl tedy 3.2 u ovcí, 1.8 u koz a 0.6 u skotu. Nejkratší eliminační poločas obou metabolitů byl u skotu, nejdelší u ovcí. Poměr koncentrací (+)ABZSO/(-)ABZSO na počátku sledování byl 75:25 = 3 u ovcí, 60:40 = 1.5 u koz a 80:20 = 4 u skotu, celkový poměr AUC (+)ABZSO/(-)ABZSO v procentuálním vyjádření byl 86:14 u ovcí, 80:20 u koz a 91:9 u skotu. Poměr (+)-ABZSO/(-)-ABZSO byl v rozmezí 2.8-3.8 po inkubaci mufloních hepatocytů s ABZ, potkaní hepatocyty tvořily stejný poměr enantiomerů (1.0-1.1) (Velík et al, 2003), při inkubacích ovčích jaterních mikrosomů s ABZ byl poměr sulfoxidů 4.11, zatímco u skotu 2.63 (Virkel et al, 2004). Při *in vitro* inkubacích ruminální tekutiny ovcí a skotu Virkel et al (2002) zjistili, že koncentrace ABZ je po inkubaci s (+)-ABZSO o 55-158 % vyšší než při inkubacích s (-)-ABZSO u skotu, u ovcí byla tato koncentrace vyšší 1.3 – 3.0 krát. Rychlost tvorby ABZ z obou enantiomerů ABZSO byla signifikantně vyšší při inkubaci ruminální tekutiny ovcí než skotu. Při inkubacích enantiomerů OFZ s ruminální tekutinou obou druhů byl pozorován podobný průběh jako u enantiomerů ABZSO. Též byla pozorována obousměrná chirální konverze – v inkubačním médiu s (+) enantiomerem byl detekován (-) antipod a opačně (Virkel et al, 2002).

Značné mezidruhové rozdíly byly popsány u FBZ. Oxidace FBZ proběhla u oslů, koní, ovcí, prasat, skotu, koz či králíků k metabolitu FBZSO<sub>2</sub>, zatímco u psů nebyl FBZSO<sub>2</sub> detekován. Koně metabolizovali FBZ a OFZ mnohem rychleji než přežvýkavci, s čímž souvisela i nižší biologická dostupnost a kratší setrvávání ( Capace et al, 2009).

Rozdíly ve farmakokinetice a biologické dostupnosti po subkutánním podání (s.c.) IVM byly pozorovány i mezi dvěma plemeny skotu. Rozdíl však asi není dán rozdílnou rychlostí metabolismu, protože IVM je převážně vylučován nezměněný stolicí (Vercruyse et al, 2008). Farmakokinetiku IVM (s.c. 0.2 mg/kg) mezi dvěma plemeny koz porovnávali Gokbulut et al, 2009a). Přestože u  $C_{max}$  a  $T_{max}$  nebyl signifikantní rozdíl mezi plemeny, AUC, MRT a čas poslední detekovatelné plazmatické koncentrace byly rozdílné. Vnitrodruhově mezi jednotlivými plemeny skotu byl též pozorován rozdíl ve farmakokinetice moxidektinu aplikovaném jako přípravek pour-on. U jednoho plemena byla signifikantně vyšší AUC a  $C_{max}$  (Sallovitz et al, 2002).

Rozdíly v biologické dostupnosti anthelmintik mezi různými druhy či jen plemeny téhož druhu mohou způsobit předávkování či poddávkování léčených zvířat. Proto je nezbytné znát detailní farmakokinetiku včetně metabolismu každého anthelmintika u každého cílového species.

#### **2.4.2 Rozdílnost v metabolismu a farmakokinetice anthelmintik u samců a samic**

Metabolické dráhy léčiv jsou pod hormonální kontrolou, proto lze obecně předpokládat rozdíly v metabolismu anthelmintik u samců a samic. Pokud pohlavní hormony ovlivní metabolismus léčiv u zvířat s produkty pro lidský konzum, je třeba brát v úvahu to, že reziduální hladina léčiv či jejich metabolitů se může pohlavně lišit nebo může být ovlivněna podáváním anabolických hormonů (Witkamp et al, 1991).

Pohlavní rozdíly ve farmakokinetice ABZ pozorovali Cristofol et al (1998). Po p.o. podání 20mg/kg NTB ovcím a beranům byl významně delší eliminační poločas a MRT ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> u ovcí. Plazmatická koncentrace vyjádřená jako  $C_{max}$  a AUC metabolitů NTB byla přibližně 3x (berani) a 6x (ovce) vyšší u ABZSO než u ABZSO<sub>2</sub>. Ovce tvořily přibližně 2x méně ABZSO<sub>2</sub> než berani. Ovce významně více vázaly ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> na plazmatické proteiny (albumin a globuliny). Vyšší oxidační schopnost byla u beranů.

Zajímavé je též srovnání farmakokinetiky enantiomerů ABZSO u ovcí a beranů. Capace et al (2000) zjistili, že 30 min po podání 7,5 mg/kg racemického ABZSO ovcím a beranům byl poměr (+) a (-) enantiomeru v plazmě přibližně stejný, ale s časem pak přibývá (+)-ABZSO a ubývá (-)-ABZSO až do 60. hod po podání. Vysvětlují to enantioselektivní eliminací, specificitou a přednostním výběrem cytochromů P450 k (-)-ABZSO a jeho metabolizaci na ABZSO<sub>2</sub>. Z tohoto též usuzují, že anthelmintický účinněk nese (+)-

ABZSO. U obou pohlaví zaznamenali podobný kinetický profil jen s tím rozdílem, že berani absorbovali (-)-ABZSO o něco rychleji než ovce (kratší  $T_{max}$ ).

Při podání 10 mg/kg ABZ kozám nebyly zaznamenány rozdíly mezi pohlavími jiné než v  $T_{max}$  u dospělých jedinců. Samice měly kratší  $T_{max}$  (+)-ABZSO oproti samcům (Capace et al, 2009). V tomto experimentu byla zaznamenána vyšší koncentrace (-)-ABZSO v úvodní fázi po podání, hodinu po podání začal v plazmě dominovat (+)-ABZSO. Zřejmě došlo k rychlé přeměně (-)-ABZSO na ABZSO<sub>2</sub>.

Ndong et al (2007) zjišťovali vliv pohlaví na farmakokinetiku IVM po jednotlivé subkutánní aplikaci 0.2 mg/kg senegalským ovcím. AUC byla signifikantně vyšší u samic, ostatní parametry ( $C_{max}$ , MRT,  $T_{1/2}$ ) nedosáhly signifikantní rozdílnosti, přesto byly vyšší u samic. Tato pohlavní rozdílnost může být způsobena rozdílnou zásobou tukové tkáně, kde se může léčivo rozpustné v tucích kumulovat a působit jako rezervoár. Přes zmíněnou rozdílnost dávka 0.2 mg/kg s.c. měla stejné endektocidní účinnost u obou pohlaví. U koz po podání 0.5 mg/kg IVM pour-on byla poslední detekovatelná plazmatická hladina léčiva zaznamenána mnohem později u samců (16.17 dní) oproti samicím (10.67 dní).  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  a AUC bylo u obou pohlaví bez signifikantních rozdílů. Ukazuje to na pomalejší exkreční schopnost samců (Gokbulut et al, 2009b).

Toutain et al (1997) porovnávali plazmatický profil po podání 200 µg/kg doramektinu a IVM s.c. skotu. AUC byla asi o 10 % vyšší u krav oproti býkům u obou léčiv. Absorpční poločas byl rychlejší u býků, eliminační poločas nebyl pohlavím ovlivněn. Biologická dostupnost doramektinu i IVM byla u krav o 10 % vyšší než u býků.

Účinnost terapie fasciolózy triklabendazolem (TCBZ) či kombinací klorsulonem s IVM byla porovnávána u samců a samic potkana (Sibille et al, 2000). Zjistilo se, že léčba TCBZ účinkovala na obě pohlaví, pokud byla podána 4 týdny po infekci, ale kombinace klorsulonem s IVM účinkovala pouze málo u samců (54%) a vůbec u samic. Při podání léčiv 8 týdnů postinfekčně kombinace fungovala výborně na samce (100%), ale jenom z 53% na samice potkanů. Tyto nečekané výsledky autoři zdůvodňují zvýšenou expresí CYP3A samic léčených klorsulonem a IVM.

Decasto et al (2005) porovnávali expresi CYP3A podle pohlaví a plemene (Limousin a Piedmontese) skotu. U Piedmontese plemene zjistili významně vyšší aktivitu CYP3A aktivitu u býků než u krav, ale žádný rozdíl u plemene Limousin. Bez rozdílu mezi pohlavími na Limousin plemenu bylo i zjištění Dupuyho et al (1999) na *in vitro* metabolismu IVM (léčivo částečně metabolizované CYP3A).

Na rozdíl od farmakokinetických výsledků, *in vitro* studie neukázala statistickou významnost v metabolismu IVM v mikrosomech z jater krav a býků (Dupuy et al, 1999). Tato studie ukazuje a vyslovuje názor, že je nepravděpodobná hypotéza o pohlavní rozdílnosti v metabolismu endektocid u veterinárních druhů. Farmakokinetické rozdíly mezi pohlavími jsou spíše způsobeny rozdílnou distribucí než metabolismem léčiv. Makrocyclické laktony mají velký distribuční objem a relativně dlouhé setrvávání díky jejich vysoké koncentraci v tucích a dlouhému vyplavování z těchto tkání. Farmakokinetika a aktivita avermektinů a milbemicinů je významně ovlivněna lipofilitou aktivní molekuly (Dupuy et al, 1999).

### 2.4.3 Rozdíly ve farmakokinetice anthelmintik v závislosti na věku zvířat

Z problémů, které parazitózy zvířatům způsobují (poškození cílového orgánu parazita s jeho negativními důsledky), vyplývá nutnost parazitózám předcházet, pokud je to možné, nebo je léčit a to nejen u dospělých zvířat, ale už u mláďat. Ta se s infekčními stádii parazitů setkávají záhy po svém narození na pastvě nebo ve stáji a jsou k nim velmi vnímavá. Na věku závisí schopnost absorpce, tkáňové distribuce či metabolismus léčiv. Například níže citovaní autoři zjistili rozdíly ve farmakokinetice NTB u jedno- a osmiměsíčních ovcí. Mezi mladými a dospělými přežvýkavci jsou anatomické rozdíly ve stavbě trávicí soustavy. Nefunkčnost předžaludků u mláďat snižuje absorpci málo rozpustných léčiv jako např. benzimidazolů. Přestože je faktor věku pro farmakoterapii tolik významný, pouze málo prací se problematikou věkového porovnání v používání anthelmintik u hospodářských zvířat věnovalo.

McKellar et al (1995) porovnávali farmakokinetiku metabolitů po podání NTB, ABZ nebo ABZSO 5 mg/kg jedno- a osmiměsíčním ovcím. Biologická dostupnost se nelišila s věkem u ABZ a ABZSO, ale byla signifikantně nižší po podání NTB jednoměsíčním jehňatům, což je zřejmě zapříčiněno odlišným metabolismem proléčiva v bachoru. Stejní autoři (1993) zjišťovali plazmatický profil NTB, ABZ a metabolitů u tříměsíčních a devítiměsíčních ovcí. Nezaznamenali žádnou významnou odlišnost ve farmakokinetice závislou na věku zvířat.

U koz v závislosti na věku (2 a 14 měsíců) porovnávali farmakokinetiku ABZ 10 mg/kg Capace et al (2009). U všech skupin zvířat převažoval (+)-ABZSO, ABZ nebyl detekován. Hodnoty  $C_{max}$  a AUC pro oba enantiomery byly vyšší u dospělých. Maximální koncentrace byly u mladých dosaženy dříve, zároveň u nich byl kratší MRT všech metabolitů.

#### 2.4.4 Vliv stravy na farmakokinetiku anthelmintik

Četné faktory vztahující se k hostiteli, včetně komponent stravy, mohou ovlivnit GI absorpci enterálně podaných léčiv. Navíc fyzikálně chemické interakce, rozpustnost a pH prostředí v bachoru mají vliv na rozdílnou absorpci. Benzimidazoly ( ABZ, FEN, OFZ) jsou pro svoji nízkou rozpustnost ve vodě limitovány na orálně či intraruminálně podávané suspenze. Rozpustnost částic v GI tekutině pak ovlivňuje rychlost a rozsah absorpce a celkovou biologickou dostupnost benzimidazolových léčiv u přežvýkavců. Například časově omezená redukce příjmu potravy prodloužila čas disoluce a tím se zvýšila plazmatická dostupnost a anthelmintická účinnost OFZ u ovcí (Alí a Hennessy, (1993, 1995a, 1995b). Obdobně hladověním zpomalený GI průchod zvýšil plazmatickou a abomasální dostupnost ABZ u krav (Sánchez et al, 1997). Navíc rozdílný typ krmiva může ovlivnit ruminální pH a modifikovat mikroflórou zprostředkovanou metabolickou sulforedukci některých benzimidazolů (Virkel et al, 1997). Charakterizace kinetického a metabolického chování a výsledná účinnost antiparazitických léčiv při různých podmínkách chovu mohou hrát významnou roli při zvýšení parazitické kontroly v chovu.

Vliv hladovění před podáním ABZ (i.r. a i.v.) a před a po podání ABZ (10 mg/kg) skotu porovnávali Sánchez et al (1997, 2000). Hladovění před i.v. podáním nemělo žádný vliv, ale hladovění skotu před i.r. podáním vliv mělo. Biologická dostupnost ABZ a ABZSO byla u hladovějících (před i po podání) významně vyšší. Obdobně Lifschitz et al (1996) zkoumali vliv 24 hod hladovění před podáním ABZ 7,5mg/kg na farmakokinetiku parentní látky a metabolitů u ovcí. Výrazně vyšší absorpce s vyššími  $C_{max}$  a AUC hodnotami, delší plazmatický poločas a MRT byla pozorována u hladovějících zvířat. Bioekvivalenční porovnání ukázalo, že léčba 7,5 mg/kg u hladovějících ovcí odpovídalo o 50% vyšší dávce (11,3 mg/kg) u ovcí krmených *ad libitum*. Rychlost průchodu GI traktem je u hladovějících zvířat podstatně nižší, proto zde setrvá léčivo delší dobu a má delší čas k rozpuštění a vstřebání.

Alí a Hennessy (1995a, 1995b) zjišťovali vliv dočasného omezení množství krmiva na biologickou dostupnost i.r. podaného OFZ a jeho účinnost proti *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus columbriformis* u ovcí. Snížení dávky krmiva z 800g/den na 400g/den zpomalilo pasáž tráveniny GI traktem což vedlo k prodloužení času, kdy léčivo setrvávalo v GIT a mohlo se vstřebat. Významná je redukce částečně benzimidazolrezistentních kmenů *T. columbriformis* o 60% a *H. contortus* o 94% v případě redukovaného příjmu potravy oproti 19% a 60% redukci u zvířat s vysokým příjmem potravy. Stejní autoři (1996,1997) provedli

podobné porovnání vlivu nižšího množství krmiva v období medikace i s dalšími anthelmintiky – IVM a klosantemem. Vliv zpomaleného průchodu tráveniny na množství absorbovaného léčiva byl podobný (vyšší  $C_{max}$  a AUC v plazmě u skupiny s redukováným příjmem). Anthelmintická účinnost IVM u skupiny ovcí s redukováným příjmem krmení byla 97% na *Haemonchus contortus* v porovnání s 53% účinností u skupiny s vysokým příjmem.

Vliv typu krmiva (obilí jako koncentrovaná strava, čerstvá pícnina) porovnávali Sánchez et al (1999) na biologické dostupnosti ABZ u telat, Taylor et al (1992, 1993) na dostupnosti FBZ, IVM, rafoxanidu a TCBZ u jehňat a telat, Gokbulut et al (2007) na farmakokinetickém profilu TCBZ či Knox a Steel (1997) na plazmatické profilu FBZ a jeho metabolitů u skotu. Parametry  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC a MRT byli u ustájených zvířat významně vyšší než u zvířat na pastvě. Pasoucí se zvířata mají rychlejší pasáž GI traktem, rozdíly v plazmatických koncentracích jsou tedy způsobeny omezenou absorpcí u pasoucích se zvířat. Rozpustnost ABZ byla významně vyšší v pH 1,75 odpovídající abomasální tekutině zvířat krmených koncentrovanou stravou než v pH 2,0 odpovídající žaludeční tekutině zvířat z pastvy (Sánchez et al, 1999). ABZ je ve vodě špatně rozpustné léčivo, ale jeho rozpustnost se podstatně zvýší při nízkém pH. Složení stravy může ovlivnit pH žaludečního obsahu. Doba setrvávání suspenze ABZ v kyselém pH žaludku může ovlivnit absorpci léčiv z tenkého střeva. Toto může ovlivnit farmakokinetické rozdíly pozorované u zvířat s rozdílným typem krmiva (Alvarez et al, 1996).

Typ stravy určuje složení a rozložení mikrobiální populace v batoru. I toto se tak může podílet na celkovém metabolismu podávaných léčiv. Účinnější nitroredukce proléčiva NTB a sulforedukce ABZSO ruminální tekutinou ovcí krmených koncentrovanou stravou oproti ovcím krmených senem zaznamenali Virkel et al (1999). *In vitro* pokusy s ruminální tekutinou ukázaly, že právě mikroflóra batoru metabolizuje NTB na ABZ a jeho sulfoxid, a naopak ABZSO na ABZ, protože žádná metabolická aktivita nebyla pozorována u povařených vzorků ruminální tekutiny.

Alvarez et al (1996) porovnávali vliv typu krmení na farmakokinetiku perorálně podaného ABZ 10 mg/kg u prasat. Významně vyšší hodnota  $C_{max}$  a AUC byly pozorovány pro anthelminticky aktivní metabolit ABZSO i ABZSO<sub>2</sub> u prasat na pastvě než u prasat krmených koncentrovanou proteinovou stravou. S tím souvisí i delší eliminační poločas a MRT obou metabolitů u této skupiny. Tato pozorování vyšších hladin metabolitů ABZ v plazmě u prasat na pastvě oproti prasatům krmeným obilím či syrovátkou se neshodují s výsledky získanými při studiu přežvýkavců (Sánchez et al, 1999)

## 2.4.5 Vliv medikace na metabolismus a farmakokinetiku anthelmintik

Z publikovaných výsledků jednoznačně vyplývá, že řada benzimidazolových léčiv má schopnost významně modulovat některé isoformy CYP u laboratorních zvířat, v buněčných liniích i u člověka. Omezené jsou však současné znalosti o modulačním účinku benzimidazolových anthelmintik na CYP a další biotransformační enzymy u hospodářských zvířat. Míru a směr modulace nelze vzhledem k obrovským mezidruhovým rozdílům v odezvě na přítomnost induktoru či inhibitoru jednoznačně odhadnout a extrapolovat tak data mezi odlišnými species. Je tedy třeba dalších experimentů k obsáhnutí všech druhů i hospodářských zvířat, u kterých se benzimidazolová anthelmintika používají a dle výsledků zrevidovat vhodnost léčby.

Velík et al (2004a) shrnují informace o modulačním působení různých benzimidazolových léčiv na biotransformační enzymy. Biotransformace ABZ byla studována na potkanech, myších, králících, drůbeži, ovcích, kozách, skotu, prasatech, psech, kuřatech a člověku. ABZ, jako sulfidový typ anthelmintika, je v oxidován na sulfoxid (katalýzou CYP3A4 a FMO) a dále na sulfon (katalýzou CYP1A). Bylo zjištěno, že když je mukózní CYP3A4 inhibován (cimetidinem, grapefruitovou šťávou) je biologická dostupnost a plazmatický profil metabolitů ABZ nižší. Indukční působení ABZ bylo poprvé popsáno na konci 80.tých let minulého století, kdy zvýšená katalytická aktivita a množství proteinu bylo pozorováno u potkanů. Později také v lidských mikrosomech a buněčných kulturách HepG2 i u dalších živočišných druhů (např. muflona (Velík et al, 2004b, Lamka et al, 2007)). Indukční efekt na CYP1A1 má ABZ a ABZSO, nikoli ABZSO<sub>2</sub>, přičemž indukční efekt ABZSO je výraznější než parentní látky. FEN je strukturně blízkým příbuzným ABZ. Jeho monooxidovaný metabolit se nazývá OFZ. FEN je schopen kompetitivně inhibovat sulfoxidaci ABZ. Jeho indukční působení na CYP1A1 bylo prokázáno u králíka *in vivo*, v primárních kulturách králíčních či prasečích hepatocytů (Baliharová et al, 2004) či v HepG2 buňkách. Naopak bez modulačního efektu na biotransformační enzymy se ukázal u potkanů, myši a kuřat. TCBZ indukoval CYP1A1 v primární kultuře potkaních a králíčních hepatocytů, potkaních buněčných kulturách H4IIE a lidských jaterních HepG2 buňkách. TBZO je používán nejen jako anthelmintikum, ale jeho fungicidní účinky jsou hojně využívány k ošetření zeleniny. Existuje tedy i riziko nežádoucí expozice lidí či zvířat TBZO. Mebendazol (MBZ) indukoval CYP1A v kulturách potkaních hepatocytů a v HepG2 buňkách (Baliharová et al, 2003), naopak inhiboval CYP3A v kulturách prasečích hepatocytů



(Baliharová et al, 2004). Přestože se FLU od MBZ liší jen přítomností atomu fluoru, byl FLU popsán jako inhibitor oxidačních enzymů u potkanů *in vivo* (převzato z Velík et al, 2004).

Také jednotlivá p.o. dávka 0.5 mg/kg IVM muflonům zvýšila jaterní EROD, MROD, PROD, BROD, 6 $\beta$ - a 16 $\alpha$ -TOH, takže je zřejmé, že CYP1A1, 1A2, 2B a 3A, které jsou za tyto monoxygenasové aktivity odpovědné, jsou IVM indukovány. U daňků měla CYP-dependentní dealkylasová aktivita obecně vyšší hodnoty než u muflonů, ale indukovatelnost IVM nebyla zaznamenána (Skálová et al, 2001).

Jednorázové a opakované (2 dávky po 14ti dnech, 800 mg) podání ABZ člověku autoindukovalo jaterní biotransformační enzymy. Hodnoty  $C_{max}$  a  $T_{max}$  sice nebyly u obou hlavních metabolitů (ABZSO a ABZSO<sub>2</sub>) změněné, ale AUC po prvním podání bylo mnohem vyšší než po druhém a naopak clearance látek byla rychlejší po opakovaném podání. Tento efekt nižších plazmatických koncentrací po opakovaném podání ABZ může mít negativní efekt na farmakoterapii ( Mirfazaeliana et al, 2003).

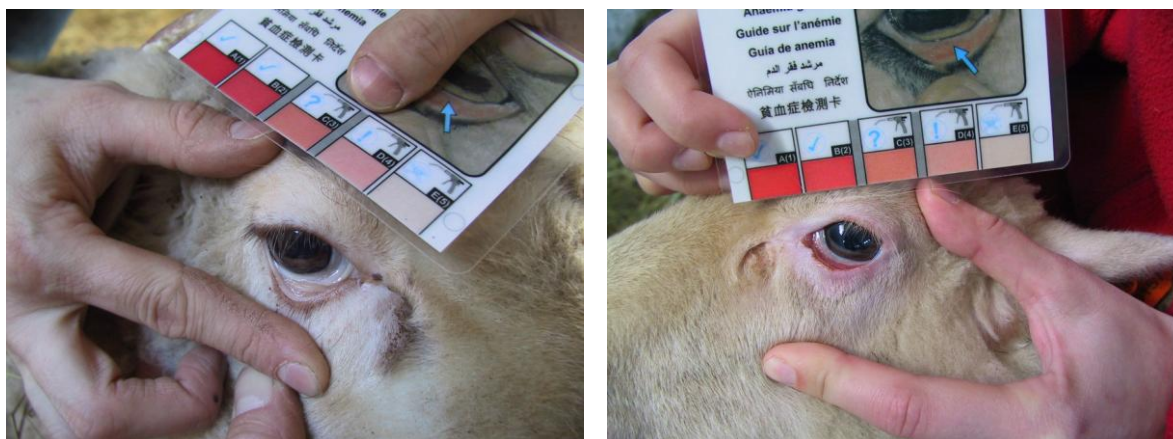
Výhodnost ko-medikace ovcí dvěma anthelmintiky (IVM a TCBZ) porovnávali Lifschitz et al (2008). Eliminace IVM byla pomalejší a plazmatická dostupnost 3x vyšší při kombinaci s TCBZ než při podání samotného IVM. Obdobně plazmatická koncentrace TCBZ a jeho metabolitů při kombinaci s IVM dosáhla vyšší  $C_{max}$  oproti TCBZ samostatně podanému. Obdobné výsledky získali i Alvarez et al (2008) při testování kombinace IVM a ABZ u kmenů ch parazitů rezistentních na obě anthelmintika či Merino et al (2003). Při kombinaci anthelmintika moxidektinu s IVM nebo s quercetinem v kultuře potkaních hepatocytů bylo dosaženo vyššího množství moxidektinu v kultuře. *In vivo* pouze quercetin ovlivnil farmakokinetiku moxidektinu v plazmě jehňat - zvýšil AUC (Dupuy et al, 2003). Kombinace IVM s antifungální látkou ketokonazolem zvýšila plazmatickou koncentraci IVM u ovcí (Alvinerie et al, 2008). Virkel et al (2009) zjišťovali ovlivnění farmakokinetiky TCBZ cíleně inhibitory enzymů metabolizujících toho anthelmintikum - FMO a CYP u ovcí. MTZ, jako inhibitor FMO, kinetiku neovlivnil. Piperonyl butoxid a ketokonazol, jako inhibitory CYP, zapříčinily signifikantně vyšší  $C_{max}$  a AUC TCBZ-sulfoxidu. Inhibice CYP zprostředkované oxidace v játrech způsobila zvýšenou systémovou dostupnost aktivního metabolitu TCBZ-sulfoxidu.

Indukce či inhibice některého enzymového systému léčivy má své farmakologické a toxikologické důsledky. Pokud léčivo indukuje své vlastní biotransformační enzymy, či jiné, dříve podané, léčivo indukuje biotransformační enzymy zodpovědné za metabolismus anthelmintik, dochází k jeho rychlejšímu odbourání, kratšímu působení a nižší tkáňové koncentraci, což může mít za následek selhání terapie parazitózy. Parazité vystavení

subterapeutickým dávkám anthelmintik se mohou stát rezistentními na danou léčbu. Inhibice biotransformačních enzymů může naopak způsobit předávkování léčiva inhibicí vyvolávajícího či jiného současně podaného. Zmíněná CYP1A indukce benzimidazoly u mnoha zvířecích druhů může též znamenat vyšší riziko aktivace prekancerogenních látek.

#### 2.4.6 Vliv onemocnění zvířat na farmakokinetiku anthelmintik

Expres a aktivita biotransformačních enzymů může být ovlivněna patologickým stavem. Také parazitární infekce může ovlivněním aktivit biotransformačních enzymů pozměnit schopnost hostitele metabolizovat léčiva (Renton, 2001). Parazité mohou daný biotransformační orgán ovlivnit působením vylučovaných toxických produktů či mechanickým drážděním vyvolaným jejich prostou přítomností (Hillyer and Hopla, 1998). Změny mohou ovlivnit účinnost terapie, bezpečnost podávaných léčiv, spektrum metabolitů, perzistenci léčiv a jejich metabolitů v organismu včetně rizika reziduálních zbytků v živočišných produktech pro lidský konzum.



**Obr. 3** Způsob zjišťování míry parazitace vlasovkou slézovou a závažnosti anémie. Komerčně vyráběné stupnice s barevnou škálou odstínů pro porovnání se zabarvením vnitřního očního víčka umožní určit míru anémie a tak míru parazitace. Foto J. Lamka

Vliv gastrintestinální nematodózy na kinetiku ABZ a jeho metabolitů v plazmě a abomasální tekutině u ovce pozorovali Alvarez et al (1997). I.r bylo 7.5 mg/kg podáno skupině ovcí kontrolní (K), skupině uměle infikované vlasovkou slézovou (HC) a skupině přirozeně infikované vlasovkou a dalšími červy (např. *O. circumcincta*, *T. axei*, *T. columbriformis*,...)(HC+). V plazmě byly detekovány ABZSO, ABZSO<sub>2</sub>, nikoli ABZ. ABZSO se v plazmě nacházel 0.5-48 h po podání u kontrolní skupiny, 0.5-60 h u skupiny HC

a 0.5-72 h u skupiny HC+. AUC ABZSO a  $C_{max}$  ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> byly významně vyšší u obou infikovaných skupin, MRT a  $T_{1/2}$  byly beze změny. ABZ se v abomasu vyskytoval mezi 0.5-48 h u infikovaných skupin, 0.5-72 u skupiny kontrolní. Celková biologická dostupnost (AUCs) ABZ a jeho metabolitů v abomasální tekutině byla nižší u infikovaných než kontrolních zvířat. Zvýšené pH abomasální tekutiny indukované přítomností infekce vlasovkami mohla snížit plazma/abomasum pH gradient což mohlo snížit iont-trapping ABZ a jeho metabolitů v abomasu. To koreluje s vyšší celkovou AUC v krevním oběhu infikovaných oproti kontrolním a nižší v abomasální tekutině infikovaných.

Vliv parazitózy na farmakokinetiku doramektinu (s.c, 200 µg/kg) u jehňat sledovali Pérez et al (2007). Parentní molekula byla v plazmě detekována mezi 30 min od aplikace do 20 dnů (zvířata s parazitózou) nebo 35 dnů (zvířata zdravá). AUC bylo u nemocných signifikantně nižší, MRT výrazně kratší. Parazitární onemocnění může významně ovlivnit plazmatickou distribuci tohoto léčiva u jehňat po s.c. podání. Může to být zapříčiněno 1) rychlejší absorpcí, 2) vyšší clearance, 3) kratším eliminačním poločasem a nebo spekulativně 4) nižším distribučním objemem nemocných zvířat. Naopak mírná infekce *Nematodirus battus* neovlivnila farmakokinetiku NTB, ABZ a metabolitů u jehňat a dospělých ovcí (McKellar et al, 1993).

Třítýdení infekce vyvolaná vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*) u koz snížila aktivitu hexobarbiton oxidasy, p-nitroreduktasy a UGT. Obsah mikrosomálního proteinu byl též u nemocné skupiny nižší (Inaam et al, 2007).

Změny jaterních funkcí během migrační fáze infekce motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*) mohou být v oblasti metabolismu léčiv, mitochondriální bioenergetiky nebo metabolismu cukrů (Lenton et al, 1996). Subklinická fáze infekce motolicí jaterní se vyznačuje sníženou jaterní koncentrací CYP (Ferre et al, 1996). Sledování aktivity jaterních a ledniných biotransformačních enzymů dospělých samic ovcí po jednorázové infekci *Fasciolou* hepaticou (10 či 20 týdnů s infekcí) nebo po biinfekci (infekce 10. a 20.týden před usmrcením) provedli Calléja et al (2000). Mono- i bi-infekce signifikantně snížily jaterní mikrosomální obsah CYP a ethylmorfin-N-demethylasovou aktivitu (CYP3A). Western blotting potvrdil nižší obsah CYP3A proteinu. GST (CDNB) zůstala nezměněná u všech testovaných skupin. V ledvinách byla snížena hladina mikrosomální CYP u desetitýdenní monoinfekce. U ovcí byla též snížena clearance antipyrinu (léčivo metabolizované CYP), nižší metabolismus antipyrinu souvisí se vstupem parazitů do žlučových cest a poškozením jater migrujícími motolicemi (Ferre et al, 1996). Fasciolóza u skotu výrazně snížila aktivitu jaterní UGT (Facino et al, 1985).

Jaterní oxidativní metabolismus u křečka s experimentálně navozenou dikroceliózou (*Dicrocoelium dendriticum*, motolice kopinatá) snížil celkovou koncentraci CYP, aktivitu anilinhydroxylasy a EROD (Sánchez-Campos et al, 1996). Vliv dikroceliózy na aktivitu biotransformačních enzymů byla studována i v naší laboratoři na muflonech. Dikrocelióza u mladých muflonů vedla k signifikantnímu snížení aktivity GST a naopak ke zvýšení aktivity TBSO (Skálová et al, 2007), dlouhotrvající dikrocelióza snížila 6 $\beta$ -TOH, GST, UGT i jaterní *in vitro* metabolismus ABZ i FLU (Křížová et al, 2008). Hemonchóza též u ovcí snížila aktivitu většiny biotransformačních enzymů a metabolismus FLU (Bártíková et al, submitted).

Zánětlivé procesy v organismu mohou změnit farmakokinetické chování některých léčiv. Molina et al (2007) vyvolali zánět ischemií a reperfuzí střeva potkana a zkoumali vliv na absorpci a metabolismus p.o. podaného ABZ. Pouze u ischemizovaných zvířat byl ABZ detekován v plazmě, ABZSO byl v plazmě obou skupin. Toto naznačuje rychlou biokonverzi ABZ ve střevě zdravých potkanů, případně na vyšší permeabilitu střev ischemizovaných zvířat. Mikrosomální inkubace prokázaly sníženou sulfoxidasovou aktivitu u ischemizovaných potkanů. Oba ABZ sulfoxidující CYP3A a FMO byly ischemií (zánětem) redukovány.

Colditz et al (1996) popsali obecně vyšší vnímavost k infekčním onemocněním u mladých zvířat oproti dospělým. Tato vyšší vnímavost se zdá být hlavně díky nižší imunologické odpovědi, která není pouze důsledkem nevytvořené aktivní imunity po setkání s patogenem. Mladé ovce mají signifikantně méně CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocytů, ale podobné množství T19<sup>+</sup> a B lymfocytů v krvi, lymfě a kůži jako dospělá zvířata. Krevní lymfocyty jehňat produkují méně interferonu  $\gamma$  a mají nižší protilátkovou odpověď oproti dospělým. Souhrně vzato toto může být část objasnění proč jsou mláďata přežvýkavců citlivější k infekčním onemocněním obecně, ale hlavně ke m parazitózám.

#### **2.4.7 Životní prostředí a metabolismus anthelmintik**

Modulace enzymových aktivit zvířat či člověka látkami znečišťujícími životní prostředí, vodu, vzduch, látky obsažené v potravě, sebou nese farmakologické a toxikologické důsledky. Při medikaci látkou, jejíž biotransformační aparát byl předem naindukován, může dojít k rychlejšímu odbourání látky, nedojde k očekávanému farmakologickému účinku nebo bude účinnost alespoň snížena. Naopak inhibice může zapříčinit předávkování. Konkrétně indukce CYP1A má vliv například na terapii ABZ, protože se rychleji odbourává účinný ABZSO na neúčinný ABZSO<sub>2</sub>. Může dojít k selhání terapie daného zvířete a možnému

rozvoji rezistence parazita na použité subterapeutické dávky léčiva. Přitom k indukci CYP1A u hospodářských zvířat může dojít velmi snadno např. nevhodným nátěrem stájí či kontaminací krmiva nebo pitné vody. Machala et al (1997, 1998) porovnávali v jedné studii aktivitu CYP1A a 2B v mikrosomech kaprů z různých lokalit a v druhé studii aktivitu a expresi CYP1A u býků ze dvou různých stájí. Zjistili výrazný indukční vliv polycyklických a polyhalogenovaných látek v některých našich rybnících resp. indukční vliv polychlorovaných bifenyly přítomných v nátěrových hmotách použitých v ustájení jedné skupiny býků na CYP1A. Indukce CYP1A těmito kontaminantami životního prostředí by významně ovlivnila následnou terapii zvířat některými anthelmintiky, na jejichž metabolismus se CYP1A podílí (např. ABZ, FBZ).

Na straně druhé, anthelmintika a jejich metabolity také mohou zasahovat do životního prostředí. Při terapii farmakologicky účinnými látkami si obvykle všímáme pouze touženého vlivu. Občas si uvědomíme, že efekt léčiva může být ovlivněn několika dalšími faktory (komedikací, patologickým stavem či složkami stravy), už si ale méně uvědomujeme, že tyto látky a jejich metabolity z těla pacienta odcházejí a mohou dále působit na další živé organismy, hlavně na vodní živočichy. Toto je třeba mít na zřeteli u látek používaných ve velkých množstvích, u látek toxických a těch, co se mohou kumulovat. Antiparazitika jsou z celosvětového hlediska ve velkém množství používaná léčiva působící několika mechanismy účinku. Tyto látky mohou být exkretovány nezměněné nebo jako metabolity. Například 90% podaného IVM je vyloučeno v nezměněné podobě. Po terapii ryb IVM se našel IVM v relativně velkých koncentracích v pobřežních usazeninách. IVM působí toxicky na mnohé bezobratlé živočichy, mimo jiné i hubí zooplankton (Morley, 2009). Potravním řetězcem se nám, lidem, tyto negativní dopady medikace mohou vrátit. Navíc expozice parazitů nízkým dávkám antiparazitik v životním prostředí může urychlit rozvoj rezistentních kmenů parazitů.

#### **2.4.8 Těhotenství (březost) a farmakokinetika anthelmintik**

Zvýšená hladina progesteronu a estrogenů v průběhu těhotenství může ovlivnit clearance některých léčiv (tyto hormony působí jako kompetitivní inhibitory mikrosomálních oxidas (Cristofol et al, 1997)), některé látky mohou ovlivnit vývoj plodu, přesto je ale za některých podmínek terapie vhodnými anthelmintiky ve vhodném dávkovacím schématu v průběhu březosti výhodná či nezbytná. Příkladem může být negativní ovlivnění vývoje plodu anémií matky, pokud ta je postižena parazitózou způsobující krevní ztráty (např.

hemonchóza). Anthelmintická terapie matky též může omezit parazitaci novorozených mláďat laktogenním přenosem (Krämer et al, 2009).



**Obr.4** Hematokrit ovce při infekci vlasovkou slézovou. Normální hodnota hematokritu ovcí je 0.27 – 0.45 l/l, hodnota ovce na obrázku je asi 0.11 l/l. Foto J. Lamka

Na farmakokinetiku netobiminu a jeho metabolitů neměla březost ovcí vliv. Sledované byly ovce nebřezí a v první a třetí třetině březosti, podaná dávka 20 mg/kg perorálně. V plazmě nebyly detekovány ani látka parentní ani ABZ. Mezi sledovanými skupinami nebyla prokázána statistická významnost ve farmakokinetických parametrech ani u ABZSO ani u ABZSO<sub>2</sub> (Cristofol et al, 1997a).

Farmakokinetické chování netobiminu bylo sledováno i u březích samic potkana (Cristofol et al, 1997b). Léčivo bylo podáno ve třech dávkách – 50, 59.5 a 70.7 mg/kg. Hlavním metabolitem v plazmě byl ABZSO. NTB nebyl detekován, ale ABZ se vyskytoval asi do 6.hod od podání. Farmakokinetika a plazmatické hladiny studovaných metabolitů byly u nebřezích a březích samic podobné, takže eliminační schopnost potkaních samic vylučovat ABZ není počáteční březostí ovlivněna. Koncentrace ABZ, ABZSO i ABZSO<sub>2</sub> v embryonálních tkáních převyšovala tyto koncentrace v plazmě matky. U fetů ovcí byla v posledním trimestru koncentrace ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> poloviční oproti mateřské a ABZ nebyl detekován (Cristofol et al, 1995). Toto může indikovat rozdílné mezdruhové složení placenty. U koncentrací 59.5 a 70.7 mg/kg bylo zároveň detekováno i zvýšené množství malformací, za které zřejmě zodpovídá ABZSO. Při podání až racemického ABZSO březím ovcím, hladina ABZSO nalezená ve fetu byla asi poloviční oproti plazmatické hladině samice. Poměr (+)/(-)-ABZSO byl vyšší u samice než u fetu (Capace et al, 2002).

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo přinést nové poznatky týkající se faktorů, které ovlivňují aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik u ovce domácí a ovce muflon. Získané informace by mohly přispět ke zefektivnění farmakoterapie helmintóz, bezpečnějšímu užívání anthelmintik a omezení dalšího rozvoje rezistence na dosud známá anthelmintika.

Dílčími cíli bylo:

- 1) Zkoumat vliv patologického stavu (dikrocelióza a hemonchóza) na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik *in vitro*
- 2) Zkoumat vliv podání anthelmintika na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintika a zhodnotit možné důsledky modulace biotransformačních enzymů na anthelmintickou terapii
- 3) Zkoumat vliv pohlaví a věku na farmakokinetiku flubendazolu a jeho metabolitů *in vivo* u ovce domácí pomocí vhodné HPLC metody

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Vliv patologického stavu na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik

#### 4.1.1 Vliv dikroceliózy na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik u ovce muflon

Skálová, L., Křížová, V., Cvilink, V., Szotáková, B., Štorkánová, L., Velík, J., Lamka, J. (2007) Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effect of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver. *Vet. Parasitol.* 146, 254-262.

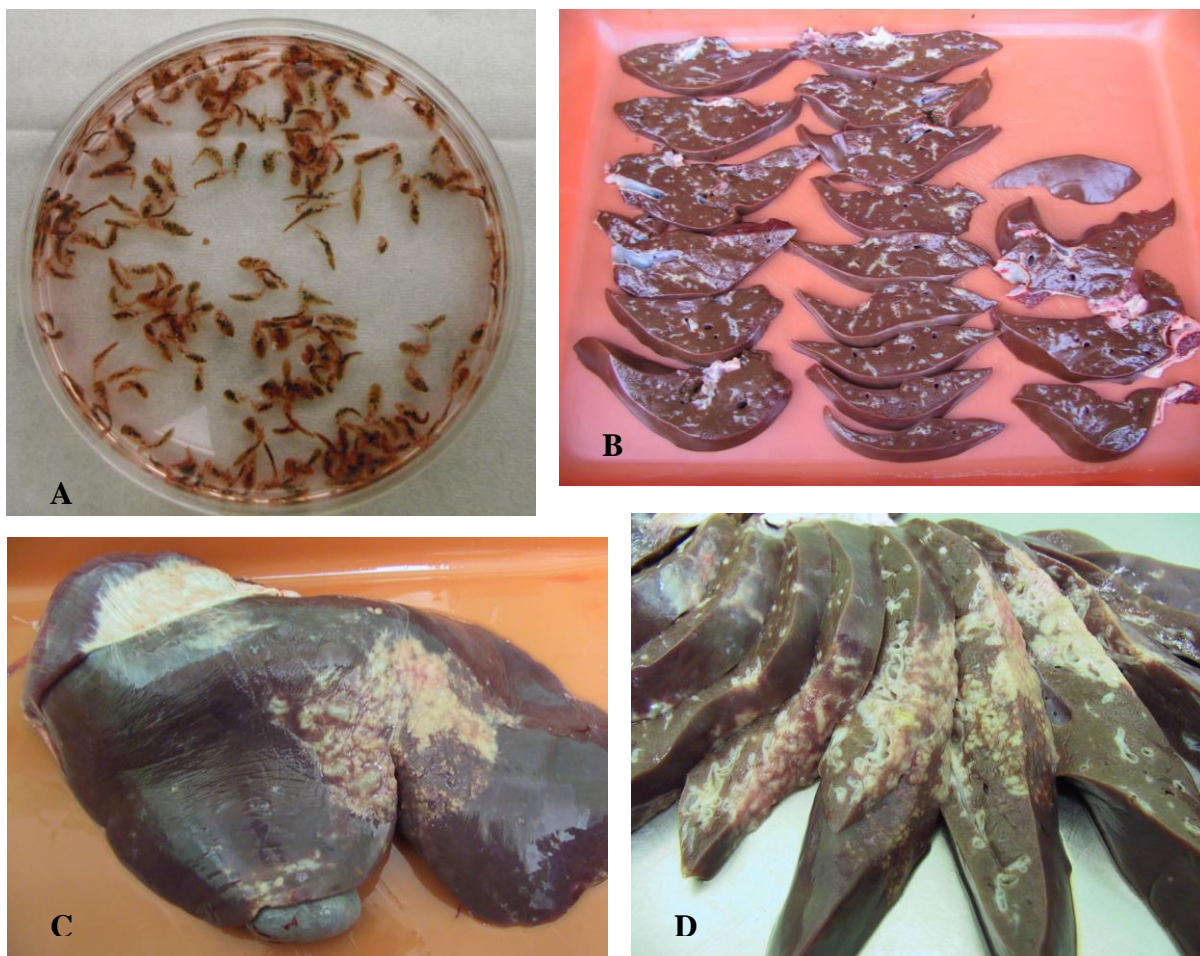
Křížová, V., Lamka, J., Szotáková, B., Vokřál, I., Srpová, V., Urbánková, M., Kubíček, V., Nobilis, M., Skálová, L. (2008) Dicrocoeliosis of old mouflon ewes – effect on the biotransformation enzymes and metabolism of anthelmintics in vitro. *Open Vet. Sci. J.* 2, 23-32.

Parazitické infekce mohou ovlivnit biotransformační enzymy hostitele a tak modifikovat jeho schopnost metabolizovat léčiva a jiná xenobiotika, což může mít farmakologické a toxikologické důsledky. Ve výše zmíněných studiích byly porovnávány aktivity biotransformačních enzymů a průběh metabolismu anthelmintik u zvířat nemocných dikroceliózou a zvířat bez parazitární infekce. Obě studie se lišily pohlavím a věkem testovaných muflonů. Protože k infekci motolicí kopinatou dochází hned u mláďat jakmile se začnou pást a dikroceliózou pak trpí zvíře po celý svůj život, je stáří zvířete přímo úměrné době trvání onemocnění.

Většina biotransformačních enzymů se nachází v játrech, je tedy zřejmé že jaterní onemocnění, mezi které patří dikrocelióza, může významně ovlivnit biotransformaci nejen podaných anthelmintik, ale i jiných xenobiotik. Vliv může mít prostá přítomnost parazitů v játrech či zánětlivé mediátory v reakci na ně či produkty parazity vylučované. Dříve se předpokládalo, že při patologických změnách v játrech se aktivita všech CYPů a ostatních biotransformačních enzymů snižuje. V posledních letech však bylo zjištěno, že účinek



jaterních onemocnění není jednoznačný. Svě přispění do této problematiky mají i naše dvě výše zmíněné publikace.



**Obr. 5** Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) a důsledky jejího působení.

**A** Motolice *ex vivo* na Petriho misce o průměru 6 cm. **B,C,D** změny jaterní tkáně při dikrocelióze. B,C velmi vážné poškození. Foto J.Lamka

Do první studie byli zařazeni jeden rok staří mufloní berani, do druhé 5-7 let staré mufloní ovce. U mladých beránků s dikroceliózou bylo z 8 sledovaných biotransformačních enzymů zjištěno signifikantní zvýšení aktivity TBSO a signifikantní snížení GST a mírně zvýšení EROD (aktivita připisovaná CYP1A). Při *in vitro* inkubacích byla též zaznamenána zvýšená rychlost oxidace ABZ na (+)-ABZSO a racemického ABZSO na ABZSO<sub>2</sub> v jaterních mikrosomech. Lze předpokládat, že zvýšená tvorba (+)-ABZSO je zapříčiněna indukcí TBSO, která je připisována FMO, a zvýšená tvorba ABZSO<sub>2</sub> je způsobena zvýšenou aktivitou CYP1A (1.krok sulfoxidace ABZ zajišťují FMO a CYP3A, 2.krok, sulfonaci, katalyzuje CYP1A). U ovcí a muflonů je (+)-ABZSO dominujícím enantiomerem ABZSO v plazmě po

podání ABZ (Delatour et al, 1991; Velík et al, 2005), zároveň má též vyšší antiparazitickou aktivitu (Solana et al, 2001, 2002). Zvýšená aktivita FMO jako odpověď na parazitózu je pravděpodobně pro muflony výhodná, protože se antiparaziticky účinnější enantiomer tvoří ve zvýšeném množství, naopak indukce CYP1A může být nevýhodou z hlediska urychlené deaktivace účinného ABZSO na neúčinný ABZSO<sub>2</sub> a možné aktivace prekarcenogenních látek s jejími toxikologickými důsledky.

Ve druhé studii se starými mufloními ovce byly porovnávány aktivity stejných oxidačních a konjugačních enzymů a *in vitro* metabolismus ABZ jako u mladých beranů, navíc i aktivity několika redukčních enzymů a *in vitro* metabolismus FLU. Při tomto dlouhodobém vlivu parazitózy na biotransformaci se ukázalo signifikantní snížení aktivit 6β-TOH, GST, UGT, zároveň i snížení jaterního *in vitro* metabolismu ABZ i FLU. Maximální rychlost i Michaelisova konstanta byly ve všech případech (oxidace ABZ i redukce FLU) u skupiny nemocných zvířat sníženy, jejich poměr ( $V_{max}/K_m$ , vnitřní clearance) však zůstal víceméně nezměněný. V případě redukčních enzymů není ovlivnění dikroceliózou jednoznačné. Byla zaznamenána snížená aktivita cytosolické acenaphtenoldehydrogenasy, ale naopak zvýšená aktivita mikrosomální pyridincarboxaldehydreduktasy a mikrosomální i cytosolické oracinreduktasy.

Se sníženou aktivitou konjugačních enzymů (GST a UGT) se musí počítat při medikaci zvířat jakýmikoliv léčivými, která jsou v 2. fázi biotransformace konjugována právě s glutathionem či kyselinou glukuronovou. Omezením konjugace se může prodloužit eliminace, tedy jejich přítomnost v těle hostitele a zvýšit riziko reziduí látek v živočišných produktech. Toto je nezbytné mít na zřeteli při medikaci zvířat jejichž produkty jsou určeny pro lidský konzum.

#### 4.1.2 Vliv hemonchózy na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik u ovce domácí

Bártíková, H., Křížová, V., Lamka, J., Kubíček, V., Skálová, L., Szotáková, B. – Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. (submitted)



**Obr. 6** Vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*). Průměr Petriho misky 6cm. Foto V.Forstová

skupina byla kontrolní, bez parazitické nákazy. Další dvě skupiny byly perorálně infikovány 5000 larvami stádia L3 vlasovky slézové ISE (k benzimidazolům citlivý kmen). Jedna skupina infikovaných zvířat byla ponechána 7 týdnů, druhá 11 týdnů. Sedm týdnů proto, že teprve po sedmi týdnech je infekční onemocnění plně rozvinuté (vlasovky dosáhly dospělosti a samice začaly produkovat vajíčka). Jedenáct týdnů bylo zvoleno tak, aby zvířata žila delší dobu s rozvinutou hemonchózou, ale aby u nich ještě nenastala výraznější klinická manifestace onemocnění (anémie, úbytek váhy atd.). Po usmrcení byla zvířatům odejmuta část jater a tenkého střeva

Cílem tohoto projektu bylo studium vlivu hemonchózy, běžného parazitického onemocnění malých přežvýkavců způsobeného vlasovkou slézovou (*Haemonchus contortus*), na aktivity biotransformačních enzymů a na *in vitro* biotransformaci FLU v játrech a tenkém střevě ovce domácí (*Ovis aries*). Do pokusu bylo zařazeno 12 beránek ve věku 3-4 měsíců. Věk zvířat byl zvolen proto, že během tohoto období přijdou obvykle jehňata poprvé do kontaktu s infekčním stádiem parazita na pastvě. Jehňata byla rozdělena do 3 skupin po 4 jedincích. První



**Obr. 7** Žaludek ovce s nákazou vlasovkou slézovou. Foto J. Lamka

na přípravu subcelulárních frakcí ke stanovení aktivit biotransformačních enzymů a *in vitro* metabolismu FLU.

Jaterní mikrosomy ze zvířat infikovaných 7 týdnů vykazovaly signifikantně nižší aktivitu EROD, MROD, BROD, MFCD, CXOH, TBSO a vyšší ORR, u zvířat infikovaných 11 týdnů se prokázala významně nižší aktivita TBSO, UGT a CXOH. Z měřených jaterních cytosolických enzymů byla snížena aktivita ANDH, GALR, PCAR a zvýšená aktivita GST u 7 i 11 týdnů infikovaných zvířat. Ve střevních vzorcích bylo signifikantní zvýšení aktivity vlivem hemonchózy zaznamenáno pouze u cytosolické ORR.

Ke srovnání biotransformace FLU *in vitro* se FLU (0-15  $\mu$ M) inkuboval s NADPH a jaterní a střevní cytosolickou frakcí. Jediným nalezeným metabolitem byl FLU-R. V jaterním cytosolu byla rychlost tvorby FLU-R lineární v celém uvedeném rozsahu koncentrací (vyšší koncentrace nebylo možné dosáhnout z důvodu špatné rozpustnosti FLU ve vodných roztocích). Hemonchóza způsobila snížení rychlosti tvorby FLU-R v játrech u obou nemocných skupin, ale pouze v případě sedmitýdenní infekce bylo snížení signifikantní. V případě střevního cytosolu odpovídala rychlost tvorby FLU-R Michaelis-Mentenové kinetice. Rychlost byla v tomto případě významně nižší u obou skupin nemocných zvířat.

Výsledky ukazují, že parazitóza přítomná v jiném orgánu než jsou játra (jako hlavní orgán biotransformace) může ovlivnit i biotransformaci jaterními enzymy. Tyto změny v aktivitě biotransformačních enzymů mohou být způsobeny toxickým efektem exkrečních produktů parazitů nebo zánětlivými mediatory na enzymy samotné či na proces jejich exprese. Hemonchóza snižuje FLU metabolismus v jaterním i střevním cytosolu. Pomalejší redukce FLU může způsobit pomalejší eliminaci a tak může prodloužit působení FLU s jeho pozitivním anthelmintickým působením v těle hostitele. Zároveň je však třeba mít na paměti možnou kumulaci FLU v organismu a v živočišných produktech.

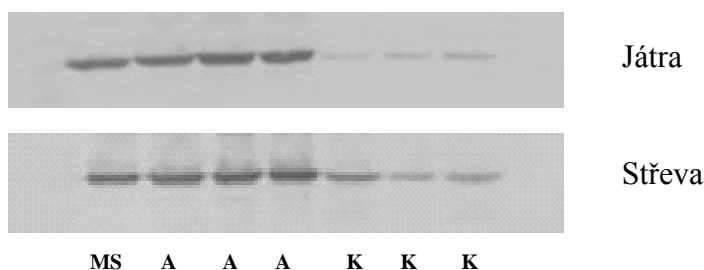
## 4.2. Vliv léčby zvířat anthelmintikem na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus anthelmintik *in vitro*

Lamka, J., Křížová, V., Cvilink, V., Šavlík, M., Velík, J., Ducháček, L., Szotáková, B., Skálová, L. (2007) A single adulticide dose of albendazole induces cytochrome P4501A in mouflon (*Ovis musimon*) with dicrocoeliosis. *Vet. Med.* 52, 343-352.

Řada léčiv může modulovat (indukovat nebo inhibovat) biotransformační enzymy. Modulace aktivity biotransformačních enzymů ovlivní účinek a plazmatický poločas současně či následně podávaných léčiv a jiných xenobiotik, což může mít výrazné farmakologické a toxikologické důsledky. Může dojít k vzestupu plazmatické hladiny léčiva s rizikem toxického působení nebo k snížení plazmatické koncentrace se snížením terapeutického efektu léčiva pod terapeutickou mez, rovněž se zvyšuje riziko nežádoucích účinků. Zmíněné důsledky indukce a inhibice biotransformačních enzymů ukazují, že je nezbytné modulaci monitorovat.

ABZ je širokospektré benzimidazolové anthelmintikum často používané ve veterinární medicíně. ABZ je v těle hostitele metabolizován dvoustupňovou S-oxidací. V prvním kroku vzniká anthelminticky účinný ABZ-sulfoxid za přispění CYP3A a FMO v druhém kroku se tento oxiduje na anthelminticky neúčinný ABZ-sulfon za katalýzy CYP1A. Tento nástin 1. fáze biotransformace naznačuje klíčovou roli CYP1A na účinek ABZu v těle hostitele. Indukce tohoto enzymu může zapříčinit snížení plasmatické koncentrace účinného metabolitu antiparasitika a tím zvýšit šanci parazita přežít v těle hostitele. Při studiu modulačního efektu ABZ u ovcí bylo zjištěno jeho indukční působení při opakovaném podávání (Velík et al, 2005). Protože toto v praxi běžně užívané dávkování (opakovaně 7,5 mg ABZ/kg živé hmotnosti zvířete 5 po sobě následujících dnů) není ideální jak z hlediska navození indukce CYP1A a tím zrychlené deaktivace léčiva, tak ani z hlediska manipulace a stresovanosti zvířat opakovaným odchytem, bylo snahou toto vše omezit jednorázovým podáním vyšší dávky ABZu. V naší výše zmíněné studii byly dospělé mufloní ovce postižené dikroceliózou rozděleny do tří skupin. Jedna skupina (n = 5) byla léčena jednorázově 30 mg ABZ/kg živé hmotnosti, druhá (n = 5) sloužila jako skupina kontrolní. Zvířata těchto dvou skupin byla 24 hodin po podání léčiva poražena a z jejich jaterní tkáně a střevní mukózy byly připraveny subcelulární frakce, v kterých byly měřeny aktivity vybraných biotrasformačních enzymů.

Třetí skupina zvířat (n = 4) byla též medikována jednorázově 30mg ABZ/kg hmotnosti a byla použita pro koprologické a nekroptické potvrzení anthelmintické účinnosti terapie. U prvních dvou skupin bylo porovnáváno 8 aktivit biotransformačních enzymů, nejvýznamnější modulace byla sledována u CYP1A. Aktivita podrodiny CYP1A (isoforem CYP1A1 a CYP1A2) byla stanovována prostřednictvím aktivit EROD a MROD. V případě jater nebyla EROD ani MROD aktivita léčených muflonů vyšší než aktivita muflonů kontrolních. Tím se zdánlivě nepotvrdila domněnka o indukci CYP1A. Již však byla publikována studie (Baliharová et al., 2005), která dokumentuje, že v přítomnosti ABZu může být indukce maskována inhibičním efektem ABZu. Přítomnost ABZu v membránách jaterních mikrosomů byla pomocí HPLC prokázána. Na maskování indukce CYP1A inhibicí příslušných aktivit ukázalo zvýšené množství CYP1A proteinů detekované pomocí metody western blotting.



**Obr. 8** Membrána po imunodetekci proteinů CYP1A1/2 protilátkou. **A** ABZ léčení mufloni, **K** kontrolní mufloni, **MS** molekulární standard (linie 50kD)

V případě střevní mukózy byla indukce CYP1A jednoznačně prokázána měřením EROD a MROD i western blottingem. Taktéž byl inkubací mikrosomů s ABZem a jeho aktivním metabolitem potvrzen dopad indukce CYP1A na zvýšení rychlosti jejich biotransformace.

ABZ tedy i při jednorázovém podání muflonům významně indukuje CYP1A a tak zrychluje svoji vlastní metabolickou deaktivaci, čím se může snížit anthelmintický účinek ABZ a také ovlivnit účinek jiných, současně či následně podaných léčiv. Zvýšená aktivita CYP1A může také vést ke zvýšené metabolické aktivaci prekarcinogenů a příslušným toxikologickým důsledkům. Jednorázové podání ABZ je při léčbě dikroceliózy dostatečně účinné a z praktického hlediska vhodnější než podání opakované, avšak vyvolá významnou indukci CYP1A se všemi farmakologickými a toxikologickými důsledky

### 4.3. Vliv pohlaví a věku zvířat na farmakokinetiku FLU

Nobilis, M., Vybíralová, Z., **Křížová, V.**, Kubíček, V., Soukupová, M., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. (2008) Sensitive chiral high-performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its *Phase I* metabolites in blood plasma using UV photodiode-array and fluorescence detection. Application to pharmacokinetic studies in sheep. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **876**, 89-96.

**Křížová, V.**, Nobilis, M., Prušková, L., Szotáková, B., Cvilink, V., Skálová, L., Lamka, J. (2009) Pharmacokinetics of flubendazole and its metabolites in lambs and adult sheep (*Ovis aries*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.* (in press)

Benzimidazolové anthelmintikum FLU s antinematodní a anticestodní aktivitou se v současnosti se používá k léčbě monogastričních zvířat (prase, kur, krůta, lovné ptactvo, domácí masožravci). FLU má nízkou biologickou dostupnost, po enterálním podání se více než 50% vyloučí v nezměněné formě stolicí. Hlavní metabolické cesty jsou shodné u všech studovaných species. V 1. fázi biotransformace dochází k redukci ketoskupiny za vzniku redukovaného flubendazolu (FLU-R) nebo k hydrolýze karbamátové vazby za vzniku hydrolyzovaného flubendazolu (FLU-H). V současnosti se uvažuje o rozšíření indikace FLU i pro léčbu helmintóz přežvýkavců

Používání FLU k léčbě těchto zvířat by mohlo být výhodné z několika důvodů. Tím nejvýznamnějším je jeho široké anthelmintické spektrum a dobrá účinnost v léčbě systémových helmintóz (Lamka et al, 1996).

Pro rozšíření indikace, navržení vhodného dávkovacího režimu a pro stanovení ochranných lhůt je nezbytná znalost farmakokinetiky FLU u všech cílových species. Dosud byla opublikována pouze jediná farmakokinetická studie FLU u přežvýkavců (Moreno et al, 2004), podávající základní farmakokinetické parametry po podání FLU intraruminálně a intravenózně. V našem projektu jsme studovali farmakokinetiku FLU a jeho metabolitů po p. o. podání FLU ovcím.

Prvním nezbytným krokem byl vývoj a validace selektivní a citlivé chirální HPLC metody pro stanovení nízkých plazmatických koncentrací anthelmintika FLU a jeho metabolitů při zkoumání farmakokinetického profilu těchto látek v plazmě ovcí po p.o. podání FLU. V této metodě byly použity UV photodiode-array a fluorescenční detektory zapojené

tandemově pro stanovení FLU, obou enantiomerů FLU-R, FLU-H a ABZu použitého jako vnitřní standard. Příprava vzorků zahrnovala pH závislou extrakci analytů z krevní plazmy do *t*-butylmethyl etheru. Separace analytů probíhala na analytické koloně Chiralcel OD-R 250mm x 4.6mm koloně, mobilní fáze byla složena z methanolu a 1M NaClO<sub>4</sub> (75:25, v/v), rychlost průtoku byla 0.5 ml.min<sup>-1</sup>. UV absorpční maximum pro redukovaný flubendazol bylo 290 nm, pro ABZ 295 nm, pro flubendazol 310 nm a pro hydrolyzovaný flubendazol 330 nm. Fluoreskující látky - redukovaný flubendazol měl  $\lambda(\text{exc.})/\lambda(\text{emis.}) = 228 \text{ nm}/310 \text{ nm}$  a ABZ  $\lambda(\text{exc.})/\lambda(\text{emis.}) = 236 \text{ nm}/346 \text{ nm}$ . Fluorescenční detekce byla asi 10x citlivější než UV detekce. Analýza jednoho vzorku trvala 27 min. Tato validovaná chirální HPLC-PDA-FD metoda byla vyzkoušena na pilotní farmakokinetické studii FLU u ovcí. Významná převaha (+)-FLU-R v plazmě ovcí ukázala na stereospecifitu reduktas karbonylové skupiny. (+)-FLU-R zaujímal asi 97,5 % z celkového množství FLU-R. Parentní látka, FLU-H a (-)-FLU-R se v krevní plazmě ovcí vyskytovaly pouze v nízkých koncentracích.

Cílem druhé studie bylo určit farmakokinetické parametry enterálně podaného FLU a zjistit, zda je farmakokinetika FLU rozdílná u ovcí a beranů (vliv věku) a u dospělých zvířat a pohlavně nedospělých jehňat (vliv pohlaví). Obecně se farmakokinetika liší podle živočišného druhu, cesty podání, formulace, tělesné kondice, věku, pohlaví, kde všechny faktory hrají významnou roli v účinnosti farmakoterapie.

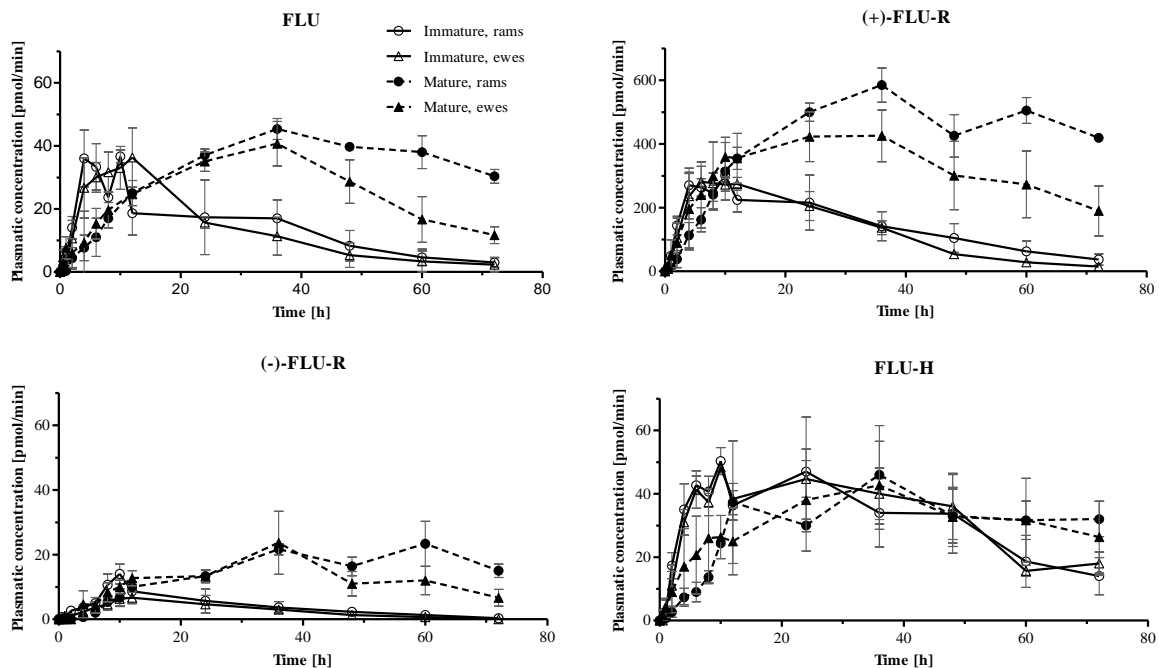
Farmakokinetické studie byly prováděny se třemi samci a třemi samicemi ovce domácí (*Ovis Aries*). Ve věku třech měsíců zvířat byla provedena první část experimentu (pohlavně nedospělá zvířata) a později v osmi měsících jejich věku druhá část experimentu (dospělá zvířata). FLU byl podáván v jednotlivé perorální dávce 30 mg/kg živé hmotnosti zvířat ve formě suspenze 2 g/100ml ve vodném 1.5 % roztoku mikrokrystalické celulózy připravené z přípravku Flubenol 50 % prm. ad us. vet. Odběry krve pro analytické stanovení byly v intervalech 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 a 72 hod po podání. Vzorky plazmy byly vyextrahovány a analyzovány pomocí HPLC (optimalizace metody viz Nobilis et al, 2008).

U jehňat i dospělých zvířat byl FLU-R hlavním metabolitem nalezeným v plazmě. Plazmatická koncentrace (+)-FLU-R enantiomeru 30-50x převyšovala koncentraci (-)-FLU-R enantiomeru.

Plazmatický profil FLU a metabolitů se významně lišil podle věku zvířat. U jehňat byla 72 hod po podání FLU koncentrace parentní látky a (-)-FLU-R velmi blízko detekčnímu limitu a koncentrace FLU-H a (+)-FLU-R rychle klesala, zatímco u dospělých zvířat byla koncentrace všech látek na vysoké hodnotě a klesala pouze pomalu. Maximální koncentrace



FLU a metabolitů byly u dospělých zvířat dasaženy později než u jehňat, u obou enantiomerů FLU-R byla maximální koncentrace signifikantně vyšší u skupiny dospělých jedinců. Hodnoty AUC FLU a FLU-R byly také signifikantně nižší u jehňat než dospělých. Obecně lze říci, že u dospělých byla pozorována pomalejší, ale účinnější absorpce než u jehňat.



**Obr. 9** Plazmatický koncentrační profil ( $\pm$  SD) FLU, (+) a (-) enantiomerů FLU-R a FLU-H po enterálním podání FLU nedospělým a dospělým beranům a ovcím

Data ukazují rychlý výskyt FLU a metabolitů v krvi což naznačuje, že absorpce začala již v předžaludku a léčivo se rychle začalo metabolizovat. Maté et al (2008) popsali metabolizaci FLU v játrech, duodenální mukóze a zjistili, že neprobíhá v ruminální tekutině. Nemůžeme však vyloučit možný metabolismus sliznicí předžaludku.

Pohlavní rozdíly ve farmakokinetice byly pozorovány pouze u několika parametrů ( $AUC_{(0-\infty)}$ ,  $T_{1/2}$  a MRT) u FLU a (+)-FLU-R v případě dospělých ovcí a beranů, u jehňat žádné pohlavní rozdíly nebyly.

Významné rozdíly ve farmakokinetice flubendazolu mezi jehňaty a dospělými ovcemi je třeba mít na zřeteli při sestavování dávkovacího schématu flubendazolu a stanovení ochranné lhůty.

## 5. ZÁVĚR

Faktory, které ovlivňují metabolismus anthelmintik a byly zkoumány našimi experimenty, lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Dikrocelióza i hemonchóza ovlivnily aktivitu biotransformačních enzymů i metabolismus anthelmintik *in vitro*. Výsledky se lišily dle zkoumané parazitózy a doby jejího trvání. Při onemocnění dikroceliózou pouze krátkou dobu byl *in vitro* metabolismus ABZ mírně urychlen, při dlouholeté dikrocelióze vykazovaly mikrosomy z nemocných zvířat zpomalenou rychlost metabolismu ABZ i FLU. Přestože hemonchóza je onemocnění postihující sléz přežvýkavců, ovlivnila některé jaterní a střevní biotransformační enzymy a snížila rychlost metabolismu ABZ a FLU *in vitro*. I když dikroceliózou i hemonchózou byla biotransformace FLU a ABZ ovlivněna, není třeba se této skutečnosti obávat, protože ovlivnění není velké a snížení rychlosti metabolismu anthelmintik může být navíc pro hostitelská zvířata výhodou z hlediska zpomaleného metabolismu anthelmintik a tedy jejich delšího působení.
- 2) ABZ se při jednorázovém podání muflonům projevil jako silný induktor CYP1A, což bylo prokázáno zvýšením specifických aktivit i příslušného proteinu v játrech i střevech muflonů. Prokázali jsme rovněž, že tato indukce má vliv na zvýšení rychlosti deaktivace ABZSO a tedy pravděpodobně i na snížení účinku anthelmintické terapie. Důsledkem pak může být i vývoj rezistence helmintů na ABZ. Indukční účinek ABZ na CYP1A byl zjištěn i při opakovaném podání ABZ muflonům v nižších dávkách (Velík et al, 2005). Z důvodu shodných výsledků je výhodnější medikace zvířat jednorázovou dávkou z hlediska snazší manipulace a nižší stresovanosti zvířat. Avšak na místě by bylo používání jiného anthelmintika, které není induktorem biotransformačních enzymů.
- 3) Podařilo se vyvinout validní, selektivní a citlivou chirální HPLC metodu pro stanovení nízkých plazmatických koncentrací anthelmintika FLU a jeho metabolitů a pomocí ní jsme zkoumali farmakokinetický profil těchto látek v plazmě ovcí po p.o. podání FLU. Plazmatický profil a zjišťované farmakokinetické parametry parentní látky léčiva i metabolitů se významně lišily u dospělých zvířat a mládat. U dospělých zvířat byla

pozorována mnohem pomalejší, ale účinnější absorpce FLU. Určitá rozdílnost ve farmakokinetice FLU a jeho metabolitů mezi dospělými samci a samicemi byla prokázána pouze u několika farmakokinetických parametrů. Při zavádění FLU do terapeutické praxe u polygastrických druhů zvířat je třeba zvláště respektovat zjištěné rozdíly ve farmakokinetice mezi dospělými zvířaty a mláďaty.

## 6. SOUHRN

Terapie anthelmintiky je v současné době hlavní metodou v boji s parazitickými červy. Anthelmintika, stejně jako ostatní xenobiotika, v organismu podléhají účinkem biotransformačních enzymů strukturálním změnám, kdy se z látek lipofilních stanou látky polární, snáze vyloučitelné z organismu. Biologický účinek metabolitů a parentní látky je obecně odlišný. Aktivita biotransformačních enzymů je tedy stěžejním faktorem, který určuje rychlost detoxikace a eliminace látky z organismu a tedy i délku účinku léčiv. Ovlivnění aktivit biotransformačních enzymů (modulace) může vést ke změně farmakokinetických parametrů léčiva samého i dalších xenobiotik a tím i k nebezpečí snížení žádoucího účinku a/nebo zvýšení nežádoucích účinků s příslušnými dopady na kvalitu léčby. U hospodářských zvířat je navíc nutno brát v úvahu i možné riziko výskytu reziduí léčiv v živočišných produktech.

Biotransformaci xenobiotik ovlivňuje řada faktorů fyziologických i patologických. Tyto faktory lze rozčlenit na inter-individuální (druh, pohlaví, genetický polymorfismus) a intra-individuální (věk, výživa, medikace, onemocnění, atd.). Všechny tyto faktory způsobují obrovskou variabilitu v zastoupení a aktivitě biotransformačních enzymů a jsou příčinou velkých rozdílů v biotransformaci xenobiotik u různých jedinců. Variabilita v metabolismu léčiv je často příčinou selhání terapie či mnohých nečekaných a nežádoucích reakcí na léčiva.

V předkládané práci byl studován vliv onemocnění zvířat (dikrocelióza, haemonchóza) na aktivitu biotransformačních enzymů a metabolismus ABZ a FLU *in vitro* u muflonů, dále modulační vliv jednorázového podání albendazolu na aktivitu CYP1A a metabolismus ABZ *in vitro* u muflonů, a nakonec vliv věku a pohlaví na farmakokinetiku p.o. podaného FLU ovčí domácími. Ze všech studovaných faktorů (patologický stav, medikace, věk i pohlaví) měl nejzávažnější vliv věk zvířat a medikace. Zjistili jsme, že farmakokinetika FLU u ovcí se zásadně liší u dospělých jedinců a mláďat a léčba muflonů ABZ vede k výrazné indukci CYP1A a zrychlení deaktivace ABZ. Tyto skutečnosti by měly být brány v úvahu při terapii ovcí těmito anthelmintiky.

Konkrétní substance se tedy musí studovat na cílovém species, vhodného věku, s ohledem na pohlaví, zdravotní stav, březost, cestu podání a formulaci léčiva a se zřetelem na další faktory jako složení stravy či stav životního prostředí v místě chovu.

## SUMMARY

Nowadays, anthelmintic therapy is the main method in the fight with parasitic worms. Anthelmintics, as well as other xenobiotics, undergo structural changes by effect of biotransformation enzymes, when lipophilic substances are transformed to polar substances more easily eliminable from the organism. Generally, biological effects of metabolites and parent compound are different. Activity of biotransformation enzymes is thus the fundamental factor influencing velocity of detoxification and elimination of the compound from the body and duration of drug effect as well. Modulation of biotransformation enzymes' activities can lead to changes in pharmacokinetic parameters of drug itself as well as other xenobiotics and thus to the risk of decrease in desired effect and/or increase in adverse effects with corresponding impact on the quality of drug therapy. In addition, possible risk of drug residues' presence in animal products has to be considered in farm animals.

Biotransformation of xenobiotics is affected by many physiological as well as pathological factors. These factors can be divided into inter-individual (species, gender, genetic polymorphism) and intra-individual (age, diet, medication, disease, etc.). All these factors cause wide variability in occurrence and activity of biotransformation enzymes and are main cause of big differences in biotransformation of xenobiotics in different individuals. Variability in drug metabolism is often the cause of therapy failure or of many unexpected or undesired reactions to drugs.

In presented work, the effect of disease of animals (microcoeliosis, haemonchosis) on the activity of biotransformation enzymes and metabolism of ABZ and FLU *in vitro* in mouflons, further modulation of the CYP1A activity and metabolism of ABZ *in vitro* in mouflons by single administration of ABZ, and at last effect of age and gender on pharmacokinetics of orally administered FLU to domestic sheep were studied. Age of animals and medication had the most significant influence from all studied factors (pathological status, medication, age, and gender). We found out that pharmacokinetics of FLU in sheep essentially differs in adult and young individuals, and treatment of mouflons by ABZ leads to pronounced induction of CYP1A and accelerated deactivation of ABZ. These findings should be taken into account during the pharmacotherapy of sheep by these anthelmintics.

Thus, given substance must be studied on target species of appropriate age with respect to gender, health condition, pregnancy, route of administration and formulation of

drug, and with respect to other factors as composition of diet or state of the environment in the place of breeding.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alí, D., Hennessy, D. (1993) The effect of feed intake on the rate of flow of digest and the disposition and activity of oxfendazole in sheep. *Int. J. Parasitol.* **23**, 477-484.
- Alí, D., Hennessy, D. (1995a) The effect of level of feed intake on the pharmacokinetic disposition of oxfendazole in sheep. *Int. J. Parasitol.* **25**, 63-70.
- Alí, D., Hennessy, D. (1995b) The effect of reduced feed intake on the efficacy of oxfendazole against benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Int. J. Parasitol.* **25**, 71-74.
- Ali, D.N., Hennessy, D.R. (1996) The effect of level feed intake on the pharmacokinetic disposition and efficacy of ivermectin in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **19**, 89-94.
- Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B., Virkel, G., Lanusse, C. (2008) Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **31**, 230-239.
- Alvarez, L.I., Saumell, C.A., Sanchez, S.F., Lanusse, C.E. (1996) Plasma disposition kinetics of albendazole metabolites in pigs fed different diets. *Res. Vet. Sci.* **60**, 152-156.
- Alvarez, L.I., Sfincher, S.F., Lanusse, C.E. (1997) Modified plasma and abomasal disposition of albendazole in nematode-infected sheep. *Vet. Parasitol.* **69**, 241-253.
- Alvinier, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J.F., Lespine, A. (2008) Ketokonazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Vet. Parasitol.* **157**, 117-122.
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737-747.
- Baggot, J.D., McKellar, Q.A. (1994) The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **17**, 409-419.
- Baliharová, V., Velík, J., Lamka, J., Maas, R.F., de Vrieze, G., Bull, S., Fink-Gremmels, J. (2003) The effect of mebendazole on P4501A activity in rat hepatocytes and HepG2 cells. Comparison with thiabendazole and omeprazole. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 773-781.
- Baliharová, V., Velík, J., Lamka, J., Szotáková, B., Šavlík, M., Skálová, L. (2005) Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon *in vitro*. *Pharmacol. Rep.* **57**, 97-106.

- Baliharová, V., Velík, J., Šavlík, M., Lamka, J., Tahotná, J., Szotákvá, B., Skálová, L. (2004) The effect of fenbendazole, flubendazole and mebendazole on activities of hepatic cytochromes P450 in pig. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27**, 85-90.
- Bártíková, H., Křížová, V., Lamka, J., Kubíček, V., Skálová, L., Szotáková, B. – Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with haemonchosis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* (submitted)
- Bengone Ndong, T., Kane, Y., Diouf, E.H.M., Alvinerie, M. (2007) Ivermectin in Senegalese Peulh Sheep: Influence of Sex on Plasma Disposition. *Vet. Res. Commun.* **31**, 739-747.
- Boobis, A.R., Sesardic, D., Merray, B.P., Edwards, R.J., Singleton, A.M., Rich, K.J., Murray, S., de la Torre, R., Segura, J., Pelkonen, O., Pasanen, M., Kobayashi, S., Zhi-Guang, T., Davies, D.S. (1990) Species variation in the response of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors. *Xenobiotica* **20**, 1139-1161.
- Calléja, C., Bigot, K., Eeckhoutte, C., Sibille, P., Boulard, C., Galtier, P. (2000) Comparison of hepatic and renal drug-metabolising enzyme activities in sheep given single or two-fold challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* **30**, 953-958.
- Capace, B.P.S., Afonso, S.M.S., Lazáro, R., Harun, M., Godoy, C., Castells, G. (2009) Effect of age and gender in the pharmacokinetics of albendazole and albendazole sulphoxide enantiomers in goats. *Res. Vet. Sci.* **86**, 498-502.
- Capace, B.P.S., Castells, G., Pérez, F., Arboix, M., Cristofol, C. (2000) Pharmacokinetic behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep. *Vet. Res. Commun.* **24**, 339-348.
- Capace, B.P.S., Pérez, R., Andaluz, A., Pérez, F., Garcia, F., Castells, G., Arboix, M., Cristofol, C. (2002) Placental Transfer of Albendazole Sulphoxide Enantiomers in Sheep. *Vet. J.* **163**, 155-160.
- Capace, B.P.S., Calsamiglia, S., Castells, G., Arboix, M., Cristofol, C. (2001) Effect of ruminal microflora on the biotransformation of netobimin, albendazole, albendazole sulfoxide, and albendazole sulfoxide enantiomers in an artificial rumen. *J Anim Sci.* **79**:1288-1294.
- Capace, B.P.S., Virkel, G.L., Lanusse, C.E. (2009) Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: Pharmacological implications. *Vet. J.* **181**, 241-250.



- Colditz, I.G., Watson, D.L., Gray, G.D., Eady, S.J. (1996) Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. *Int. J. Parasitol.* **26**, 869-877.
- Cristofol, C., Carretero, A., Fernandez, M., Navarro, M., Sautet, J., Ruberte, J., and Arboix, M. (1995) Transplacental transport of netobimin metabolites in ewes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **20**, 167–171.
- Cristofol, C., Franquelo, C., Navarro, M., Carretero, J. (1997a) Comparative pharmacokinetics of netobimin metabolites in pregnant ewes. *Res. Vet. Sci.* **62**, 117-120.
- Cristofol, C., Navarro, M., Franquelo, C., Valladares, J.E., Arboix, M. (1998) Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep. *Vet. Parasitol.* **78**, 223-231.
- Cristofol, C., Navarro, M., Franquelo, M., Valladares, J.E., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. (1997b) Disposition of Netobimin, Albendazole, and Its Metabolites in the Pregnant Rat: Developmental Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**, 56-61.
- Csikó, G., Banhidi, G., Semjén, G., Laczay, P., Ványiné, Sándor, G., Lehel, J., Fekete, J. (1996) Metabolism and pharmacokinetics of albendazole after oral administration to chicken. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **19**, 322-325.
- Cvilink, V., Lamka, J., Skálová, L. – Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in parasitic helminths. (submitted)
- Dacasto, M., Eeckhoutte, C., Capolongo, F., Dupuy, J., Carletti, M., Calléja, C., Nebbia, C., Alvinerie, M., Galtier, P. (2005) Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. *Vet. Res.* **36**, 179-190.
- Delatour, P., Benoit, E., Lachenet, J., Besse, S. (1990) Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule. *Res. Vet. Sci.* **48**, 271-275.
- Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Caude, I. (1991) Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep, goats and cattle. *Res. Vet. Sci.* **50**, 134-138.
- Dostálek, M. (2006) Farmakokinetika. Grada Publishing, Praha.
- Dupuy, J., Eeckhoutte, C., Sutra, J.F., Mage, C., Alvinerie, M. (1999) Lack of sex-influence on the in vitro metabolism of ivermectin by hepatic microsomal preparations from cattle. *Vet. Res. Commun.* **23**, 223-227.

- Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Lespine, A., Alvinerie, M. (2003) Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet. Parasitol.* **112**, 337-347.
- Facino, R.M., Carini, M., Genchi, C. (1985) Decrease in hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity in rats and cattle with fascioliasis: Impaired in vitro glucuronidation of oxclozanide. *Toxicol. Lett.* **26**, 65-71.
- Ferre, I., López, P., Rojo-Vázquez, F.a., González-Gallego, J. (1996) Experimental ovine fasciolosis: antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* **62**, 93-100.
- Fink-Gremmels, J., van Miert, A.S.J.P.A.M. (1996) Species differences in biotransformation: conventional models in unconventional animal species. *Exp. Toxicol. Pathol.* **48**, 120-125.
- Franconi, F., Brunelleschi, S., Steardo, L., Cuomo, V. (2007) Gender differences in drug responses. *Pharmacol. Res.* **55**, 81-95.
- Gibson, G.G., Skett, P. (2001) Introduction to drug metabolism. 3<sup>rd</sup> edition. Nelson Thornes Publishers, Cheltenham.
- Gokbulut, C., Bilgili, A., Hanedan, B., Aksit D., Aksoy, A.M., Turgut, C. (2009a) Breed-related plasma disposition of ivermectin following subcutaneous administration in Kilis and Damascus goats. *Res. Vet. Sci.*, in Press.
- Gokbulut, C., Bilgili, A., Hanedan, B., Aksit, D., Aksoy, A.M., Turgut, C. (2009b) Sex-related plasma disposition of ivermectin following pour-on administration in goats. *Vet. Parasitol.* **162**, 342-345.
- Gokbulut, C., Cirak, V.Y., Senlik, B., Yildirim, F., McKellar, C.A. (2009c) Pharmacological assessment of netobimin as a potential anthelmintic for use in horses: Plasma disposition, faecal excretion and efficacy. *Res. Vet. Sci.* **86**, 514-520.
- Gokbulut, C., Karademir, U., Boyacioglu, M., Akar, F. (2007) The effect of diet type on the plasma disposition of triclabendazole in goats. *Res. Vet. Sci.* **82**, 388-391.
- Gokbulut, C., Nolan, A.M., McKellar, Q.A. (2002) Pharmacokinetic disposition, foecal excretion and in vitro metabolism of oxibendazole following oral administration in horses. *Res. Vet. Sci.* **72**, 11-15.
- Hennessy, D.R., Ali, D.N. (1997) The effect of feed intake level on the pharmacokinetic disposition of closantel in sheep. *Int. J. Parasitol.* **27**, 1081-1086.
- Hillyer, G.V., Hopla, C.V. (1998) Handbook Series in Zoonoses. *Life Sci.* **63**, 1963-1974.

- Inaam, El A.D., Tayeb, I.B, Shadad, S.A., Hassan, T. (2007) The Effect of Haemonchus Contortus Infection and Treatment with Ivermectin on Drug-metabolizing Enzymes. *Research Journal of Animal and Veterinary Sciences* **2**, 66-71.
- Jez, J.M., Penning, T.M. (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 449-525.
- Jorquera, F., Culebras, J.M., Gonzáles-Galego, J. (1996) Influence of Nutrition on Liver Oxidative Metabolism. *Nutrition* **12**, 442-447.
- Katzung, B.G. (2006) Základní a klinická farmakologie. H+H, Praha.
- Knox, M.R., Steel, J.W. (1997) Effect of diet and species on the pharmacokinetic of fenbendazole in cattle. *Vet. Res. Commun.* **21**, 37-43.
- Krämer, F., Epe, C., Mencke, N. (2009) Investigations into the Prevention of Neonatal Ancylostoma caninum Infections in Puppies by Application of Imidacloprid 10% Plus Moxidectin 2.5% Topical Solution to the Pregnant Dog. *Zoonoses Public Health* **56**, 34-40.
- Krämer, S.D., Testa, B. (2008) The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction Part 6. Inter-Individual Factors Affecting Drug Metabolism. *Chem. Biodivers.* **5**, 2465-2578.
- Krueger, S.K., Williams, D.E. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/functions, genetic polymorphism and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **106**, 357-387.
- Křížová, V., Lamka, J., Szotáková, B., Vokřál, I., Srpová, V., Urbánková, M., Kubíček, V., Nobilis, M., Skálová, L. (2008) Dicrocoeliosis of old mouflon ewes – effect on the biotransformation enzymes and metabolism of anthelmintics in vitro. *Open Vet. Sci. J.* **2**, 23-32.
- Kvasničková, E. (1995) Xenobiochemie. Univerzita Karlova, Praha.
- Lamka, J., Křížová, V., Cvilink, V., Šavlík, M., Velík, J., Ducháček, L., Szotáková, B., Skálová, L. (2007) A single adulticide dose of albendazole induces cytochrome P4501A in mouflon (Ovis musimon) with dicrocoeliosis. *Vet. Med.* **52**, 343-352.
- Lamka, J., Vondřejc, M., Klečáková, J. (1996) Effect of flubendazole on Muellerius capillaris in mouflon. *Vet. Med. (Czech)* **41**, 347-350.
- Lanusse, C.E. and Prichard, R.K. (1990) Pharmacokinetic behaviour of netobimin and its metabolites in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **13**, 170-178.

- Lanusse, C.E., Gascon, L.H., Prichard, R.K. (1993) Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following the administration of netobimin to cattle: Relationship with plasma disposition kinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **16**, 38-47.
- Lanusse, C.E., Nare, B., Gascon, L.H., Prichard, R.K. (1992) Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle. *Xenobiotica* **22**, 419-426.
- Lanusse, C.E., Nare, B., Prichard, R.K. (1993) Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. *Xenobiotica* **23**, 285-295.
- Lanusse, C.E., Trudeau, C., Ranjan, S., Prichard, P.K. (1991) Pharmacokinetic profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **14**, 101-108.
- Legato, M.J.L. (1997) Gender-specific physiology: How real is it? How important is it? *Int. J. Fertil.* **42**, 19-29.
- Lenton, L.M., Bygrave, F.L., Behm, C.A. (1996) *Fasciola hepatica* infection in sheep: changes in liver metabolism. *Res. Vet. Sci.* **61**, 152-156.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., Lanusse, C. Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *Vet. J.*, in press.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Mastromarino, M., Lanusse, C. (1997) Enhanced plasma availability of the metabolites of albendazole in fasted adult sheep. *Vet. Res. Commun.* **21**, 201-211.
- Lincová, D., Farghali, H. et al (2002) *Základní a aplikovaná farmakologie*. Karolinum-Galén, Praha.
- Machala, M., Neča, J., Drábek, P., Ulrich, R., Šabatová, V., Nezveda, K., Raszyk, J., Gajdušková, V. (1998) Effects of chronic exposure to PCBs on cytochrome P450 systems and steroidogenesis in liver and testis of bulls (*Bos taurus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **120**, 65-70.
- Machala, M., Nezveda, K., Petřivalský, M., Jarošová, A., Piačka, V., Svobodová, Z. (1997) Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquat. Toxicol.* **37**, 113-123.

- Machala, M., Souček, P., Neča, J., Ulrich, R., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. (2003) Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male ruminants. *Arch. Toxicol.* **77**, 555-560.
- Maté, L., Virkel, G., Lifschitz, A., Ballent, M., Lanusse, C. (2008) Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 773-783.
- McKellar, Q.A., Coop, R.L., Jackson, F. (1995) The pharmacokinetics of albendazole metabolites following administration of albendazole, albendazole sulfoxide and netobimin to one-month and eight-month-old sheep. *Int. J. Parasitol.* **25**, 1207-1212.
- McKellar, Q.A., Gokbulut, C., Muzandu, K., Benchaoui, J.L. (2002) Fenbendazole pharmacokinetics, metabolism and potentiation in horses. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 1230-1239.
- McKellar, Q.A., Jackson, F., Coop, R.L., Baggot, J.D. (1993) Plasma profiles of albendazole metabolites after administration of netobimin and albendazole in sheep: effect of parasitism and age. *Br. Vet. J.* **149**, 101-113.
- Merino, G., Molina, A.J., García, J.L., Pulido, M.M., Prieto, J.G., Alvarez, A.I. (2003) Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Int. J. Pharm.* **263**, 123-132.
- Mirfazaiana, A., Rouinia, M.R., Dadashzadehb, S. (2003) Time dependent pharmacokinetics of albendazole in human. *Biopharm. Drug Disp.* **24**, 199-204.
- Molina, A.J., Merino, G., Prieto, J.G., Real, R., Mendoza, G., Alvarez, A.I. (2007) Absorption and metabolism of albendazole after intestinal ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* **31**, 16-24.
- Moreno, L., Alvarez, L., Mottier, L., Virkel, G., Sanchez Bruni, S., Lanusse, C. (2004) Integrated pharmacological assessment of flubendazole potential for use in sheep: disposition kinetics, liver metabolism and parasite diffusion ability. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **27**, 299-308.
- Morley, N.J. (2009) Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **27**, 161-175.
- Mugford, C.A., Kedderis, G.L. (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug metab. Rev.* **30**, 441-498.
- Mugford, C.A., Kedderis, G.L. (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug metab. Rev.* **30**, 441-498.

- Murray, M. (1992) P450 enzymes. Inhibition mechanisms, genetic regulation and effect of liver disease. *Clin. Pharmacokinet.* **23**, 132-146.
- Ndong, T.B., Kane, Y., Diouf, E.H.M., Alvinier M. (2007) Ivermectin in Senegalese Peulh Sheep: Influence of Sex on Plasma Disposition. *Vet. Res. Commun.* **31**, 739-747.
- Nebbia, C. (2001) Biotransformation Enzymes as Determinants of Xenobiotic Toxicity in Domestic Animals. *Vet. J.* **161**, 238-252.
- Nekvindová, J., Anzenbacher, P. (2007) Interactions of food and dietary supplements with drug-metabolising cytochrome P450enzymes. *Ceska Slov. Farm.* **56**, 165-173.
- Nouws, J.F. (1992) Pharmacokinetic in immature animals: a review. *J. Anim. Sci.* **70**, 3627-3634.
- Pelkonen, O., Maenpaa, J., Taavitsainen, P., Rautio, A., Raunio, H. (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**, 1203-1253.
- Pérez, R., Palme, C., Araneda, M., Cabezas, I., Rubilar, L., Arboix, M. (2007) Gastrointestinal parasitism reduces the plasma availability of doramectin in lambs. *Vet. J.* **173**, 167-173.
- Quellette, M., Legare, D. (2003) Drug resistance mediated by ABC transporters in parasites of humans. In: Holland, I.B. (ed.) ABC proteins (pp.317-333). Academic Press, London.
- Renton, K.W. (2001) Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **92**, 147-163.
- Sallovitz, J., Lifshnitz, A., Imperiale, F., Pis, A., Virkel, G., Lanusse, C. (2002) Breed Differences on the Plasma Availability of Moxidectin Administered Pour-on to Calves. *Vet. J.* **164**, 47-53.
- Sánchez, S., Alvarez, L., Lanusse, C. (1997) Fasting-induced changes to the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **20**, 38-47.
- Sánchez, S., Alvarez, L., Pis, A., Quiroga, M., Lanusse, C. (1999) Differences in plasma and abomasal kinetics of albendazole and its metabolites in calves grazed on pasture or fed a grain-based diet. *Res. Vet. Sci.* **66**, 223-230.
- Sánchez, S., Alvarez, L., Sallovitz, J., Lanusse, C. (2000) Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **23**, 193-201.
- Sánchez-Campos, S., Tunón, M.J., Gonzáles, P., Campo, R., Ferreras, M.C., Manga, Y., Gonzáles-Galego, J. (1996) Effects of Experimental Dicrocoeliosis on Oxidative Drug Metabolism in Hamster Liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **115C**, 55-60.

- Schwark, W.S. (1992) Factors that affect drug disposition in food-producing animals during maturation. *J. Anim. Sci.* **70**, 3635-3645.
- Sibille, P., Calléja, C., Carreras, F., Bigot, K., Galtier, P., Boulard, C. (2000) *Fasciola hepatica*: Influence of Gender and Liver Biotransformations on Flukicide Treatment Efficacy of Rats Infested and Cured with Either Clorsulon/Ivermectin or Triclabendazole. *Exp. Parasitol.* **94**, 227-237.
- Sivapathasundaram, S., Sauer, M.J., Ioannides, C. (2003) Xenobiotic conjugation system in deer compared with cattle and rat. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **134**, 169-173.
- Skálová, L., Křížová, V., Cvilink, V., Szotáková, B., Štorkánová, L., Velík, J., Lamka, J. (2007) Mouflon (*Ovis musimon*) dicrocoeliosis: Effect of parasitosis on the activities of biotransformation enzymes and albendazole metabolism in liver. *Vet. Parasitol.* **146**, 254-262.
- Skálová, L., Szotáková, B., Machala, M., Neča, J., Souček, P., Havlasová, J., Wsól, V., Křídová, L., Kvasničková, E., Lamka, J. (2001) Effect of ivermectin on activities of cytochrome P450 isoenzymes in mouflon (*O<sub>is</sub> musimon*) and fallow deer (*Dama dama*). *Chem. Biol. Interact.* **137**, 155-167.
- Souček, P., Gut, I. (1992) Cytochromes P450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* **22**, 83-103.
- Taylor, S.M., Mallon, T.R., Blanchflower, W.J., Kennedy, D.G., Green, W.P. (1992) Effects of diet on plasma concentrations of oral anthelmintics for cattle and sheep. *Vet. Rec.* **28**, 264-268.
- Taylor, S.M., Mallon, T.R., Blanchflower, W.J., Kennedy, D.G., Hewitt, S.A. (1993) Effects of dietary variations on plasma concentrations of oral flukicides in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **16**, 48-54.
- Testa, B., Caldwell, J. (1995) The metabolism of drugs and other xenobiotics. Academic press, London.
- Testa, B., Krämer, S.D. (2006) The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction Part1.Principles and Overview. *Chem. Biodivers.* **3**, 1053-1101.
- Testa, B., Mayer, J.A. (2003) Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. VHCA&Wiley-VCH, Zürich.
- Toutain, P.L., Upson, D.W., Terhune, T.N., McKenzie, M.E. (1997) Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. *Vet. Parasitol.* **72**, 3-8.
- Turnheim, K. (2004) Drug therapy in the elderly. *Exp. Gerontol.* **39**, 1731-1738.

- Utrecht, J.P., Trager, W. (2007) Drug metabolism: Chemical and Enzymatic Aspects. Informa Healthcare, New York.
- Valles, B., Schiller, C.D., Coassolo, P., de Sousa, G., Rahmani, R. (1995) Metabolism of Mofarotene in hepatocytes and liver microsomes from different species. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1051-1057.
- Velík, J., Baliharová, V., Fink\_Gremmels, J., Bull, S., Lamka, J., Skálová, L. (2004a) Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Res. Vet. Sci.* **76**, 95-108.
- Velík, J., Baliharová, V., Skálová, L., Szotáková, B., Wsól, V., Lamka, J. (2003) Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **26**, 297-302.
- Velík, J., Baliharová, V., Skálová, L., Szotáková, B., Wsól, V., Lamka, J. (2005) Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **28**, 377-384.
- Velík, J., Szotáková, B., Baliharová, V., Lamka, J., Šavlík, M., Wsól, V., Šnejdrová, Skálová, L. (2004b) Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon (*Ovis musimon*). *Res. Vet. Sci.* **78**, 255-263.
- Vercruyse, J., Deprez, P., Everaert, D., Bassissi, F., Alvinierie, M. (2008) Breed differences in the pharmacokinetics of ivermectin administered subcutaneously to Holstein and Belgian Blue calves. *Vet. Parasitol.* **152**, 136-140.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Pis, A., Lanusse, C. (1999) Influence of diet on the pattern of gastrointestinal biotransformation of netobimin and albendazole sulphoxide in sheep. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 31-37.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Pis, A., Lanusse, C. (2002) In vitro biotransformation of benzimidazole sulphoxide anthelmintics: enantioselective sulphoreduction in sheep and cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **25**, 15-23.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Ballent, M., Scarcella, S., Lanusse, C. (2009) Inhibition of cytochrome P450 activity enhances the systemic availability of triclabendazole metabolites in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **32**, 79-86.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Pis, A., Lanusse, C. E. (2004) Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulfoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 536-544.



Witkamp, R.F., Lohuis, J.A.C.M., Nijmeijer, S.M, Kolker, H.J., Noordhoek, J., van Miert, A.S.J.P.A.M. (1991) Species- and sex-related differences in the plasma clearance and metabolite formation of antipyrine. A comparative study in four animal species: cattle, goat, rat and rabbit. *Xenobiotika* 21, 1483-1492.

Wynne, H. (2005) Drug metabolism and ageing. *J. Br. Menopause Soc.* **11**, 51-56.