

I.

ÚVOD

V průběhu milionů let vývoje živočišných druhů ztratily mnohé nižší druhy schopnost samostatného vývoje bez přítomnosti jedince jiného druhu, často fylogeneticky velmi vzdáleného. V živočišné říši tak nalézáme vztahy symbiotické či parazitické. Společné soužití druhů ale nebylo ničím novým, vyvinulo se i v rostlinné říši. Že parazitický vztah nebyl, alespoň z pohledu parazita, slepou uličkou vývoje, je jasné z ohromné šíře známých parazitických druhů a frekvence jejich výskytu. Prakticky každý obratlovec může být infikován více či méně specifickým parazitickým druhem, člověk není v tomto směru výjimkou. S problémem parazitů je spojena jeho historie i přítomnost, vztah člověka a parazitů je možno rozdělit do dvou rovin. Do první lze zařadit druhy parazitující přímo na člověku, do druhé pak druhy parazitující na druzích člověkem chovaných, tj. na hospodářských, domácích ale i volně žijících zvířatech. Výjimečnou skupinou jsou druhy se schopností parazitovat na člověku i jemu blízkých zvířatech. Důležitým faktorem vztahu parazita a hostitele je jednostranný prospěch parazita, bez profitu hostitele. Parazit je pro hostitele problém, který může vést až ke smrti jedince a tak snahy o kontrolu parazitóz (tj. zabití či vypuzení parazita) jsou s člověkem spjaty odedávna. Druhy parazitující na zvířatech, zvláště na druzích chovaných pro hospodářský užitek, představují ekonomický a etický problém. Z ekonomického hlediska může probíhající parazitóza způsobit úhyn zvířete, pokles produkce, snížení reprodukčních schopností, či znehodnocení produktů. Etické hledisko představuje diskomfort člověka a zásah do welfare zvířete.

S rozvojem moderní společnosti, zdravotně hygienickými návyky a pokrokem v možnostech léčby se v průběhu konce 20. století postupně ve vyspělých zemích podstatně snížil absolutní výskyt onemocnění lidí působených parazity i spektrum druhů. Dodnes se v těchto společnostech šířeji vyskytuje pouze několik málo druhů a mnoho z nás se s onemocněním této kategorie prakticky nesetká. Logickým důsledkem je velmi malá preskripce antiparazitik v humánní medicíně. Diametrálně rozdílná je situace ve státech

tzv. třetího světa, kde dlouhodobá celková zaostalost společnosti, specifické přírodní podmínky a zejména špatné hygienické návyky umožňují šíření mnohých parazitóz. Snahy WHO o zlepšení zdravotní situace v těchto státech se zabývají i touto problematikou. V civilizovaném světě se ale objevuje i paradoxní situace, kdy se zde začínají objevovat dříve neznámé parazitózy zavlečené sem díky intenzivnímu turismu a celosvětové migraci.

V oblasti veterinární medicíny, a zde již bez regionálního omezení, stojí problematika parazitóz na zcela opačném pólu. Výskyt a související léčba parazitárních onemocnění zvířat je zde zcela pravidelným jevem a to u takřka všech chovaných druhů bez rozdílu v zaměření chovu. Antiparazitika lze proto ve veterinární medicíně považovat za jedny z nejčastěji využívaných léčiv. To lze dokumentovat i současnou realitou českých lékáren, kde antiparazitika psů a koček pravidelně a často i osamoceně zastupují kategorii veterinaria. Celosvětově jsou antiparazitiky každoročně preventivně i cíleně léčeny miliony kusů ovcí, koz, hovězího dobytka a jiných hospodářských zvířat. Toto masové užívání vyústilo v mnoha případech ke snížení účinnosti používaných antiparazitik následkem vzniku rezistence. Nastalá situace vyžaduje nové terapeutické přístupy, či zavádění nových, účinnějších léčiv.

Svou roli ve spotřebě veterinárních léčiv, antiparazitika nevyjímaje, hrají stále vyšší požadavky na kvalitu a nezávadnost živočišných produktů. Tyto požadavky používání léčiv omezují a nutí veterináře nalézat a používat optimální postupy léčení, či využívat alternativní nefarmakologické postupy. Jedině takto je možné účinně kontrolovat výskyt parazitóz a zároveň naplnit zdravotně hygienické limity nezávadnosti produktů.

Objev thiabendazolu v 70. letech 20. století znamenal vznik dodnes velmi populární skupiny benzimidazolových anthelmintik. Společným znakem léčiv této skupiny je široké anthelmintické spektrum účinnosti, dobrá snášenlivost hostitelských druhů, jednoduchá aplikace a široký terapeutický index. Hlavně pro tyto vlastnosti patří benzimidazolová anthelmintika historicky i dnes k nejpoužívanějším antiparazitikům a to v rámci humánní i veterinární farmakoterapie. Do současnosti se do praxe dostalo více jak deset různých derivátů lišících se substitucí benzimidazolového kruhu, která ovlivňuje více farmakokinetiku než spektrum účinku. Za dlouhodobě nejpoužívanější deriváty můžeme považovat albendazol, mebendazol a thiabendazol.

Albendazol byl poprvé zaveden do praxe v 80. letech jako anthelmintikum humánní i veterinární praxe. Je velmi oblíben zejména pro svůj obzvláště široký terapeutický index, protože je ve veterinární medicíně předurčen i k hromadnému použití cestou medikovaného krmiva. Pro individuální použití je dostupný v tabletách a suspenzi. Je široce používán i u kategorie zvířat produkujících živočišné suroviny, u mnohých z nich byly také stanoveny některé farmakokinetické parametry. Ze závěrů dostupných studií jsou patrné klinické rozdíly u hlavních druhů hospodářských zvířat (ovce, skot, prase, koza), nálezy jsou pak zohledněny mj. v odlišném dávkování léčiva. Obdobné studie byly provedeny i pro člověka, psa a potkana. Autoři studií vysvětlují rozdílnou farmakokinetiku mezi druhy rozdíly v uspořádání trávicího traktu ovlivňující absorpci a v rozdílné biotransformační kapacitě jater, dominantního orgánu metabolické přeměny albendazolu. Mimo zmíněné druhy je jeho použití praktikováno i u přežvýkavců náležících do kategorie spárkatá zvěř, která zároveň v posledních několika desetiletích vytvořila novou kategorii hospodářských zvířat (tzv. jelenovití). Ačkoliv u těchto druhů byla účinnost benzimidazolů proti rozličným parazitózám opakovaně potvrzena, neexistují u těchto druhů studie popisující jeho farmakokinetiku. Cílem našich studií proto bylo otevřít tuto problematiku a to se zaměřením v první řadě na poznání biotransformace albendazolu u výše zmíněných živočišných druhů. V průběhu dalších studií jsme začali také studovat vliv podávání albendazolu na aktivitu biotransformačních enzymů. Hlavním cílem všech našich aktivit v této oblasti bylo detailnější poznání farmakokinetických parametrů týkajících se albendazolu, která bychom mohli dále využít ve prospěch účinnější farmakoterapie zvířat, respektující aktuálně i tak závažnou problematiku, jakou je helmintorezistence.

II.

TEORIE

II.1.

Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazoly a pro- benzimidazoly jsou široce užívaná anthelmintika humánní i veterinární medicíny. Jak název celé skupiny napovídá, jde o látky v jejichž molekule je přítomná základní planární struktura benzimidazolu, v případě pro-benzimidazolů k její tvorbě dochází až v organismu. Po objevu thiabendazolu v roce 1961, bylo syntetizováno několik tisíc látek obdobné struktury, nicméně ne více než deset se jich dočkalo komerčního využití. Struktura benzimidazolu zahrnuje bicyklický kruh, kde je benzen připojen v pozici 4 a 5 heterocyklu imidazolu. Rozdílnou substitucí v poloze 2 a 5 byly získány deriváty s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a farmakokinetikou (Lanusse a Prichard 1993). Farmakodynamika benzimidazolů je prakticky stejná u všech derivátů. Spočívá hlavně ve vazbě na β -tubulin s následnou blokadou polymerizace tubulinu, po němž dochází k rozkladu vnitřního uspořádání buněk parazita. Byla též pozorována inhibice transmembránového přenosu elektronů, resultující v porušení energetické balance ATP/ADP, ovlivnění energetického metabolismu parazita a následné smrti (Lacey, 1990; McCracken a Stillwell, 1991; Solana a kol., 1998). Za nízkou toxicitu benzimidazolů je odpovědná až 1000× vyšší afinita k parazitárnímu tubulinu, než tubulinu savčímu. S pozměněnou strukturou molekul tubulinu parazita souvisí pravděpodobně i vznik rezistence (Lanusse a Prichard 1993, Frayha a kol., 1997), prakticky se již vyskytující u několika parazitických druhů, např. *Taenia colubriformis* (Chartier a kol., 1998), *Haemonchus contortus* (Lacey 1986).

Dle struktury se benzimidazoly rozdělují do čtyř skupin (tab. 1, dle Lanusse a Prichard 1993):

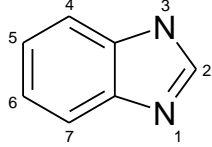
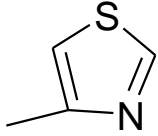
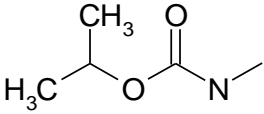
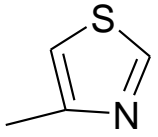
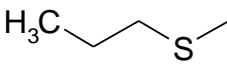
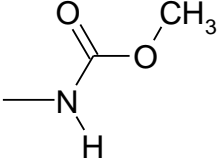
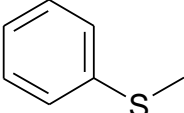
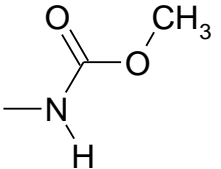
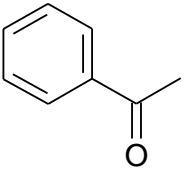
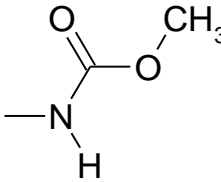
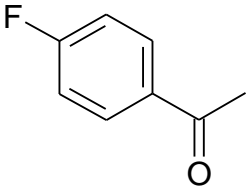
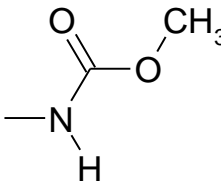
A. benzimidazol thiazoly (thiabendazol a kambendazol),

- B. benzimidazol methylkarbamáty (parbendazol, mebendazol, flubendazol, cyklobendazol, oxybendazol, luxabendazol, albendazol, rikobendazol, fenbendazol, oxfendazol),
- C. halogenované benzimidazol thioly (triklabendazol, luxabendazol),
- D. pro-benzimidazoly (thiofanát, febantel, netobimin).

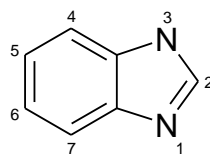
Benzimidazoly jsou bílé krystalické látky s vysokým bodem tání a jsou obecně velmi špatně rozpustné ve vodě. Látky bez substituce na dusíku imidazolového kruhu jsou amfotery. Nízká rozpustnost ve vodě a s tím související špatná absorpce těchto látek ze zažívacího traktu je důležitý limitující faktor pro technologické zpracování lékové formy, biologickou dostupnost a s tím související klinickou účinnosti benzimidazolů, obzvláště pak proti parazitům lokalizovaným mimo zažívací trakt. Se snahou odstranit tyto překážky byly syntetizovány pro-benzimidazoly. Tato pro-léčiva jsou sama farmakologicky neúčinná. Po orálním podání jsou enzymaticky (nejčastěji za účasti střevních bakterií, nikoliv enzymů hostitele) transformovány na účinné metabolity, vesměs již známé benzimidazoly. Anthelminticky aktivním metabolitem thiofanátu je lobendazol, febantelu fenbendazol a netobiminu albendazol. Dobrá rozpustnost pro-benzimidazolů sice umožnila vývoj nových lékových forem a způsobů aplikace, prakticky však nedosáhly vyšší účinnosti než klasické benzimidazoly.

Tab. 1:

Anthelminticky účinné benzimidazoly a pro-benzimidazoly:

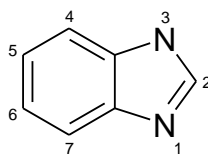
Benzimidazol		
		
Derivát	Substituence	
	Pozice 5	Pozice 2
thiabendazol	H	
cambendazol		
albendazol		
fenbendazol		
mebendazol		
flubendazol		

Benzimidazol



Derivát	Substituče	
	Pozice 5	Pozice 2
parbendazol		
cyklobendazol		
oxybendazol		
luxabendazol		
rikobendazol (albendazol sulfoxid)		
oxfendazol		

Benzimidazol



Derivát	Substituće	
	Pozice 5	Pozice 2
triklabendazol		
lobendazol		
thiofanát		
febantel		
netobimin		

Při studiu závislosti struktury a účinku bylo prokázáno, že základní struktura benzimidazolu spolu s vhodnou substitucí v poloze 2 je rozhodující pro vazbu k β -tubulinu. Nahrazení dusíku v heterocyklu jiným atomem (kyslík, síra, uhlík) silně snižuje vazebnost na β -tubulin a tím i anthelmintickou účinnost.

Optimální substituce v poloze 2 dává tomuto regionu velikost, polaritu a dipólový moment umožňující interakci s vazebným místem β -tubulinu. Právě substituce 2-thiazolem- (např. u thiabendazolu) a 2-methylkarbamátem (např. u albendazolu) představují geometricky a elektronově podobné struktury vhodné pro tuto interakci. Jiná 2-substituce a látky bez substituce dosahují nižší nebo žádné účinnosti. Substituce na dusíku heterocyklu také snižuje vazebnost a je terapeuticky nevhodná. Z možných substitucí na benzenovém jádře se prakticky uplatnily látky s 5-substituenty. Tato substituce pouze modifikuje intenzitu interakce a mění fyzikálně-chemické vlastnosti látky odrážející se v její farmakokinetice. Vzájemná konformace rovin benzimidazolového cyklu a 5-substituentu je ideální pokud je synplanární, koplanární uspořádání je méně výhodné (McCracken a Lipkowitz 1990). Vysoce účinné jsou zejména benzimidazoly obsahující síru v 5-substituentu (albendazol, rikobendazol, fenbendazol, oxfendazol). Substitucí halogeny, například ve flubendazolu a triklabendazolu, nebylo dosaženo výrazného zvýšení účinnosti. V současné době je pro veterinární použití v České republice registrováno 8 lékových forem 7 různých benzimidazolů a 1 pro-benzimidazolu, celkem zahrnujících 35 registrovaných přípravků. Pro srovnání, pro podání člověku jsou v ČR registrovány pouze mebendazol (Vermox®) a albendazol (Zentel®) ve třech lékových formách. Takřka identické spektrum účinných látek skupiny benzimidazolových anthelmintik lze nalézt i v zahraničních lékopisech, pro ilustraci britský veterinární lékopis z roku 2001 (Jacobs a Taylor 2001) zahrnuje 8 benzimidazolů a 3 pro-benzimidazoly v celkem 78 léčivých přípravcích.

V posledních letech byl odhalena schopnost mnoha látek obsahujících benzimidazolovou strukturu indukovat jaterní enzymy. Toto bylo potvrzeno *in vitro* i *in vivo* a to nejen u benzimidazolových anthelmintik, ale i u některých inhibitorů protonové pumpy, jako omeprazolu, pantoprazolu a lansoprazolu. V humánní farmakologii existují i důkazy o klinickém dopadu indukce cytochromů způsobené inhibitory protonové pumpy. V případě albendazolu i obecně

benzimidazolových anthelmintik, jsou velmi často laboratorně prokázané indukční schopnosti *in vitro*, *in vivo* studie či klinické dopady indukce nebyly v oblasti veterinárního výzkumu studovanou kapitolou a o tomto fenoménu existuje jen několik málo prací. Po vytvoření rešeršní práce na toto téma (Velík a kol., 2004 - příloha 3) jsme se rozhodli studovat tento problém hlouběji i v rámci druhů, u kterých je albendazol prakticky využíván a ne pouze u laboratorních zvířat a jiných *in vitro* modelech.

II.2.

Albendazol a jeho farmakokinetika

Albendazol je typickým představitelem benzimidazolů ze skupiny methylkarbamátů se sírou v 5-substituentu. Jeho účinek je spojen s vazbou na β -tubulin parazita, rozkladem vnitřního uspořádání buňky a narušením energetického metabolismu. Patří mezi neúčinnější a také mezi nejpoužívanější anthelmintika jak ve veterinární tak i v humánní farmakoterapii. Ve veterinární medicíně je využíván jako širokospektré anthelmintikum hlavně přežvýkavců s dobrou účinností proti plicní a střevní červivosti, tasemnicím a částečně i proti motolicím. Albendazol i jeho aktivní metabolit – albendazol sulfoxid (též známý jako rikobendazol) jsou účinné proti dospělým jedincům i většině vývojových stadií včetně vajíček červů (Dayan 2003). Je využíván k léčbě i profylaktickému podání. V humánní medicíně je lékem používaným při echinokokóze, cysticerkóze, askarióze, enterobióze, trichostrongylóze, trichuróze, kapilarióze, ancylostomiáze, necatoróze a filarióze.

Albendazol je bílá krystalická látka velmi špatně rozpustná ve vodě, lépe v chloroformu, dimethyl sulfoxidu a 1 M kyselině chlorovodíkové. Albendazol má amfoterní charakter s hodnotami pKa 10,26 a 2,8 což značí, že je prakticky v celé pasáži gastrointestinálního traktu v neionizované formě a tudíž může rozpuštěný dobře prostupovat do systémové cirkulace. Vazba na proteiny krevní plasmy je vysoká (nad 80 %, Jung a kol. 1998). Zmíněné fyzikálně-chemické vlastnosti předurčují podání albendazolu ve formě suspenze, pasty a granulátu pro orální nebo intraruminální podání. Mimo tyto nejběžnější lékové formy se můžeme setkat i s tabletami (humánní terapie) a zejména pro vědecké účely byly připraveny i preparáty pro parenterální podání (Rodrigues a

kol., 1995; Cristofol a kol., 2000). Prakticky se uplatnily i systémy umožňující dlouhodobé uvolňování léčiva v těle zvířete až po dobu stovek dnů (Delatour a kol., 1990a; Chartier a kol., 1996). Ač prakticky používané, pro možnost vzniku rezistence a enzymatické indukce (viz. níže) lze považovat tento způsob aplikace za méně vhodný a z dnešního pohledu překonaný. V souvislosti s albendazolem je nutné se zmínit o guanidinovém derivátu netobiminu (tab. 1, obr.1), který je jeho proléčivem (Delatour a kol., 1986). Ve formě soli je velmi dobře rozpustný ve vodě a umožňuje snadnější přípravu roztoků pro enterální i parenterální použití, případně jako zwitteriont ve formě suspenze. Netobimin postrádá vlastní antiparazitární účinnost, za účinek je odpovědný jeho první i druhý metabolit tj. albendazol a albendazol sulfoxid. K přeměně netobiminu na albendazol je nutná účast střevních bakterií, proto ač je možné, nemá jeho parenterální podání praktické opodstatnění (Lanusse a Prichard 1990, Benchaoui a kol., 1993; Lanusse a kol., 1993a).

Albendazol je po orálním podání absorbován v gastrointestinálním traktu. Svou roli v této fázi hrají vlastnosti látky - liposolubilita, ionizovanost a rozpustnost. Jelikož musí nejprve dojít k rozpuštění podaného léčiva, příprava a zpracování amorfní či krystalické formy albendazolu a technologie výroby finální lékové formy hrají jednu z klíčových rolí při absorpci léčiva (Dressman a Reppas 2000). Silný vliv na absorpci má i celkové uspořádání trávicího ústrojí různých živočišných druhů, pH jeho jednotlivých částí a složení potravy (Virkel a kol., 1999). Obecně lze říci, že nižší celkový objem žaludku a střev a rychlejší pasáž obsahu zažívacího traktu snižuje biologickou dostupnost u monogastrických druhů včetně člověka. Naopak u polygastrických zvířat větší obsažnost celého zažívacího traktu a obzvláště předžaludku představuje depo pro pozvolnější, a tudíž i pro dokonalejší absorpci podaného léčiva. Nadto je většina benzimidazolů, včetně albendazolu, v prostředí batoru lépe rozpustná než v kaudálnějším partiích zažívacího traktu. Tyto nalezené závislosti jsou dnes prakticky využívány formou cíleného intraruminálního podání léčiva, což zvyšuje jeho biologickou dostupnost oproti orálnímu podání. Potvrdilo to i srovnání orálního a intraruminálního podání albendazolu ovci, kde AUC (area under curve, plocha pod křivkou závislosti plasmatické koncentrace v čase) albendazol sulfoxidu byla o 36% vyšší po intraruminálním podání (Swarnkar a kol., 1998). Studium vlivu potravy na biologickou dostupnost bylo zjištěno, že

kinetické parametry mohou být ovlivněné složením potravy (suchá dieta, čerstvá krmná směs, průmyslová směs) i hladověním (Virkel a kol., 2000; Sanchez a kol., 1996, 1997, 2000; Singh a kol., 1999). U člověka je doporučováno doprovázet aplikaci albendazolu mastným jídlem. Farmakokinetické parametry mohou být modifikovány také pohlavím, věkem a přítomností infekce (McKellar a kol., 1993, 1995; Alvarez a kol., 1996; Galtier a Alvinerie 1996; Lifschitz a kol., 1997; Cristofol a kol., 1998; Capece a kol., 2000). Prvotní studie sledující vliv transportérových proteinů ve střevní stěně na absorpci albendazolu naznačují, že albendazol není substrátem těchto přenašečů, prostup střevní stěnou lze popsat kinetikou nultého řádu (Merino a kol., 2002).

Poté co parentní látka překoná lipidovou dvojvrstvu epitelu, je částečně již zde, v tenkém střevě (Lawrenz a kol., 1992; Villaverde a kol., 1995; Redondo a kol., 1999), metabolizována na aktivní metabolit – albendazol sulfoxid (albendazol má vlastní anthelmintickou aktivitu, která se uplatňuje proti parazitům lokalizovaným v zažívacím traktu, za účinek proti parazitům lokalizovaným jinde v organismu hostitele je odpovědný albendazol sulfoxid). Celkově je biologická dostupnost malá, nepřesahuje 10% u člověka, 30% u myši a 50% u polygastrických druhů zvířat (Dayan 2003). Albendazol společně s albendazol sulfoxidem jsou pak transportovány do jater, kde je zbylé množství albendazolu takřka zcela přeměněno na albendazol sulfoxid (first pass effect). Tato rychlá přeměna je dokumentována pouze krátkodobou limitní přítomností albendazolu v plasmě po jeho orálním i parenterálním podání. Albendazol sulfoxid je stejně jako albendazol amfoterní látkou s pK_a 9,79 a 0,2. Ve vodě je lépe rozpustný než albendazol, na proteiny plasmy se váže z 65 %. V dalších krocích dochází k přeměnám albendazol sulfoxidu na neaktivní metabolity, z nichž hlavním je albendazol sulfon (obr. 1). Dále může docházet k hydrolyze karbamátové vazby nebo k hydroxylaci alifatické i aromatické části molekuly albendazolu. Vzniklé minoritní metabolity jsou exkretovány ve volné formě, či konjugované s kyselinou sírovou nebo glukuronovou (Gyurika kol., 1981). Kromě jater byla metabolická aktivita dokumentována i ve střevní stěně, plicích a v ledvinách (Virkel a kol., 2004), pouze ve střevě byla zatím dokumentována i zpětná sulforedukce albendazol sulfoxidu (Virkel a kol., 2002). Do schématu je zahrnuta i přeměna proléčiva netobiminu na albendazol.

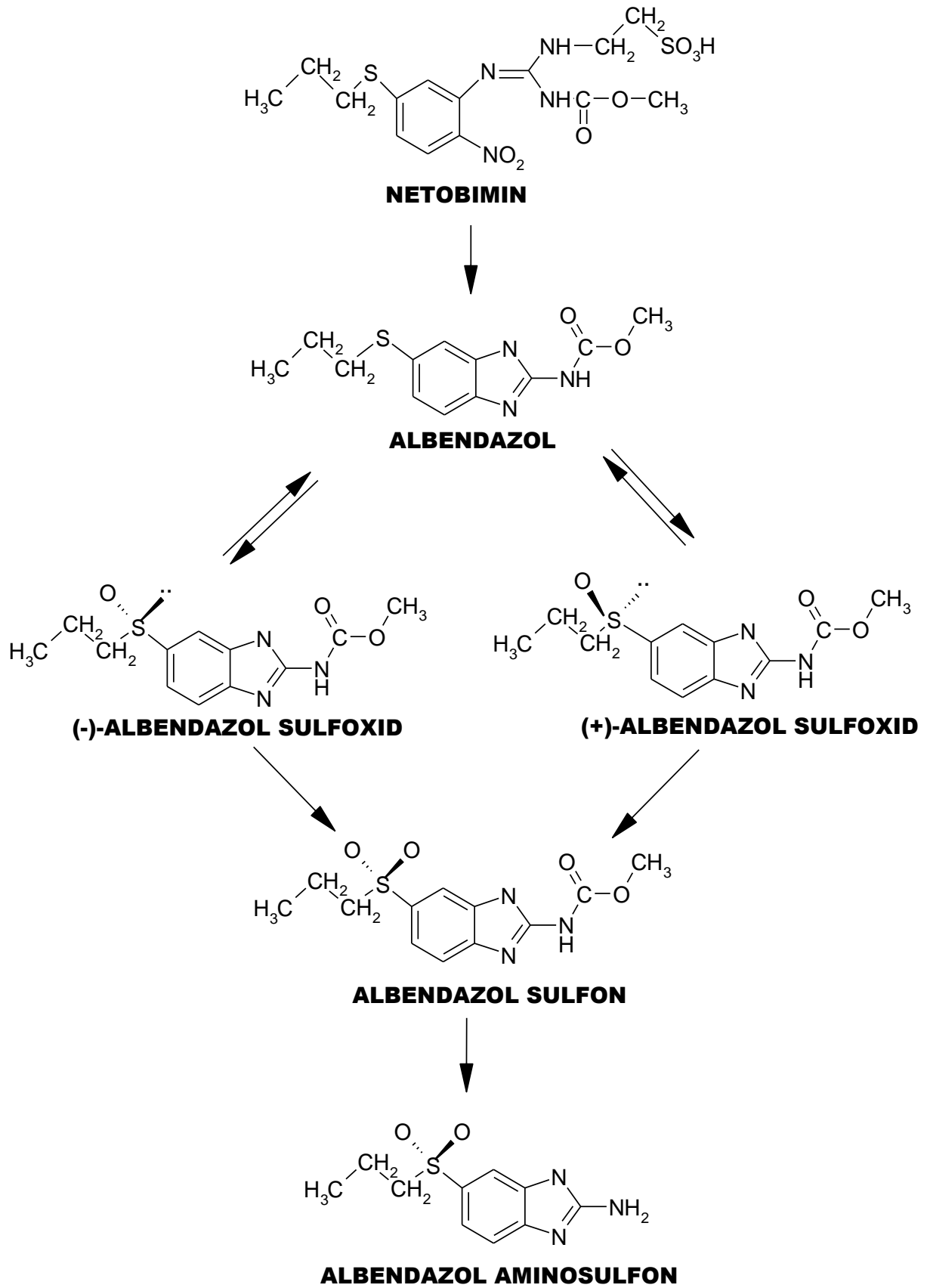
V pravém slova smyslu lze i albendazol chápat jako proléčivo rikobendazolu (albendazol sulfoxidu).

Díky přítomnosti chirálního atomu síry v molekule albendazol sulfoxidu, nelze tuto sloučeninu považovat za chemickou entitu, ale musíme uvažovat o dvou rozdílných látkách (obr. 1). Obecně se zastoupení jednotlivých optických forem uvádí ve formě procentického zastoupení jednotlivých enantiomerů, nebo v poměru koncentrací (+)/(-)-albendazol sulfoxidu. Též v případě podávání rikobendazolu může hrát roli, zda jde o racemickou směs, či směs s nevyrovnaným obsahem antipodů. Farmakodynamika jednotlivých antipodů je dodnes nepoznána. Prvotní domněnka, zakládající se ponejvíce na farmakokinetice, favorizovala (+)-formu a to hlavně pro její delší biologický poločas u hospodářských zvířat a člověka. První z prací studující *ex vivo* účinnost jednotlivých forem albendazol sulfoxidu proti druhu *Trichinella spiralis* dokumentovala vyšší účinnost (+)-albendazol sulfoxidu (Bolas-Fernandez a kol., 2004). Za zmínku stojí i dokumentovaná schopnost parazitických druhů *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa* a *Ascaris suum* metabolizovat albendazol na albendazol sulfoxid, navíc u druhu *M. expansa* byla odhalena i schopnost zpětné redukce albendazol sulfoxidu (Solana a kol., 2001). U stejných druhů byla také autory dokumentována rozdílná vazebnost jednotlivých enantiomerů albendazol sulfoxidu na tubulární proteiny parazita (Alvarez a kol., 2001; Solana a kol., 2001, 2002). Ačkoliv v úvodních studiích popisujících farmakokinetiku albendazolu nebyl fakt chiralitity albendazol sulfoxidu brán v úvahu (pravděpodobně díky obtížné separaci a detekci), studie z posledních let se většinou již neobejdou bez chirálního stanovení tohoto metabolitu. Bylo zjištěno, že sulfoxidace albendazolu, katalyzovaná za účasti mikrosomálních monooxygenás cytochromu P450 (CYP450) a flavinových monooxygenás (FMO), je stereospecifická pro jednotlivé systémy. Zdá se, že CYP450 (isoformy 1A1, 3A4, 2C6) vytvářejí přednostně (-)-albendazol sulfoxid, zatímco FMO (+)-albendazol sulfoxid (Fargetton a kol., 1986; Souhaily el-Amri a kol., 1987; Moroni a kol., 1995; Rawden a kol., 2000; Solana a kol., 2000). Další hlavní metabolický krok, sulfoxidace albendazol sulfoxidu, je převážně katalyzována CYP450 (Souhaily el-Amri a kol., 1988), stereoselektivita této reakce není dodnes plně objasněna. Následně může docházet k hydrolyze

karbamátové vazby (albendazol aminosulfon) nebo k hydroxylaci aromatické i alifatické části molekuly (Hennessy a kol., 1989).

Albendazol sulfoxid, sulfon a další metabolity, včetně konjugovaných s kyselinou glukuronovou a sírovou, jsou vylučovány močí a žlučí. U člověka byla odhalena stereoselektivita v exkreci močí, která se může podílet na akumulaci (+)-albendazol sulfoxidu v plasmě (Lanchote a kol., 2004). Frakce albendazol sulfoxidu exkretovaná do žluče může podléhat přímému enterohepatálnímu oběhu nebo může docházet k jeho zpětné redukci na albendazol a opětovnému přechodu do systémové cirkulace (Lanusse a kol., 1992). Díky rozdílnému pH plasmy, předžaludku a žaludku přežvýkavců dochází k vychytávání albendazol sulfoxidu a sulfonu v prostředí s pH, kde jsou tyto látky více ionizovány (iontrapping). Tento fenomén vysvětluje přítomnost vysokých koncentrací metabolitů v bachoru i po parenterálním podání netobiminu, albendazolu i rikobendazolu.

Obr. 1
Metabolická dráha netobiminu a
albendazolu



Je přirozené, že nejprostudovanější farmakokinetiku má albendazol u druhů, u kterých je albendazol nejčastěji používán, tedy u ovce, kozy a skotu. Známa je též kinetika u potkana, prasete, psa a člověka. V rámci hospodářských druhů je možno kinetiku albendazolu dobře porovnat. Ve studii provedené Delatourem a kol. (1991b) byly porovnávány farmakokinetické parametry po orálním podání albendazolu v terapeutické dávce 5 mg/kg ž. hm. ovci, 7,5 mg/kg ž.hm. koze a 10,0 ž.hm. mg/kg skotu (tj. doporučené terapeutické dávky pro jednotlivé druhy). AUC sumy enantiomerů albendazol sulfoxidu byla u ovce 7,5; kozy 5,8 a u skotu 1,3. AUC albendazol sulfonu byla u ovce 2,3; kozy 3,3 a u skotu 2,4. U skotu však byla pozorována nejvyšší C_{max} pro albendazol sulfon. Pomocí ^{14}C značeného albendazolu podanému ovci a koze bylo zjištěno, že albendazol sulfoxid a sulfon dohromady tvoří minimálně 95% všech metabolitů zachycených v plasmě (Delatour a kol., 1993). C_{max} a AUC albendazol sulfoxidu a sumy metabolitů bylo signifikantně nižší u kozy v porovnání s ovci. Zastoupení enantiomerů albendazol sulfoxidu se mezi druhy také liší. Z dosavadních zdrojů lze vyčíst, že všechny doposud studované druhy vytvářejí vyšší plasmatické hladiny (+) enantiomeru (ovce 86%, koza 80%, skot 91%, člověk 80-90%, pes 70%), s výjimkou potkana, u kterého frakce (+)-albendazol sulfoxidu představovala pouze 41% (Delatour a kol., 1990, 1991a, b; Marques a kol., 1999). Zmíněná výjimečnost potkana znehodnocuje výsledky předchozích studií a omezuje interpolaci výsledků takto získaných na situaci po podání člověku i hospodářským zvířatům. Podobně je těžké vyslovovat závěry z *in vitro* studií na buněčných liniích a kulturách hepatocytů laboratorních zvířat, či přímo na hlodavcích. Ty opakovaně potvrdily, že albendazol je schopen indukovat jaterní CYP450, zejména pak CYP450 1A1/2 izoformu (Bapiro a kol., 2002). Tento izoenzym je pravděpodobně odpovědný za sulfonaci albendazol sulfoxidu (deaktivační krok biotransformace) a tudíž albendazol může ovlivňovat nejen metabolismus jiných léčiv a xenobiotik, ale i svůj vlastní (Galtier 1991). Prakticky lze známky indukce nalézt v pracích popisujících farmakokinetiku albendazolu po opakovaném podání, či po aplikaci systémů s dlouhodobým uvolňováním. Ve studii Gotschall a kol. (1990) a Benoit a kol. (1992) bylo pozorováno zrychlení biodegradace albendazol sulfoxidu z plasmy skotu a ovce již po trojnásobném podání albendazolu. Při dlouhodobém přísunu albendazolu intraruminálním

insertem uvolňujícím albendazol po dobu až 100 dní (Delatour a kol., 1990) se zásadně mění poměr metabolitů albendazol sulfoxidu oproti sulfonu ve prospěch druhého, což bylo také autorem vysvětleno indukčním mechanismem. Je zajímavé, že ke zmíněné situaci došlo pouze u skotu, nikoliv u ovce. Je všeobecně přijímané, že indukce je druhově specifická, proto i naše další studie vedla směrem poznání této závažné interakci léčiva a organismu z cílového species, a to *in vitro* i *in vivo* (viz níže).

Pro detekci a stanovení albendazolu, jeho metabolitů, či reziduí v potravinách bylo vypracováno několik chromatografických metod. Tyto postupy využívají metod kapilární elektroforézy a častěji HPLC (high performance liquid chromatography) se spektrofotometrickou, fluorimetrickou a spolu s technickým pokrokem i hmotnostní (MS-mass spektrofotometry) detekcí. K rozdělení se využívá běžně dostupných C18 chromatografických kolon a reverzních fází. Větší problém spočívá v chirálním stanovení metabolitu albendazol sulfoxidu. Doposud byly prakticky použity pouze dvě chirální fáze schopné oddělit jednotlivé enantiomery, z nichž je celosvětově nejčastěji využívána AGP (α -glykoprotein) chromatografická kolona. My jsme pro naše stanovení upravili metodu stanovení dle Delatoura a kol. (1990). Podrobný popis metody je zahrnut v příslušných článcích.

II.3

Využití albendazolu v humánní farmakoterapii

Albendazol byl od roku 1982 postupně zaveden do většiny světových lékopisů, včetně Martindale, USP a našeho. Jako širokospektré anthelmintikum využitelné v terapii echinokokózy, cysticerkózy, askariózy, enterobiózy, trichostrongylózy, trichuriózy, kapilariózy, ancylostomiázy, necatorózy a filariózy je dostupný nejčastěji ve formě tablet. Jsou známy základní parametry biotransformace albendazolu, dokumentující podobný charakter metabolických přeměn pozorovaných u hospodářských a laboratorních druhů zvířat (Penicaut a kol., 1983; Marriner a kol., 1986; Mirfazaelian a kol., 2003)(obr. 1). Je dokumentována nízká biologická dostupnost, hlavními metabolity jsou albendazol sulfoxid a albendazol sulfon. AUC albendazol sulfoxidu připadá ze 70% na (+)-enantiomer. Hlubší zájem o studium farmakokinetiky, pozorovaný

ve veterinární problematice, nebyl zaznamenán. Dvě desetiletí zkušeností s tímto léčivem charakterizují albendazol jako účinné a bezpečné antiparazitikum (Dayan 2003).

II.4.

Využití albendazolu ve veterinární farmakoterapii

Přihlédneme-li ke spotřebě anthelmintik celkově, benzimidazolů i albendazolu, je jasná převaha veterinárního využití oproti humánní medicíně. Pokud se chceme zabývat farmakokinetikou a metabolismem z pohledu veterinární problematiky, je na prvním místě nutné si uvědomit specifika a šíři tohoto oboru. Základní rozdíl tkví v množství druhů podléhajících léčbě a studiu. Od makroskopicky patrných rozdílů ve fyziologii zvířecích druhů, potravní specifitě, rozdílné fyziologii trávicího traktu i jiných struktur, přes rozdílnou tělesnou teplotu, parametry krevního oběhu, jsou rozdíly i ve strukturách, funkcích a aktivitě membránových struktur, jednotlivých enzymů, či enzymových systémů (včetně hlavních systémů metabolismu xenobiotik). Tak, jak je tomu v humánní farmakologii, tak i v oblasti veterinární by bylo ideální dokonalé poznání vztahu dávky a účinku u všech druhů, což by umožnilo volbu adekvátní dávky i dávkovacího schématu. Realita je však jiná.

Prakticky je poznání farmakokinetiky a využití albendazolu u jednotlivých skupin a druhů veterinárních zvířat různé.

Skupina zvířat zájmových chovů psů, koček a jiných drobných domácích zvířat je poměrně nepodstatná. Ačkoliv u psa byla biotransformace, včetně jejich chirálních aspektů, popsána, není prakticky albendazol u této skupiny používán.

U prasete, podobně jako u psa, byla farmakokinetika stanovena spíše z pohledu prasete jako laboratorního druhu, prakticky jsou v chovech využívány jiné benzimidazoly (flubendazol, fenbendazol).

U ptáků je jen málo literárních zdrojů týkajících se albendazolu. Dvě práce shledaly albendazol účinným antiparazitikem (Zhang a kol., 1984; Rong a kol., 1989), třetí práce se zaměřila na studium farmakokinetiky u drůbeže (Csiko a kol., 1996). V této práci byla nalezena eliminace podobná

hospodářským druhům ve spektru hlavních metabolitů, z hlediska rychlosti eliminace byla hodnocena jako rychlejší. Autor našel plasmatické hladiny albendazolu a jeho metabolitu albendazol sulfoxidu za dostatečné a připustil použitelnost albendazolu jako anthelmintika chovu drůbeže, prakticky se však albendazol v těchto chovech šířeji neuplatnil.

Časté uplatnění nachází albendazol celosvětově mezi hospodářskými druhy chovanými pro produkci masa, mléka, vlny či dalších produktů, jako jsou ovce, koza, skot, v některých oblastech pak velbloud a lama. Minoritními kopytnatci, spadajícími do této kategorie, jsou zvířata označovaná jako divoká, spárkatá zvěř, či volně žijící. Jsou to druhy vyskytující se ve volné přírodě či chovaná v zoologických zahradách, zájmových chovech, či na farmách. V rámci ČR i Evropy lze mezi tyto druhy počítat zejména jelenovité druhy (jelen, daněk, srnec), divoké prase a muflona. Pro úplnost je nutné připomenout, že jednotlivé způsoby chovu těchto druhů momentálně spadají pod jiná zákonná ustanovení. Chov ve volných honitbách a v oborách podléhá ustanovením zákona 449/2001 Sb. o myslivosti. Naproti tomu farmový chov spárkaté zvěře podléhá ustanovením o chovu hospodářských zvířat 286/2003 Sb., se všemi požadavky na označení kusů, veterinární kontrolu, welfare zvířat a samozřejmě i požadavcích na zdravotní nezávadnost získaných produktů. Chov obou těchto kategorií zvířat (ve znění mysliveckého zákona „zvěře“) přináší hlavně ekonomické zisky plynoucí z prodeje masa (zvěřiny), kůží, rohů a parohů a trofejí (jejich hodnoty často mnohonásobně předčí cenu vlastní zvěřiny). Jelikož i tyto druhy jsou vnímavé k helmintózám, ani jeden způsob chovu se v současnosti neobejde bez antiparazitární léčby (včetně chovu zvěře ve volnosti). Důvodem je skutečnost, že zmíněné druhy jsou vnímavé k širokému spektru parazitóz, které pak mohou způsobit přímo úhyn, oslabení s následným úhynem v době zimního strádání, či narušení produkce a reprodukce. Chovatelé těchto druhů obecně mají tedy přímý zájem o jejich dobré zdraví, odrážejícím se ve finále ve všech zmíněných ekonomicky a eticky hodnotitelných ukazatelích. Oborní chov, obzvláště ale farmové a zájmové chovy, přinesly specifika chovu klasických hospodářských zvířat. Přirozeně volně žijící druhy zde totiž žijí v pro ně nepřirozené koncentraci, jsou intenzivně přikrmovány a je s nimi pravidelně manipulováno. Tyto okolnosti napomáhají přenosu a šíření infekčních nemocí, včetně onemocnění parazitárních. Takto

chovaná zvířata musí být pravidelně parazitologicky kontrolována a v případě positivity vhodně léčena širokospektrými anthelmintiky. Mezi vhodná anthelmintika patří také albendazol.

Spárkatá zvěř, její chov, související parazitologická sledování a léčebná zajištění jejich chovů byla námětem dřívějších studií realizovaných na oddělení veterinární farmakologie na Katedře farmakologie a toxikologie FaF, UK v Hradci Králové. Terénní zkušenosti s benzimidazolovými anthelmintiky, včetně albendazolu, charakterizovala tato léčiva jako klinicky účinná a bezpečná mj. i pro chovy mufloní zvěře. Dobrá praktická zkušenost s podáním albendazolu nás přivedla k záměru provést studie schopné popsat (alespoň částečně) farmakokinetiku albendazolu u tohoto i dalších druhů. Současně jsme chtěli stanovit rozdíly či shodné znaky biotransformace albendazolu mezi druhy volně žijícími a hospodářskými, obzvláště pak u druhů vysoce příbuzných (ovce a muflon; divoké a domácí prase).

II.5.

Způsoby studia biotransformace léčiv

Pro studium farmakokinetiky lze využít zvířata (*in vivo*), biologické materiály (*in vitro*), omezeně lze pro odhad parametrů použít i některé počítačové modely (*in silico*).

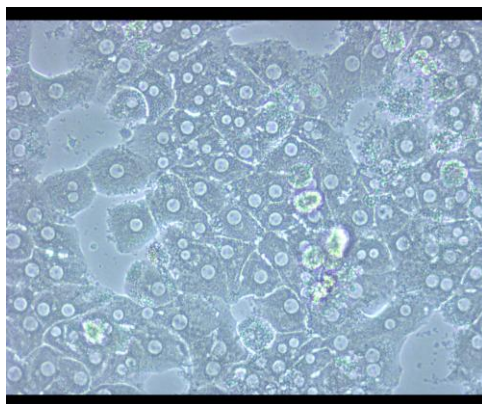
I dnes je zcela bez pochyb, že kompletní a relevantní informace o farmakokinetice léčiv lze získat pouze v pokusech *in vivo*. Je tomu tak i přes dlouhodobé snahy eticky smýšlející společnosti o omezení pokusů na živých zvířatech. Jisté výsledky přinesl rozvoj metodik využívajících systémů účastnících se procesů ovlivňujících farmakokinetiku. Takto lze odhalit parciální zákonitosti a z nich částečně odvodit celkové závěry. Pro studium jaterního metabolismu jsou k dispozici *in vitro* systémy s rozdílným uspořádáním. Od nejsložitějších, za které lze považovat izolovaný perfundovaný orgán, přes orgánové řezy, kultury izolovaných buněk, suspenze buněk, dále izolované subcelulární frakce a orgány, izolované enzymy i rekombinantně připravené enzymy. V oblasti farmakokinetiky se stále častěji setkáváme s počítačovými programy schopnými ze znalosti struktury látky odhadnout hlavní biotransformační cesty i další závislosti.

Vycházejíce ze známého faktu, že albendazol podléhá intenzivní metabolické přeměně při prvním průchodu játry, poznání jaterní biotransformace může popsat kritickou část celkové biotransformace tohoto léčiva.

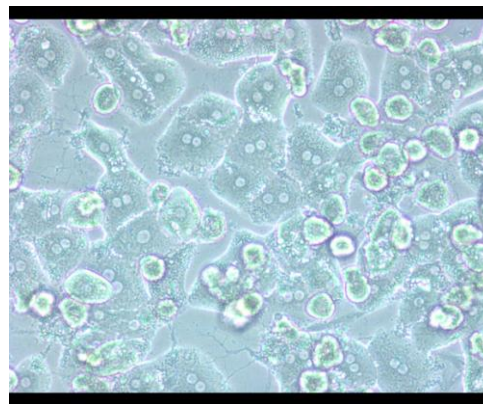
Použili jsme metody izolace hepatocytů z čerstvých jater, tj. příprava tzv. primárních hepatocytů a jejich následné kultivace v Petrino miskách v atmosféře 5% O₂ a 95% CO₂. Pro lepší životnost jsme využili modifikaci této metody (Van't Klooster a kol., 1992) poprvé použitou Seglenem (1976), kdy je dno misky potažené tenkou membránou kolagenu na kterou živé hepatocyty z připravené suspenze sedimentují a přichycují se. Takto ukotvené hepatocyty změňí svůj původně kulovitý na tvar podobný uspořádání v jaterních trámčích. Při vhodném počtu buněk pak lze dosáhnout tzv. monolayer konformace (obr. 2). V takové kultuře můžeme na dně misky pozorovat jednolitou vrstvu polygonálních, navzájem se dotýkajících buněk. Výhodou této metody je zachování funkční integrity buňky a několikadenní životnost (oproti suspenzní kultuře hepatocytů, kde životnost dosahuje spíše hodin), dovolující mj. i studium indukčního potenciálu xenobiotik. Dobrá životnost kultivovaných buněk je klíčovým faktorem studií prováděných touto metodikou. Z mnoha využitelných metod na stanovení životnosti buněk jsme my prakticky používali selektivní barvení poškozených buněk trypanovou modří, mikroskopické pozorování a MTT test odhalující cytotoxické poškození buňky. Výsledky získané studiem biotransformace na úrovni izolovaných hepatocytů jsou dobře reprodukovatelné a porovnatelné v rámci druhů i jinak rozdílných skupin. Po přidání xenobiotika do kultivačního media dochází k jeho přesunu do buňky a metabolické přeměně. Vzniklé metabolity je možné detekovat a kvantifikovat v mediu (extracelulární prostor), či v buňkách (intracelulární prostor). Kultivace izolovaných hepatocytů je metoda která nenaráží na etické principy a poskytuje dostatek materiálu pro provedení několika studií najednou. Mezi hlavní nevýhody patří ekonomická hlediska přístrojového vybavení a nezbytného materiálu, nutnost práce sterilní metodikou a praktická obtížnost izolace, vyžadující zkušenosti.

Obr. 2
Hepatocyty jednotlivých druhů zvířat kultivované na kolagenové
membráně (zvětšeno 200×)

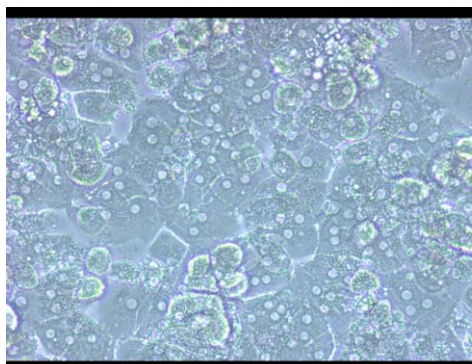
potkan



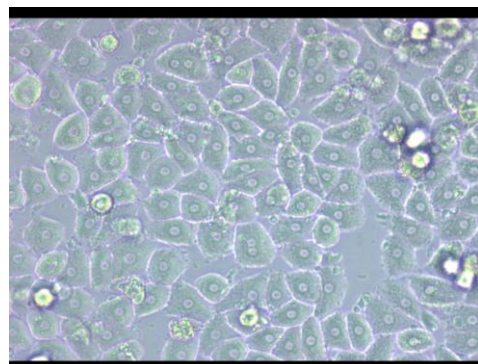
králík



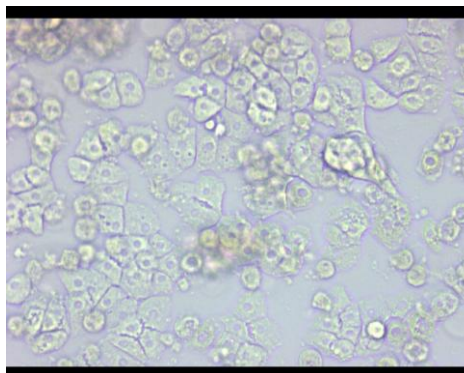
morče



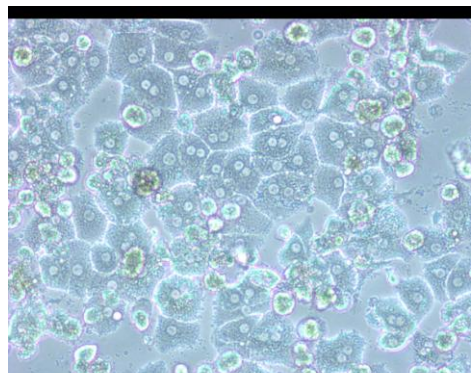
srnec



daněk



muflon

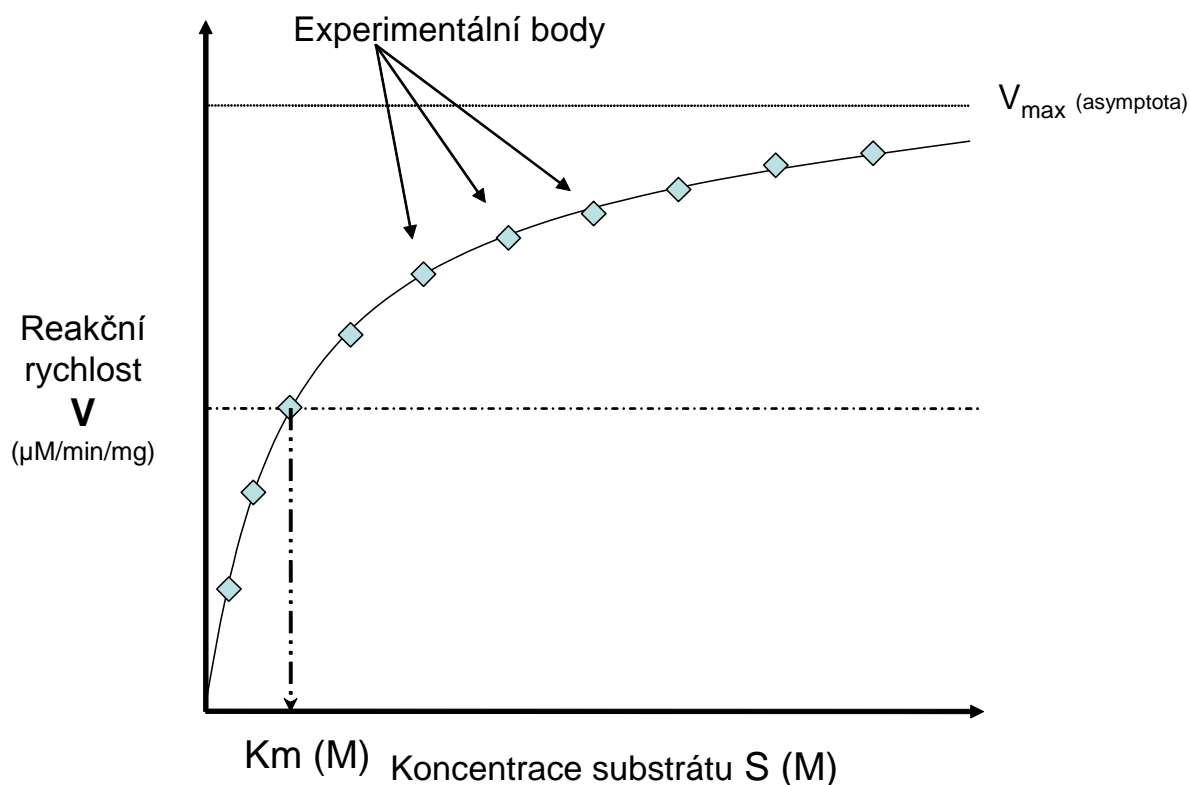


Druhá metoda využívala izolované subcelulární frakce separované při 105 000 g z homogenátu jaterní tkáně. Tato frakce je též označována jako mikrosomální frakce nebo mikrosomy. Jde o partikule membrán endoplasmatického retikula se zachovanými proteiny. Za vhodných teplotních

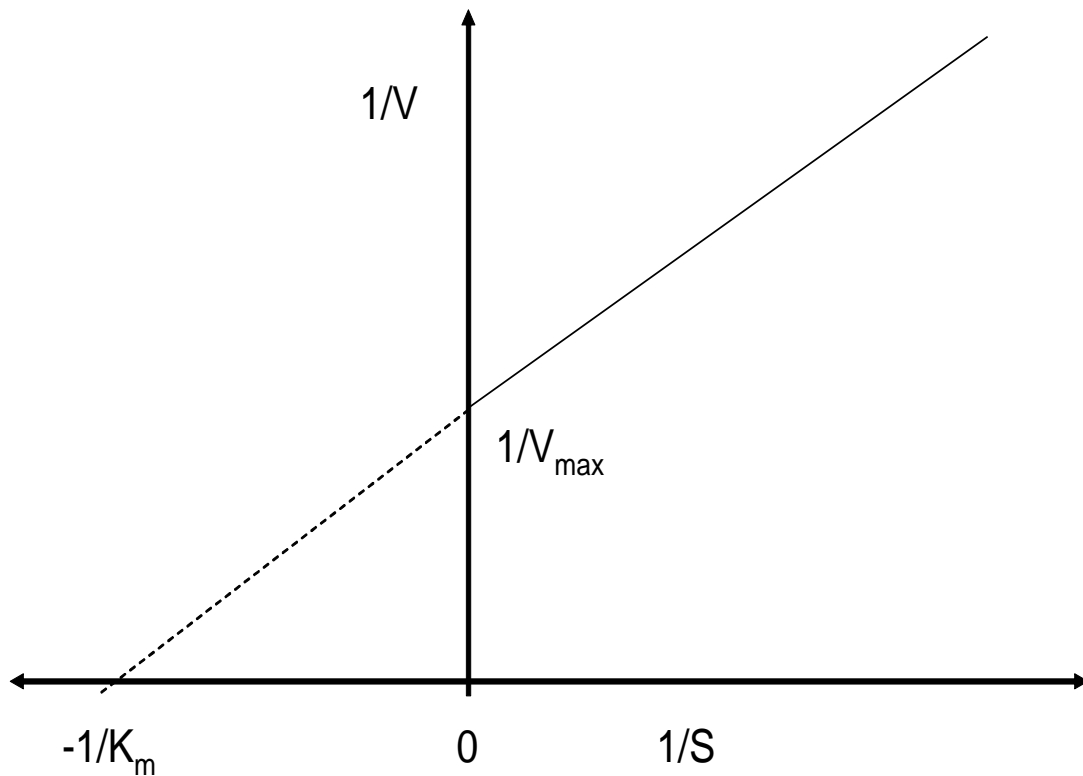
režimů a podmínek separace lze získat produkt se zachovalou enzymatickou aktivitou. Právě tato buněčná frakce obsahuje monooxygenázy CYP450 a FMO, odpovědné za metabolickou přeměnu albendazolu. K metabolické přeměně xenobiotika je nutné dodání vhodných koenzymů a optimálních podmínek z hlediska pH a teploty. Aktivita mikrosomů je reprodukována jako reakční rychlost zvolené metabolické přeměny V [$\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}_{\text{proteinu}}^{-1}$] zpravidla charakterizované pro více koncentrací substrátu S [M]. Graficky je závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu charakterizována hyperbolou – křivka Michaelis-Mentona (obr 3), či lze využít transformace dle Lineweaver-Burka (obr 4), ve které se na jednotlivé osy vynášejí reciproční hodnoty reakční rychlosti a koncentrace substrátu. Po této transformaci se získá lineární křivka, ze které je možné snadno odečíst hodnoty biochemických parametrů maximální reakční rychlost V_{max} [$\mu\text{M} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}_{\text{proteinu}}^{-1}$] a Michaelisova konstanta K_m [M], kterou lze interpretovat jako koncentraci substrátu, při které probíhá enzymová reakce rychlostí, jež je ve srovnání s maximální rychlostí poloviční.

Obr. 3

Reakční kinetika dle Michaelis-Mentona



Obr. 4
Transformace dle Lineweaver-Burka



Využití této metody dokáže poskytnout reprodukovatelné a porovnatelné výsledky. Její výhodou, oproti metodě využívající živé jaterní buňky, je nižší finanční a časová náročnost a opakovatelnost. Nevýhodou je nižší výpovědní hodnota získaných výsledků.

Studie mikrosomální biotransformace albendazolu odhalily intenzivní přeměnu albendazolu mikrosomální frakcí jaterní tkáně u potkana (Fargetton a kol., 1986; Souhaili-el Amri a kol., 1988), ovce (Galtier a kol., 1986.), skotu (Lanusse a kol., 1993), prasete (Souhaili-el Amri a kol., 1987) a člověka (Rolin a kol., 1989; Rawden a kol. 2000). Autoři těchto studií charakterizovali jako hlavní enzymové systémy odpovědné za oxidační přeměnu albendazolu CYP450 a FMO. Následně byla nastíněna i stereospecificita jednotlivých enzymů u potkana (Moroni a kol., 1995; Solana a kol., 2000) a u ovce (Virkel a kol., 2004). V poslední jmenované studii byl charakterizován i biotransformační potenciál mikrosomů ze tkáně plic a tenkého střeva. Bylo potvrzeno řádově nižší úroveň sulfoxidace v plicích a tenkém střevě v porovnání s jaterní tkání a odlišná stereospecificita této reakce v jednotlivých tkáních, dle autorů

pravděpodobně způsobená odlišnou úrovní aktivity systémů FMO a CYP450. Bohužel, autoři studií nepoužili stejnou metodiku a proto jsou získané výsledky vzájemně neporovnatelné.

II.6.

Indukce a inhibice jaterních enzymů

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

Indukce je zvýšení aktivity biotransformačních enzymů jako odezva na přítomnost cizorodé látky v organismu. Indukovatelnost představuje strategicky významnou vlastnost prakticky všech biotransformačních enzymů, neboť je nutno chápat indukci biotransformačních enzymů jako obranný mechanismus organismu před chemickým stresem. Nárůst aktivity biotransformačního enzymu je většinou důsledkem zvýšení exprese příslušného genu (tzv. transkripční mechanismus indukce), event. snížení degradace proteinu, stabilizace mRNA (netranskripční mechanismy indukce) (Okey 1990; Gibson a Skett 2001). Proces indukce tedy 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 velmi druhově specifický (např. Boobis a kol., 1990; Rice a kol., 1992; Lu a Li 2001). 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 naznačen (Rodrigues 2001; Pelkonen a kol., 1998).

Příčinou inhibice, tj. snížení aktivity biotransformačních enzymů účinkem cizorodé látky, může být interakce xenobiotika s proteinem (tj. přímo s enzymem) nebo inhibice jeho syntézy. 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

(nevratnou) 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 (Chauret a kol., 1997; Zweers-Zeilmaker a kol., 1998) a může být selektivní pouze k určitému enzymu, nebo může postihovat více biotransformačních enzymů. Popisu mechanismu působení inhibitorů byla věnována řada prací (Barry a Feely 1990; Murray 1992; Murray a Reidy 1992; Pelkonen a kol., 1998).

Jedna látka může být induktorem biotransformačních enzymů a zároveň může inhibovat přeměny realizované tímto i jiným enzymem.

Indukce i inhibice mohou mít významné farmakologické a toxikologické důsledky. Modulací aktivit biotransformačních enzymů je pozměněna intenzita i doba trvání účinku následně podaných léčiv. Výsledkem pak může být na jedné straně několikanásobné zvýšení plasmatických hladin účinné látky s rizikem toxického působení, nebo naopak snížení plasmatické koncentrace účinné látky pod limit léčebného efektu (Barry a Feely 1990; Testa 1995; Pelkonen a kol., 1998). V případě antibiotik nebo antiparazitik se snížením koncentrace účinné látky pod terapeutickou hladinu navíc zvyšuje nebezpečí vzniku rezistence bakterií či parazitů. Modulací aktivit biotransformačních enzymů se rovněž zvyšuje riziko nežádoucích vedlejších účinků. Důsledkem modulace některých biotransformačních enzymů může být i zvýšená citlivost vůči kontaminantům životního prostředí a riziko kancerogeneze. U zvířat produkujících živočišné suroviny navíc přistupuje nebezpečí nečekaného prodloužení eliminace metabolitů či změna biotransformační cesty, a tím i nežádoucí výskyt těchto cizorodých látek v živočišných produktech. Změna funkce biotransformačních enzymů ve smyslu indukce či inhibice jaterních mikrosomálních enzymů se však nevyskytuje pouze v kontextu expozice xenobiotika. Bylo dokumentováno několik případů, kde pozorovaná indukce nebo inhibice měla vztah k probíhajícímu patologickému procesu, včetně výskytu parazitózy. Obzvláště velký vliv je spatřován v souvislosti s probíhající infekcí jaterních parazitů, zejména motolic (Galtier a Alvinerie 1996).

Vzhledem ke všem výše zmíněným závažným důsledkům by u veškerých používaných léčiv (a zvláště u opakovaně nebo dlouhodobě podávaných) měl být indukční resp. inhibiční účinek pozorně sledovaným

parametrem. V humánní farmakologii a toxikologii se tato problematika již intenzivně studuje, zájem veterinárních farmakologů je však zatím pouze ojedinělý (Van 't Klooster a kol., 1993; Fink-Gremmels a Van Miert 1994, 1996; Zweers-Zeilmaker 1998). Naším záměrem proto také bylo ověřit možnosti indukce a inhibice v souvislosti s námi užívanými benzimidazolovými anthelmintiky. Dostupnost zvířat dvou oborních chovů mufloní zvěře nás inspirovala k provedení porovnávací studie jaterní biotransformace *in vitro* mezi populací zvěře infikované jaterní motolicí *Dicrocoelium dendriticum* a infekce prosté populace.

II.5.1. Studium indukce biotransformačních enzymů

Indukční účinek testovaných léčiv na biotransformační enzymy je možno sledovat několika různými postupy. Po skončení indukčního působení testovaného xenobiotika lze stanovit (Rodrigues a kol., 2002):

1) Specifické aktivity vybraných biotransformačních enzymů

Při tomto postupu je možno substrát specificky metabolizovaný určitým enzymem přidat přímo do media k intaktní primární kultuře hepatocytů. Po inkubaci (většinou 30-60 minut) je v mediu stanoven přírůstek produktu (event. úbytek substrátu). V některých případech je vhodnější z hepatocytů připravit subcelulární frakce a specifické aktivity stanovit až v těchto subcelulárních frakcích.

2) Množství vybraných biotransformačních enzymů metodou western-blotting

Proteiny homogenátu hepatocytů (kontrolních i podrobených účinku induktoru) jsou nejprve rozděleny elektroforeticky na polyakrylamidovém gelu. Po přenesení rozdělených proteinů na nitrocelulosovou membránu jsou vybrané biotransformační enzymy detekovány pomocí specifických protilátek a kvantifikovány.

3) Množství specifické mRNA příslušející k vybraným biotransformačním enzymům

K tomuto účelu je nutné z homogenátu hepatocytů vyzolovat mRNA. Dále je možno postupovat klasickou metodou, tzv. northern-blottingem (obdobné western-blottingu, detekce pomocí radioaktivně značených sond v podobě komplementární RNA nebo DNA) nebo nověji využít metodu QRT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction) s pomocí TaqMan sondy.

Sonda, která je specifická pro daný úsek amplikonu, se navrhuje tak, aby polymerasa prodlužující řetězec při PCR tuto sondu svou 5' → 3' exonukleasovou aktivitou rozložila. Kvantitativní detekce je založena na zhášení fluorescenční barvy umístěné na jednom konci sondy tzv. quencherem (zhášečem) umístěným na druhém konci sondy. Pokud je sonda intaktní, nedochází k fluorescenci (barva je zhášena quencherem). Pokud však dojde k rozložení sondy v průběhu PCR, fluorescenční barva se dostane do roztoku, kde je od ní quencher v takové vzdálenosti, že není schopen ji zhášet. Spolu se vznikajícím množstvím specifického PCR produktu, který je v podstatě závislý na množství výchozího templátu, stoupá fluorescence.

Výběr metody závisí do velké míry na vybavení, zaměření a zkušenostech pracoviště. Je vhodné současně s testovanou látkou zařadit do experimentu i známý induktor (tzv. pozitivní kontrolu) pro kontrolu správného provedení experimentu a pro odhad závažnosti indukčního účinku testované látky a možných farmakologických a toxikologických důsledků.

Experimentální data získaná v indukčních studiích lze vyjádřit jako indukční potenciál (násobek hodnoty kontroly), jako EC₅₀ (efektivní koncentrace induktoru způsobující nárůst měřené veličiny o 50% oproti kontrole) nebo jako tzv. potenční index (poměr indukční odezvy testované látky a indukční odezvy známého induktoru).

II.5.2. Způsob studia inhibice jaterních enzymů

Při inhibičních studiích je sledována specifická aktivita studovaného enzymu. Pro studii je třeba použít několik (alespoň pět) koncentrací specifického substrátu, a to v rozmezí závislosti aktivity enzymu na koncentraci substrátu až do saturace enzymové reakce substrátem. Testovaná substance

je přidávána do inkubační směsi s příslušným enzymem a specifickým substrátem také v různých koncentracích, a po té je vyhodnocena kinetika inhibované reakce. Současně je sledována i kinetika reakce neinhibované, tj. bez testované látky.

Získaná experimentální data lze vyjádřit pomocí základních kinetických konstant, V_{max} a K_m , reakce neinhibované a reakcí inhibovaných. Na základě jejich porovnání lze určit typ inhibice. K tomuto účelu je možné (obvykle nutné) použít také různé typy grafického vyjádření kinetik enzymové reakce (Lineweaver-Burk, Dixon, Hunter-Downs, Hofstee a další). Důležitými charakteristikami inhibice jsou také inhibiční konstanta K_i (vyjadřuje vzájemnou afinitu mezi enzymem a inhibitorem, tj. míru reversibility inhibice) a hodnota IC_{50} (koncentrace inhibitoru způsobující pokles měřené aktivity o 50% vzhledem ke kontrole).

Typy inhibice podle ovlivnění kinetiky enzymové reakce (Segel 1975; Copeland 1996):

1) Kompetitivní inhibice

Molekula inhibitoru soutěží se substrátem o vazbu na aktivním centru enzymu. Rozsah inhibice proto závisí na vzájemném poměru koncentrací inhibitoru a substrátu. Zvyšováním koncentrace substrátu lze docílit vytěsnění inhibitoru, a tak i stejné V_{max} jako u reakce neinhibované. Potřebná koncentrace substrátu však bude vyšší, tj. i K_m bude vyšší.

2) Nekompetitivní inhibice

Inhibitor a substrát se vážou vzájemně nezávisle, rozsah inhibice závisí na koncentraci inhibitoru a afinitě enzymu k substrátu. Inhibitor neovlivňuje afinitu enzymu k substrátu, ale znemožňuje přeměnu navázaného substrátu na produkt. V_{max} bude tedy oproti neinhibované reakci snižena, K_m však zůstane stejná.

3) Akompetitivní inhibice

Teprve vazba substrátu na enzym pozmění konformaci enzymu tak, že se může navázat inhibitor. Obdobně jako u nekompetitivní inhibice, inhibitor

neovlivňuje afinitu enzymu k substrátu, pouze znemožňuje přeměnu navázaného substrátu na produkt. V_{\max} a K_m zjištěné v přítomnosti inhibitoru budou oproti neinhibované reakci sníženy.

4) Smíšená inhibice

Pod tento pojem jsou zahrnuty nejrůznější typy inhibice, kdy je postižena jak afinita enzymu k substrátu, tak i katalytická funkce enzymu vůči substrátu.

III.

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Charakterizovat jaterní biotransformaci albendazolu včetně chirálních aspektů u muflona a potkana *in vitro* s využitím izolovaných hepatocytů ukotvených na kolagenové membráně.
2. Charakterizovat *in vitro* biotransformaci albendazolu včetně chirálních aspektů izolovanými hepatocyty laboratorních (potkan, králík, morče, prase) a volně žijících druhů zvířat (muflon, srnec, daněk).
3. Popsat a porovnat *in vitro* jaterní mikrosomální biotransformaci albendazolu včetně chirálních aspektů u intaktních samců a kastrátů hospodářských zvířat a volně žijících zvířat.
4. Provéřit modulační (indukční/inhibiční) účinky albendazolu na aktivity CYP450 1A a CYP450 3A a biotransformaci albendazolu u muflona *in vitro* a *in vivo*. Během a po ukončení podávání albendazolu sledovat koncentrace albendazolu v plasmě, žluči a předžaludku. Ověřit vliv parazitózy s lokalizací v játrech na aktivitu jaterních biotransformačních enzymů.

IV.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - VÝSLEDKY

IV.1.

Stereoselektivní biotransformace albendazolu v izolovaných hepatocytech muflona a potkana

Velík, J., Baliharová, V., Skálová, L., Szotáková, B., Wsól, V. and Lamka, J.: Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat isolated hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2003; 26, 397-302. (Příloha 1)

Tato studie navazovala na naše velmi dobré zkušenosti s využitím benzimidazolových anthelmintik (v poslední době hlavně s albendazolem) při terénní léčbě parazitóz spárkaté zvěře. Albendazol využíváme dlouhodobě v několika oborních chovech, kde je muflon dominantní zvěří. Vzhledem k vývojové příbuznosti muflona s ovci domácí jsme dávkování léčiva odvozovali jednak od tohoto druhu, jednak z výsledků našich předběžných pokusů, které prokázaly požadovanou anthelmintickou účinnost proti závažným parazitózám plic a jater. (muelleriáza a dikroceliáza).

Naším cílem bylo prostudovat jaterní biotransformaci albendazolu u muflona *in vitro* s využitím primárních kultur hepatocytů. Pro vyšší výpovědní hodnotu studie jsme do projektu zařadili srovnání s potkanem, živočišným druhem, u kterého jsou mnohé aspekty biotransformace již prostudovány, nicméně studie s izolovanými hepatocyty a albendazolem také chybí. Získané výsledky jsme chtěli porovnat s dostupnými daty z *in vivo* studií provedených u ovce i potkana a posoudit společné rysy jaterní biotransformace muflona a ovce.

Dvoustupňovou perfuzní kolagenasovou metodou byly z čerstvých jater připraveny primární hepatocyty, které byly následně kultivovány na kolagenem potaženém dnu Petriho misky. Životnost hepatocytů byla dobrá a v intervalu 0-48 hodin nebylo odhaleno cytotoxické poškození buněk vlivem testovaných

látek. Pro oba druhy byla izolace i kultivace provedena za identických podmínek u 6 jedinců každého druhu, minimálně v tripletu pro každou koncentraci. Jediným rozdílem v izolaci hepatocytů z jater muflona a potkana byly rozdílné časy perfuze vzorku jater při izolaci, což souviselo s odlišnou váhou a charakterem výchozího materiálu. U potkana byla izolace provedena z celých jater, z mufloních jater byla pro izolaci použita část levého laloku o váze přibližně 150 g.

Albendazol byl přidán do kultivačního media hepatocytů ve dvou koncentracích. První koncentrace (2,5 µg/ml) odráží maximální plasmatické koncentrace hlavního metabolitu, albendazol sulfoxidu, u ovce *in vivo*, po aplikaci 7,5 mg/kg albendazolu p.o. v restriktivním krmném programu (Lifschitz a kol., 1997), druhá (10,0 µg/ml) koncentrace byla zvolena pro maximální produkci metabolitů, publikované ve studii na buněčných liniích HepG2 (Rolin a kol., 1989). Z kultivačního media byly odebírány vzorky, ve kterých byla stanovena parentní látka a metabolity. Odběr byl prováděn po 2, 4, 8 a 24 hodinách. Po 24 hodinách byl proveden seškrab buněk ze dna misek a v homogenátu stanovení metabolitů; to mělo odhalit případné rozdíly v intracelulární a extracelulární koncentraci metabolitů, eventuální rozdíl by naznačoval přítomnost transportních mechanismů v hepatocytu.

Na grafu 1 je patrný rychlý úbytek parentní látky (albendazolu) z kultivačního media. To je způsobeno rychlou metabolickou přeměnou albendazolu, případně vazbou na hepatocyty. Tato vazba je zřejmá z porovnání koncentrací albendazolu v intervalu 24 hodin v mediu a homogenátu buněk. Určení, zda se tak děje na základě fyzikálních vazeb, či zda se na transportu albendazolu do hepatocytu podílejí transportní mechanismy, nebylo předmětem našeho zájmu. Naproti tomu koncentrace metabolitů vně a v buňkách se lišily pouze minimálně (viz. graf 2, 3, 4). Též vzájemný poměr obou enantiomerů byl shodný v kultivačním mediu i v homogenátu buněk.

Graf 2 dokumentuje vznik sumy enantiomerů albendazol sulfoxidu v závislosti na čase odběru. Je patrné, že dochází k rychlému vzniku metabolitů. Při použité nižší koncentraci substrátu je v intervalu 8 hodin zřetelné jeho vyčerpání a již nevzrůstající koncentrace metabolitu, při inkubaci s vyšší koncentrací substrátu je nárůst koncentrace albendazol sulfoxidu patrný

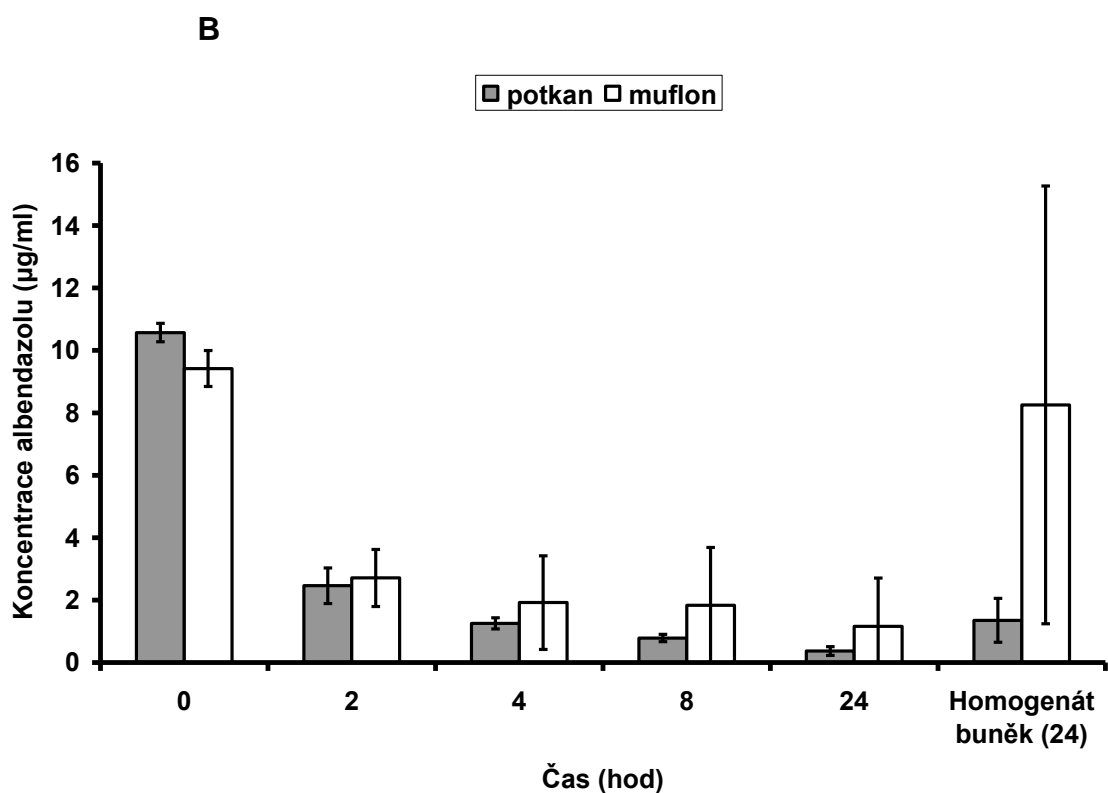
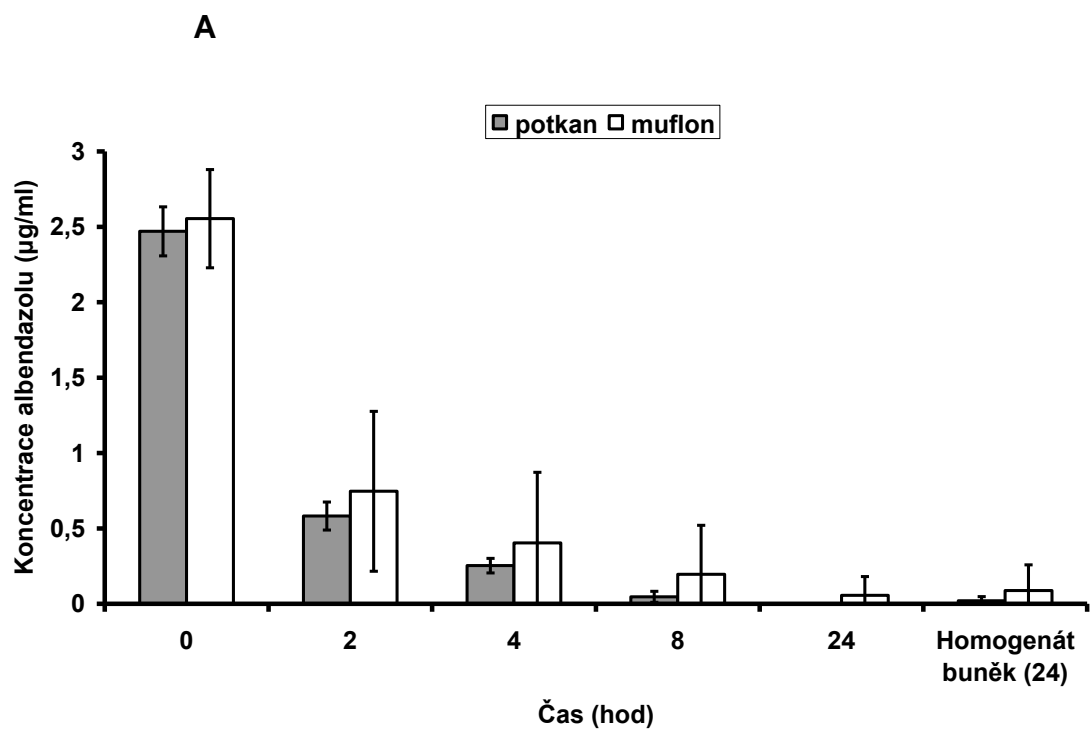
ve všech sledovaných intervalech. Mezi druhy nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci sumy albendazol sulfoxidu.

Zastoupení jednotlivých enantiomerů jsme zjistili po jejich stereospecifické separaci na AGP koloně (graf 3). Je patrné, že procentuální zastoupení je pro oba druhy specifické. U potkaních hepatocytů byl pozorován vznik takřka racemické směsi (+)-albendazol sulfoxidu a (-)-albendazol sulfoxidu, přesněji byl naměřen poměr (+)-/(-)-albendazol sulfoxidu v rozmezí 1,0 až 1,1. U muflona byl (+)-albendazol sulfoxid dominantně vznikajícím enantiomerem se zastoupením takřka 80%. Vyjádřeno poměrem (+)-/(-)-albendazol sulfoxid, byly nalezeny jeho hodnoty v intervalu 2,8 až 3,8. Poměr byl nezávislý na použité koncentraci substrátu. Pokud bychom porovnali koncentrace jednotlivých enantiomerů ve všech intervalech odběrů, našli bychom signifikantní rozdíly mezi druhy, achirálním stanovením sumy albendazol sulfoxidu neodhalitelnou.

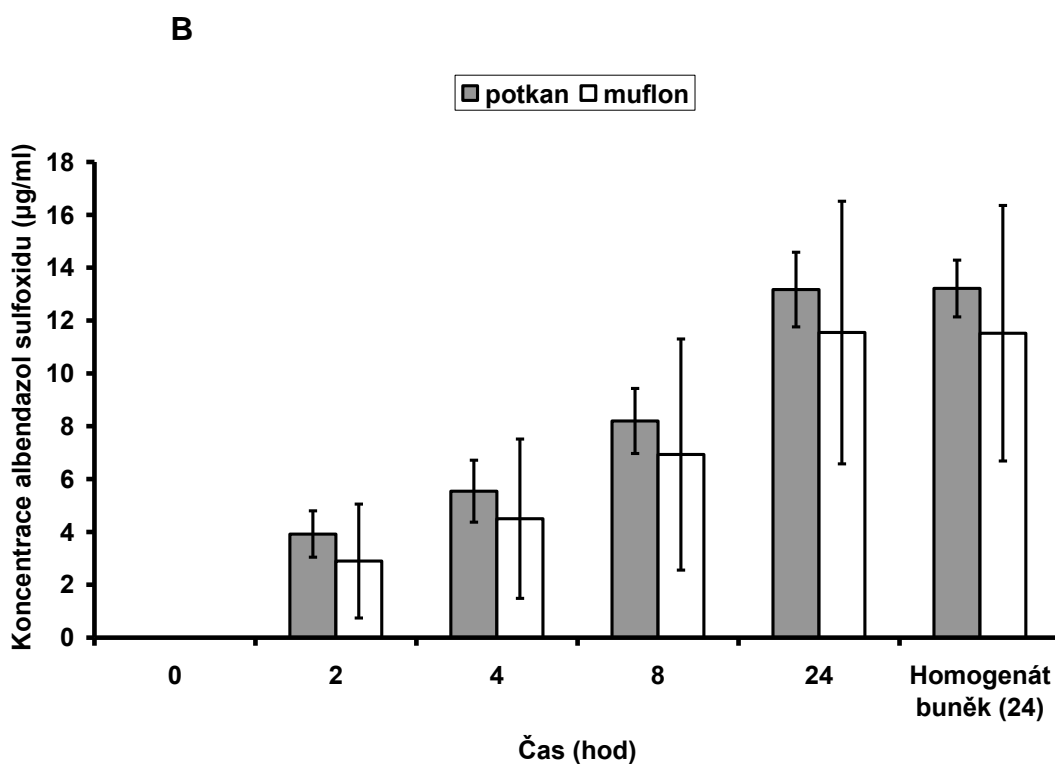
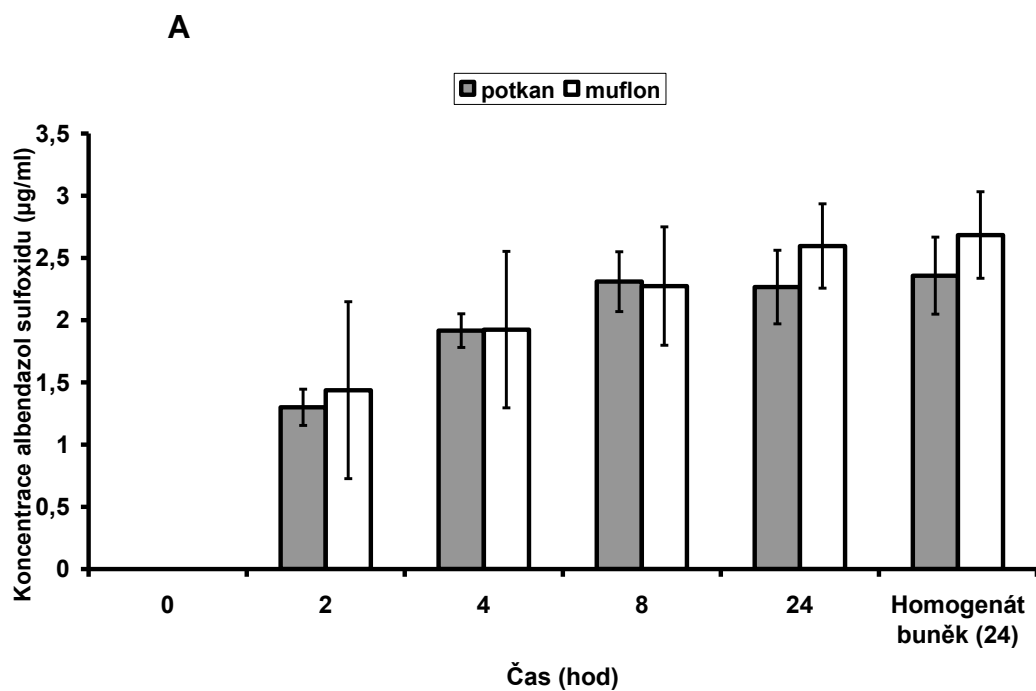
Na grafu 4 je vyjádřena koncentrace vzniklého albendazol sulfonu v závislosti na použité koncentraci substrátu a intervalu odběru. U obou studovaných druhů a v obou použitých koncentracích je zřetelný takřka lineární nárůst koncentrace tohoto metabolitu v mediu. Porovnání druhů odhaluje přibližně 5× vyšší koncentrace albendazol sulfonu v kultivačním mediu potkaních hepatocytů než v mediu mufloních hepatocytů. Tento poměr můžeme považovat za stabilní jak v rámci obou použitých koncentrací substrátu, tak v rámci časových intervalů odběrů.

Celkově můžeme hodnotit *in vitro* model kultivovaných primárních hepatocytů za vhodný pro studium biotransformace albendazolu. Bylo prokázáno, že podobně jako *in vivo* dochází k rychlé metabolické přeměně na albendazol sulfoxid a následně, pomaleji, na albendazol sulfon. Můžeme tedy říci, že jsme ověřili dominantní vliv jaterní biotransformace na farmakokinetiku albendazolu, obzvláště její roli v rychlé metabolické přeměně albendazolu na albendazol sulfoxid. Připomeňme, že vysoká rychlost přeměny byla *in vivo* dokumentována limitními koncentracemi albendazolu v plasmě po jeho orálním podání (first pass effect). Rovněž parametry enantiospecifické přeměny albendazolu na dva enantiomery albendazol sulfoxidu jsou velmi podobné hodnotám nalezeným *in vivo*. U potkana bylo AUC pro (+)-albendazol sulfoxid *in vivo* 41% celkového albendazol sulfoxidu, ale v počátečních intervalech,

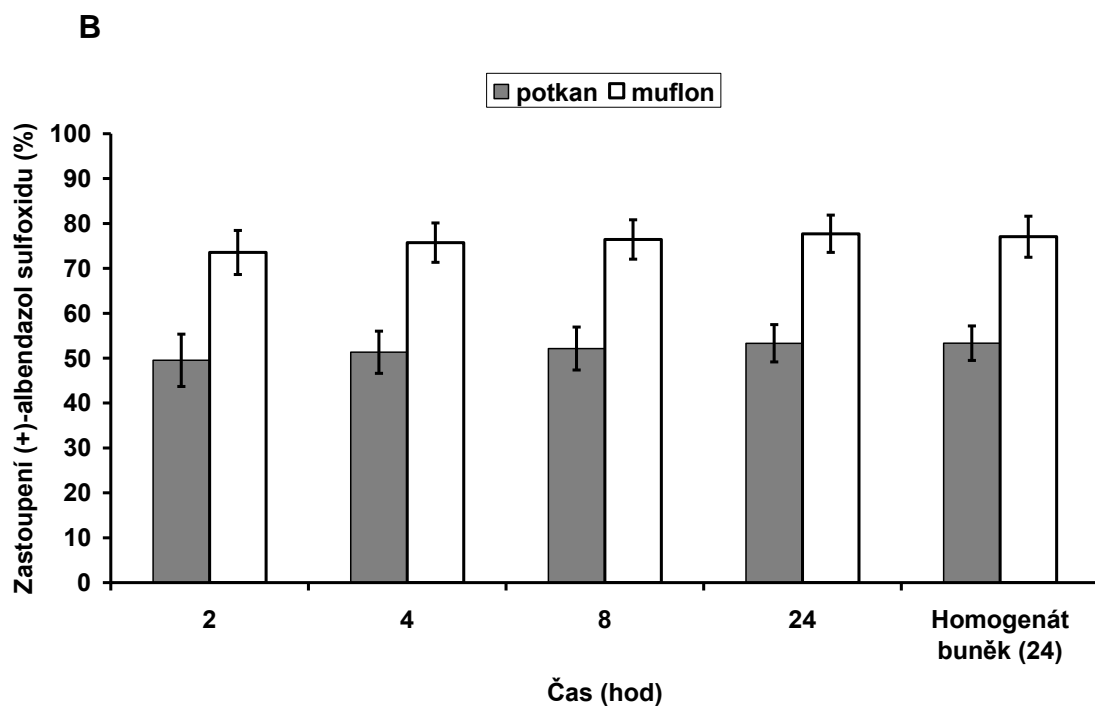
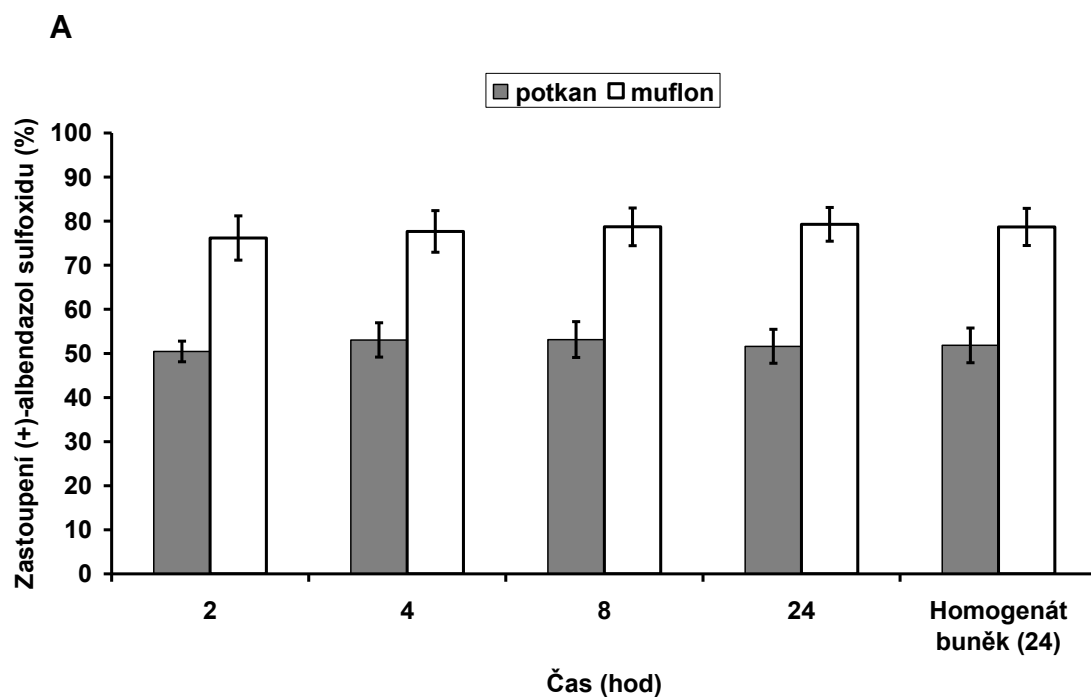
které se nejvíce podobají našim *in vitro* podmínkám je poměr (+)-/(-)-albendazol sulfoxid blížký 1,0 což odpovídá našim zjištěním. Parametry biotransformace mufloních hepatocytů *in vitro* dokumentují přítomnost stejných hlavních metabolitů jako dříve nalezené *in vivo* u ovce domácí. Rychlá metabolická přeměna albendazolu na albendazol sulfoxid také odpovídá zákonitostem pozorovaným u ovce, co více, mezi těmito druhy je velmi podobná i stereospecificita této reakce. My jsme ji stanovili v rozmezí 75-80% zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu, zatímco *in vivo* zastupovalo AUC pro (+)-albendazol sulfoxid 86% celkového albendazol sulfoxidu. Jediným pozorovaným rozdílem je časová závislost tohoto poměru. Zatímco naše *in vitro* studie dokumentují v čase stálý poměr enantiomerů, *in vivo* s přibývajícím časem vzrůstá zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu. Poměr mezi (+)-albendazol sulfoxidem a (-)-albendazol sulfoxidem podobný námi nalezenému se nachází mezi 3 a 30 hodinou po orálním podání albendazolu samci ovce domácí. U muflona můžeme očekávat podobnou biotransformaci albendazolu jako u ovce domácí.



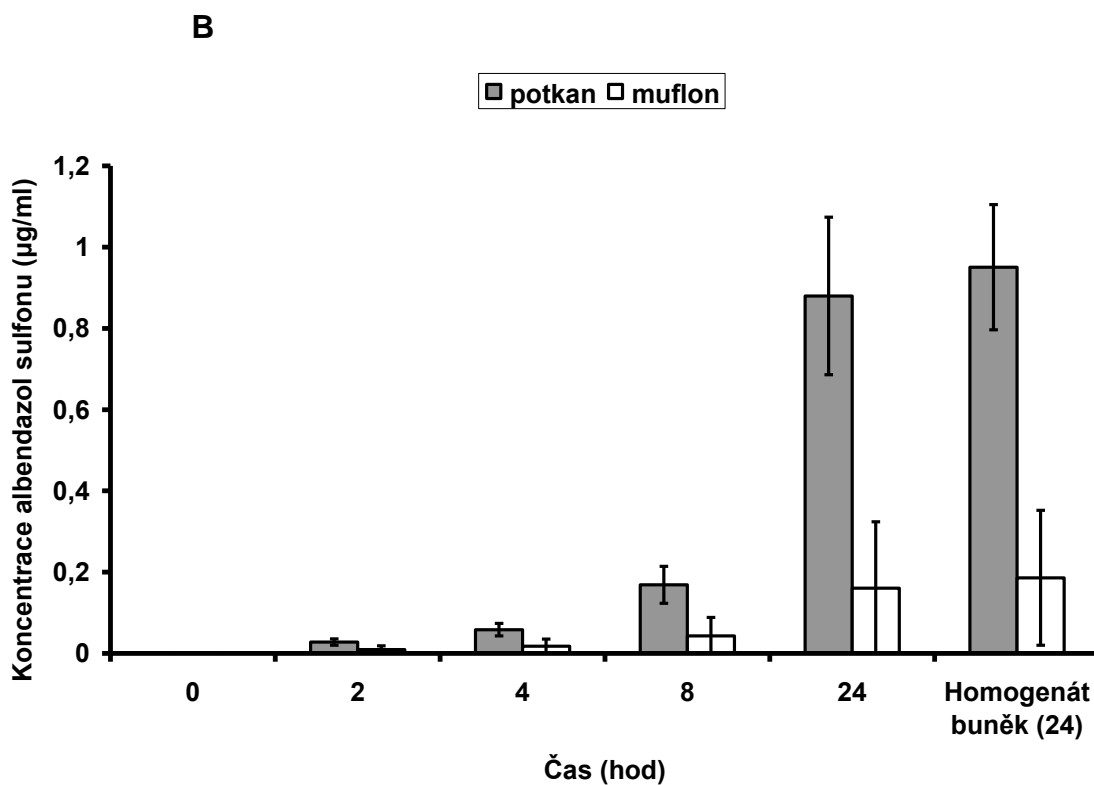
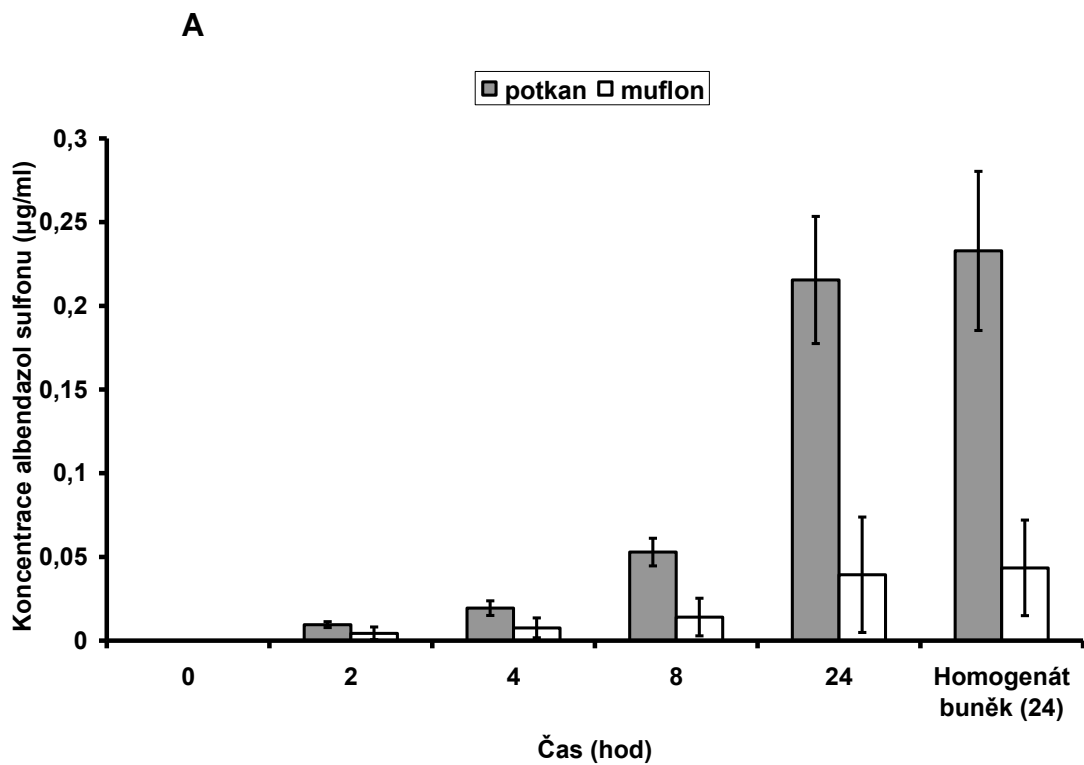
Graf 1: Koncentrace albendazolu v kultivačním médiu v čase. A-Výchozí koncentrace substrátu 2,5 µg/ml, B-Výchozí koncentrace substrátu 10,0 µg/ml.



Graf 2: Koncentrace sumy albendazol sulfoxidů v kulturačním médiu v čase. A- Výchozí koncentrace albendazolu 2,5 $\mu\text{g/ml}$, B-Výchozí koncentrace albendazolu 10,0 $\mu\text{g/ml}$.



Graf 3: Procentuální zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu v čase. A-Výchozí koncentrace substrátu 2,5 µg/ml, B-Výchozí koncentrace substrátu 10,0 µg/ml.



Graf 4: Koncentrace albendazol sulfonu v kultivačním médiu v čase. A-Výchozí koncentrace substrátu 2,5 µg/ml, B-Výchozí koncentrace substrátu 10,0 µg/ml.

IV.2.

Studium oxidativní biotransformace albendazolu izolovanými hepatocyty laboratorních druhů zvířat (potkan, králík, morče, prase) a volně žijících zvířat (muflon, srnec, daněk).

První část tohoto pokusu měla porovnat biotransformaci albendazolu u běžných laboratorních druhů zvířat využívaných v humánní farmakologii ke studiu farmakokinetiky xenobiotik. K provedení studie nás vedlo poznání výjimečnosti farmakokinetiky albendazolu u potkana a to hlavně vzhledem k druhům, u kterých je albendazol terapeuticky využíván včetně člověka. U potkana, jako i ostatních monogastrických živočichů, je vlivem morfologie zažívacího traktu omezena biologická dostupnost albendazolu a s tím související nižší plasmatické hladiny jeho metabolitů (Delatour a kol., 1986, 1991a). Nejvýraznějším parametrem odlišujícím potkana od ostatních druhů (hospodářská zvířata, pes, člověk) je jeho stereospecificita v produkci albendazol sulfoxidu. Doposud byla u člověka i hospodářských zvířat nalezena vysoká preference tvorby (+)-albendazol sulfoxidu, zatímco u potkana není jakákoliv preference vyjádřena vůbec (vznik přibližně racemické směsi, viz. kapitola IV.1), či byl nalezen slabě vyšší podíl (-)-enantiomeru albendazol sulfoxidu (Delatour a kol., 1991a). Albendazol je léčivo celosvětově studované z mnoha pohledů farmakokinetiky i farmakodynamiky. Je sledována enzymatická indukce a inhibice, vlivy transportních proteinů, přechod parentní látky i metabolitů přes placentární bariéru (Capece a kol., 2002) a s tím související testování teratogenity a v neposlední řadě se nadále prohlubují znalosti klinické účinnosti albendazolu. V mnoha případech je v podobných projektech používán potkan, či buněčné kultury potkaní tkáně, jako model a to i přes výše zmíněné a již dlouhou dobu známé rozdíly. Jedním z důsledků jsou nesourodé závěry plynoucí z porovnatelných studií na cílovém species a na potkanovi. V pokusech na potkanech byla opakovaně dokumentována teratogenita tohoto léčiva (Mantovani a kol., 1995; Navarro a kol., 1999; Cristofol a kol., 1997; Teruel a kol., 2003), naproti tomu tyto závěry nebyly potvrzeny u ovce a skotu a to jak v přímém pokusu (Piscopo a Smoak, 1997), tak nejsou známa jakákoliv poškození plodu z praxe. Ani u ostatních

hospodářsky využívaných druhů nejsou známy klinické komplikace tohoto charakteru. U člověka je farmakokinetika albendazolu *in vivo* již známa a lze ji z pohledu chirálního porovnat s farmakokinetikou albendazolu u hospodářských zvířat, z pohledu biologické dostupnosti a plasmatických hladin spíše s potkanem. Jak bylo řečeno v úvodu, má využití albendazolu v léčbě lidských parazitárních onemocnění vzrůstající tendenci a i z tohoto praktického hlediska by nalezení vhodnějšího modelu mohlo v budoucnu přinést výsledky s větší výpovědní hodnotou. Jelikož studie přímo navazovala na kapitulu IV.1, výsledky z této části pokusu byly implementovány i do této kapitoly.

Za stejných podmínek izolace, kultivace a inkubace byla porovnávána biotransformace albendazolu *in vitro* mezi dospělými samci druhů potkan (Wistar), morče (Trikolora), králík (Činčila) a prase (plemeno Landrace, representováno kastrovánými samci-vepří). Bylo opět využito kultur izolovaných hepatocytů inkubovaných 24 hodin v přítomnosti 2,5 µg/ml albendazolu. Pro zjednodušení oproti studii IV.1. jsme v tomto pokusu použili pouze tuto jednu koncentraci substrátu, která lépe reflektuje plasmatické koncentrace albendazolu a jeho metabolitů v průběhu antiparazitární terapie. Odběr media a metodika stanovení byla prováděna shodným způsobem jako v kapitole IV.1.

U všech sledovaných druhů byl pozorován vznik obou enantiomerů albendazol sulfoxidu a albendazol sulfon. Mezi druhové rozdíly jsou patrné již při pozorování úbytku parentní látky z media (graf 5). Oproti kulturám hepatocytů králíka a morčete lze pozorovat pomalejší ztrátu albendazolu z inkubačního media v kulturách hepatocytů potkana a prasete. Vznik albendazol sulfoxidu vyjádřený sumou enantiomerů (graf 6), odhaluje velmi rychlou metabolickou přeměnu albendazolu na albendazol sulfoxid již během prvních hodin inkubace. Na grafu 6 je již v intervalu 2 hodiny patrný rozdíl mezi druhy. Kultury morčete a králíka vyprodukovaly signifikantně více albendazol sulfoxidu než hepatocyty potkaní; signifikantně nejnižší pozorovaná celková sulfoxidace albendazolu je prasete. Odpovídající porovnání druhů získal Souhaili-El Amri a kol. (1986) sledováním hodnot aktivit celkového CYP450. Průběh koncentrací v intervalu 0 až 24 hodin je druhově specifický. Potkan dosáhl maximálních hodnot již po 8 hodinách, jak bylo diskutováno v kapitole IV.1. U morčete a králíka je maximálních koncentrací v mediu dosaženo již po 2, respektive po 4 hodinách. Pravděpodobně díky nedostupnosti (spotřebování

veškerého) substrátu již v dalších intervalech nedochází ke zvyšování koncentrace albedazol sulfoxidu v mediu. V posledním intervalu můžeme pozorovat slabý pokles, který lze zdůvodnit postupným odebíráním albedazol sulfoxidu na metabolickou přeměnu na albedazol sulfon (viz dále). Chirální rozdělení sumy albedazol sulfoxidu na jednotlivé enantiomery odhalilo druhově odlišnou stereospecificitu sulfoxidace albedazolu. U všech studovaných druhů lze poměr enantiomerů v intervalech měření považovat za stabilní s průměrným zastoupením (+)-/(-)-albedazol sulfoxid (%/%) pro jednotlivé druhy: králík 40/60, potkan 50/50, morče 70/30, vepř 75/25 (graf 7). I vzniku albedazol sulfonu (graf 8) odhalil mezidruhové rozdíly. Koncentrace tohoto metabolitu v mediu ve všech časových intervalech zachovávalo pořadí: králík > potkan = morče > prase.

Celkově lze za nejpodobnější laboratorní model pro studium jaterní biotransformace albedazolu u člověka a hospodářských zvířat hodnotit morče a prase. Naproti tomu oproti hospodářským druhům i člověku jsme pozorovali výrazné odlišnosti ve stereospecificitě jaterní biotransformace u jinak obvyklých laboratorních druhů potkan, králík. Co více, dokumentované parametry biotransformace mohou být zachovány i u buněčných linií získaných z jaterní i jiné tkáně těchto druhů.

Po úspěšné studii popisující jaterní biotransformaci albedazolu u muflona *in vitro* jsme obdobnou metodikou otestovali biotransformační aktivitu i u dalších dvou druhů volně žijících přežvýkavců – srnce a daňka. Srnec je typickým představitelem zvěře volných honiteb, zastoupeným takřka na celém území ČR. Daněk je také představitelem fauny volných honiteb, oproti srnčí zvěři je jeho rozšíření ve volné přírodě omezenější. Naproti tomu je daněk také druhem často chovaným v oborách a farmových chovech. Oba druhy se stávají cíly preventivní i cílené antiparazitární terapie, včetně terapie albedazolem. S přihlédnutím k mizivým znalostem nejen o biotransformaci albedazolu, ale též o biotransformaci xenobiotik celkově, může tato studie významně posunout znalosti o těchto zvířatech. Prvním krokem, podobně jako při studii s muflonem, byla optimalizace metody izolace hepatocytů ze vzorku čerstvých jater. Původní metoda byla vypracovaná pro celá potkaní játra a následně upravena pro část levého laloku jater muflona (viz. Kapitola IV.1). U srnce a daňka byla pro izolaci použita také část levého jaterního laloku o váze přibližně 150 g. Za

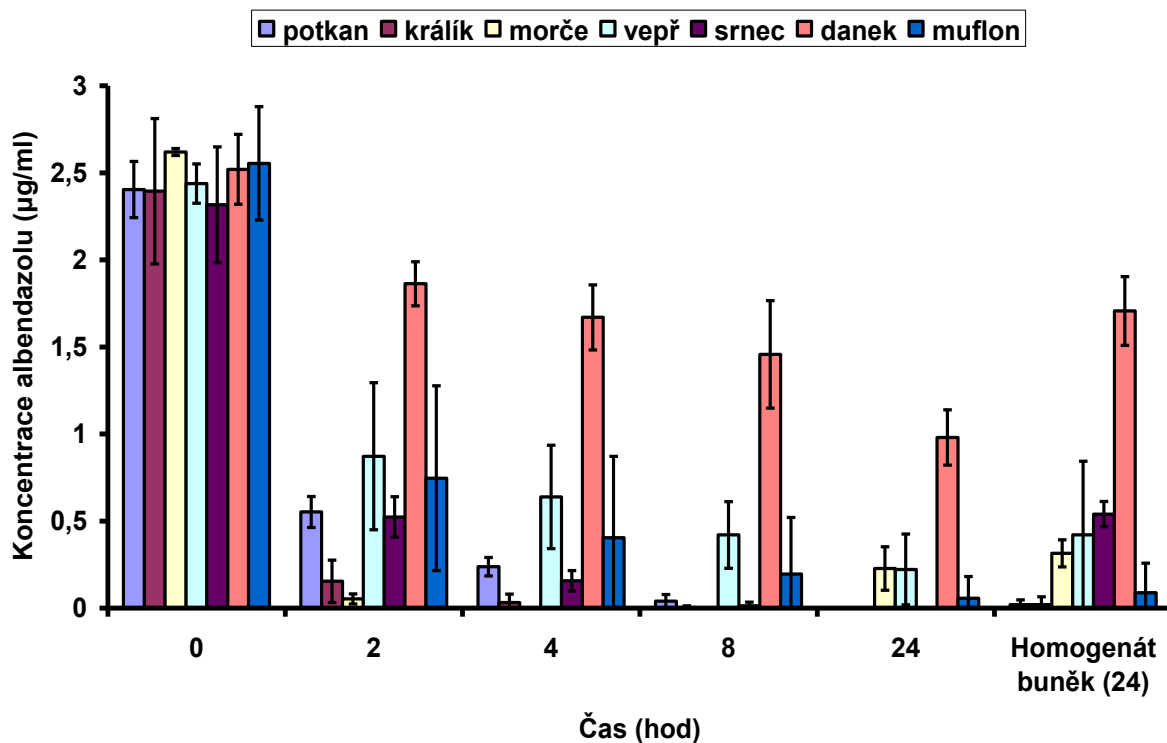
podmínek izolace byla potkaní játra promývána 5-6 minut, mufloní dle vzorku 5-10 minut, srnčí 6-8 minut a daňčí 8-13 minut. Pro kultivace byly použity suspenze s minimálně 90% živých buněk (zjišťováno pomocí barvení trypanovou modří). Suspenze byla nanášena na Petriho misky potažené kolagenovou membránou. U všech druhů bylo pozorováno dobré přilnutí a vytvoření jednovrstvé (monolayer) konformace (obr. 2). Tyto kultury byly inkubovány v mediu obohaceném o albendazol po dobu 24 hod. Případná toxicita albendazolu či rozpouštědel byla sledována s využitím barevné reakce (test cytotoxicity-MTT test). Z kultivačního media byly odebírány vzorky v intervalech 2, 4, 8 a 24 hodin. Po 24 hodinách byly buňky přilnuté ke dnu seškrábnuty a homogenizovány se zbytkem kultivačního media. Ve vzorcích byl stanoven albendazol, oba enantiomery albendazol sulfoxidu a albendazol sulfon.

Podobně jako u výše zmíněných druhů byl pozorován rychlý úbytek albendazolu z kultivačního media, ale pomalejší v porovnání s laboratorními druhy (graf 5). Souběžně se ztrátou substrátu z media byl u obou studovaných druhů pozorován nárůst produkce albendazol sulfoxidu ve všech studovaných intervalech. Porovnání obou druhů vykazuje signifikantně rychlejší sulfoxidaci albendazolu u srnce než daňka (graf 6). Porovnáme-li tyto druhy s muflonem, jde o pomalejší metabolizátory. Vyjádřeno pro oba enantiomery byla u muflona nalezena 5 až 15 vyšší koncentrace (+)-albendazol sulfoxidu oproti srnci a daňkovi (graf 9), zatímco koncentrace (-)-albendazol sulfoxidu v mediu jsou u srnce srovnatelné či lehce vyšší a u daňka srovnatelné nebo lehce nižší než u muflona (graf 10). Relativní zastoupení enantiomerů je u srnce 75% (-)-albendazol sulfoxidu a 25% (+)-albendazol sulfoxidu a u daňka 62% (-)-albendazol sulfoxidu a 38% (+)-albendazol sulfoxidu (graf 7). Tato preference vzniku (-)-enantiomeru je v protikladu k metabolismu hospodářských zvířat a člověka. Je patrné, že tyto dva druhy produkují podstatně méně (+)-enantiomeru, což rezultuje i v nižších hladinách celkového albendazol sulfoxidu. I v kulturách izolovaných hepatocytů srnce a daňka byla odhalena schopnost dále metabolizovat albendazol sulfoxid na albendazol sulfon. U srnce byla tato aktivita ve všech sledovaných intervalech signifikantně vyšší než u daňka (obrázek 8). Pro srovnání, úroveň sulfonace byla u muflona přibližně mezi srncem a daňkem.

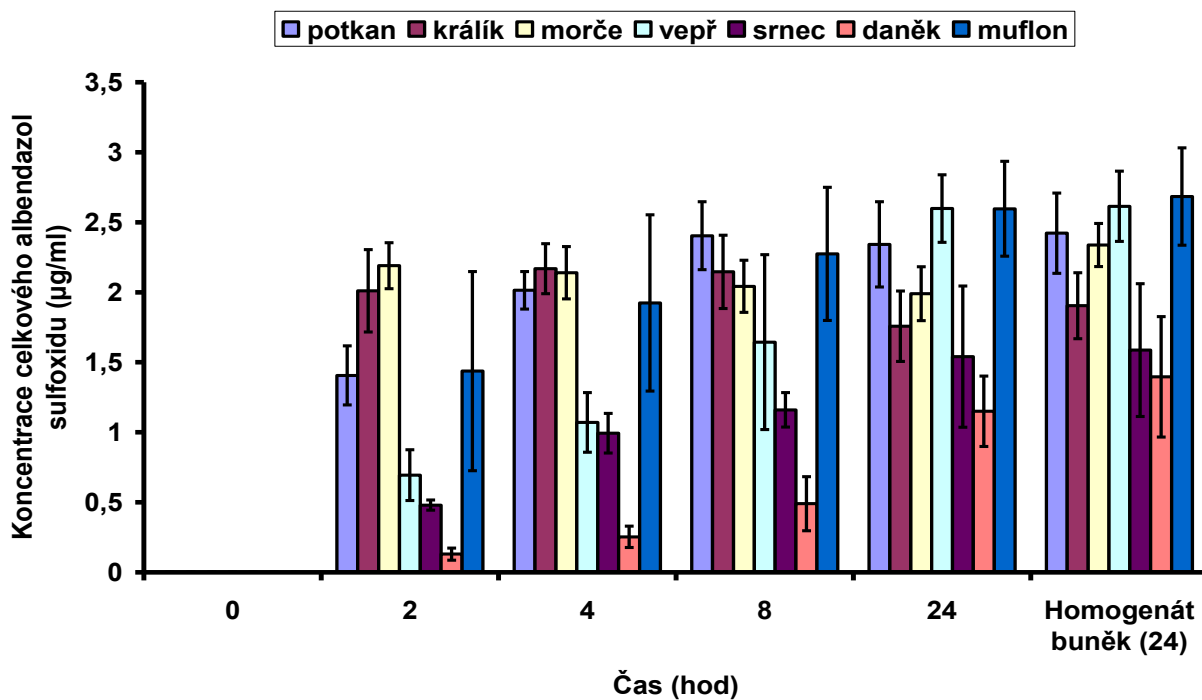
V tomto pokusu byla nalezena nízká produkce (+)-albendazol sulfoxidu v kulturách hepatocytů daňka a obzvláště srnce. To se projevilo jak v relativním zastoupení jednotlivých enantiomerů, kde se (-)-albendazol sulfoxid stal dominantní formou, tak byla ovlivněna celková rychlost sulfoxidace albendazolu.

Celkově jsme u testovaných druhů našli vysokou míru specifity oxidativní biotransformace albendazolu. To potvrzuje, že rozdíly v plasmatických hladinách metabolitů albendazolu dokumentované ve vědecké literatuře nejsou způsobeny pouze rozdílnou biologickou dostupností, která má přímý vztah k morfologii gastro-intestinálního traktu. Naše studie potvrzuje, že i aktivita jaterních mikrosonálních enzymů může zásadním způsobem modifikovat spektrum i míru zastoupení metabolitů v plasmě.

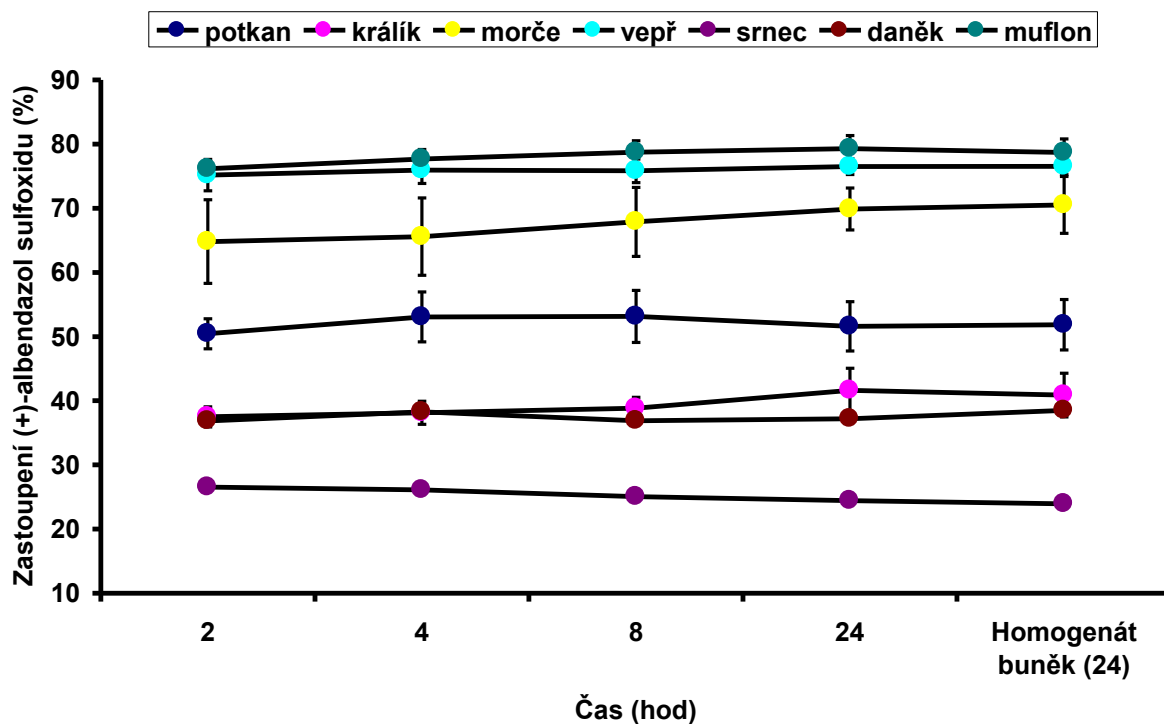
Jak bylo v kapitole II.2. shrnuto, zatím nebylo publikováno dostatečné množství studií, aby se podařilo specifikovat anthelmintickou účinnost jednotlivých optických forem albendazol sulfoxidu, či favorizovat roli jednoho z nich. Z tohoto důvodu není jednoduché vyslovit závěry o vhodnosti, či nevhodnosti albendazolu, jako anthelmintika srnce a daňka, tedy druhů u nichž byla pozorována nestandardní stereospecificita jeho sulfoxidace, oproti druhům, kde již byla účinnost tohoto léčiva potvrzena a u kterých byl albendazol zaveden do běžné praxe (ovce, koza, skot). Studované druhy jelenovitých se liší od hospodářských druhů výrazně ve schopnosti produkovat (+)-albendazol sulfoxid, zatímco rozdíly v produkci druhého enantiomeru byly výrazně menší. Naše studie ukazuje na nutnost detailního stanovení farmakokinetiky léčiva před jeho podáním nejen v humánní, ale i ve veterinární farmakologii. Použití albendazolu u daňka či srnce bude lépe podloženo dalšími studiemi, nejlépe provedené metodikou *in vivo*, které prokáží, zda se převaha (-)-albendazol sulfoxidu v plasmě projeví i zde.



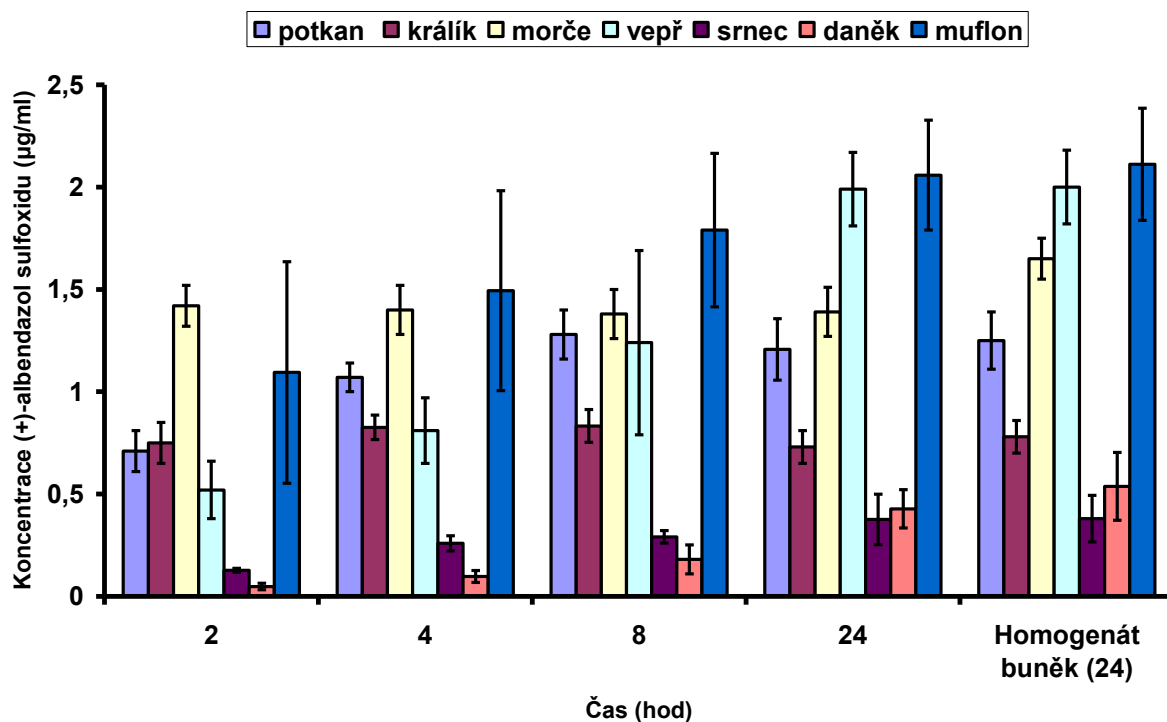
Graf 5: Koncentrace substrátu (albendazolu) v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.



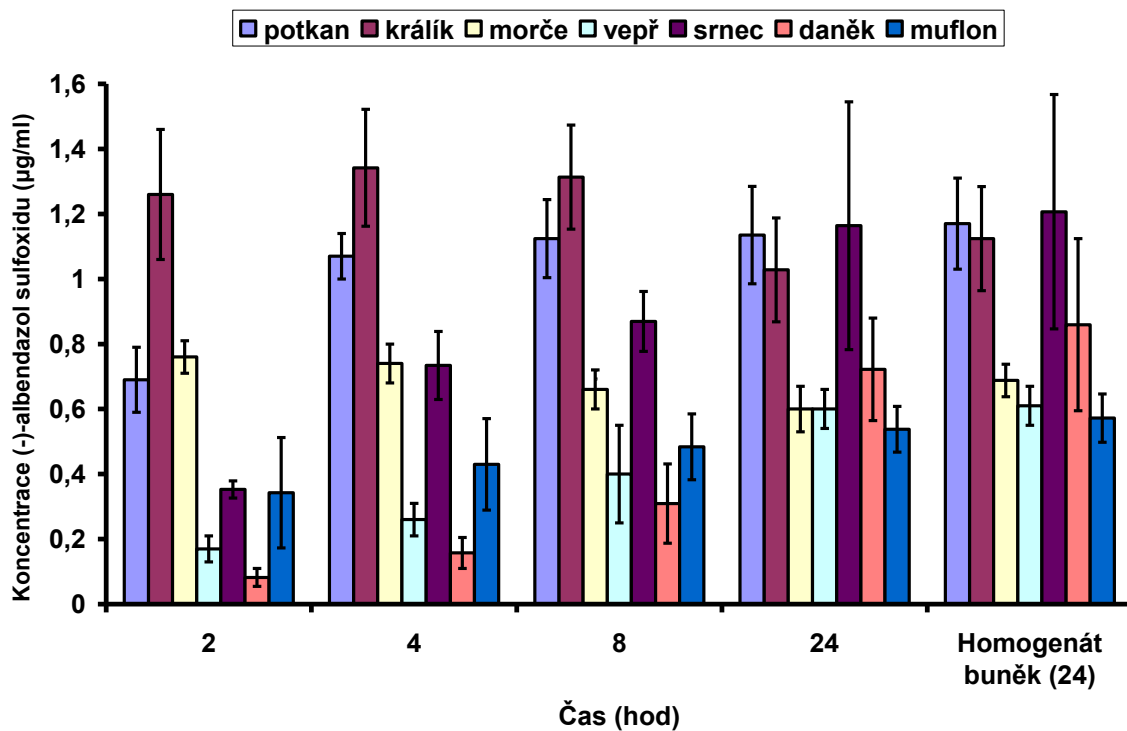
Graf 6: Koncentrace albendazol sulfoxidu v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.



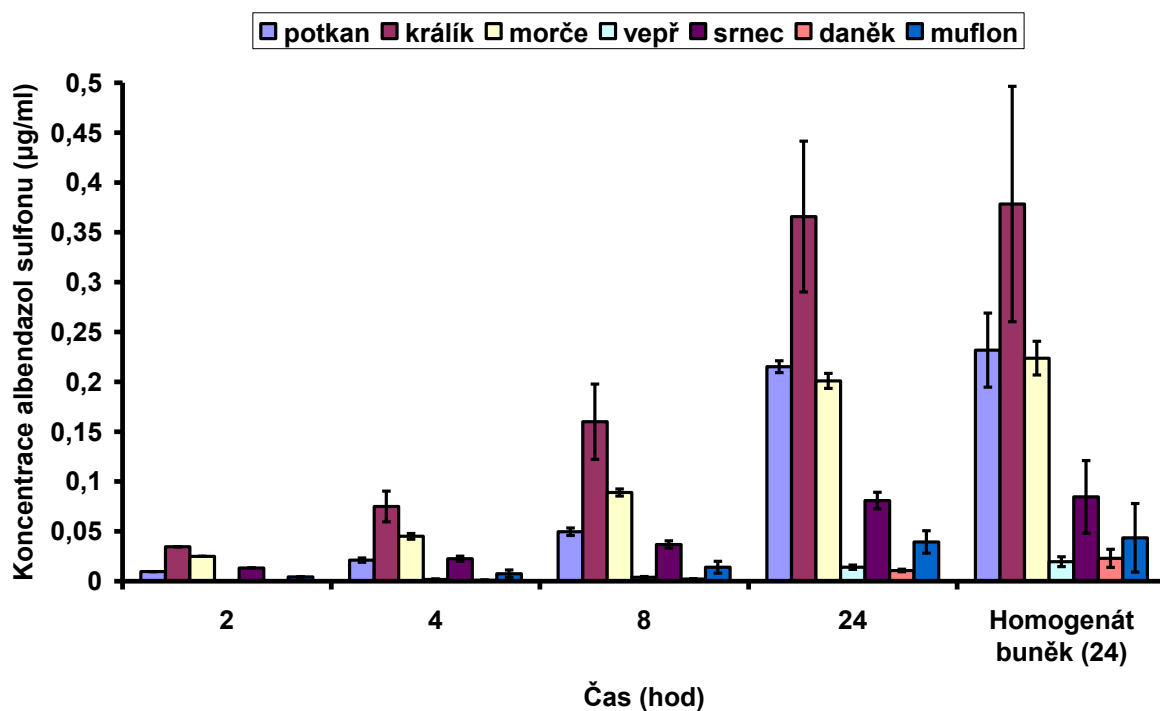
Graf 7: Procentuální zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.



Graf 8: Koncentrace (+)-albendazol sulfoxidu v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.



Graf 9: Koncentrace (-)-albendazol sulfoxidu v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.



Graf 10: Koncentrace albendazol sulfonu v kultivačním médiu v intervalech odběru u jednotlivých druhů zvířat.

IV.3.

Porovnat jaterní mikrosomální biotransformaci albendazolu u hospodářských a volně žijících zvířat, včetně kastrátů hospodářských zvířat.

Velík, J., Baliharová, V., Skálová, L., Szotáková, B., Wsól, V. and Lamka, J.: Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2005; 28, 377-384. (Příloha 2)

Naším hlavním záměrem bylo porovnání jaterní biotransformace u co nejširšího souboru zvířecích druhů u nichž je albendazol klinicky využitelný. V provedení této studie s využitím popisu metabolismu *in vivo* nebo *in vitro* metody izolovaných hepatocytů jsme byli limitováni jak dostupností, tak ekonomickými a časovými hledisky, na které jsou tyto metody náročné. Naše možnosti nám však dovolily provést srovnávací studii na jiném *in vitro* systému. Ze znalosti biotransformace albendazolu jsme zvolili porovnání biotransformace albendazolu na subcelulární úrovni, tj. na mikrosomální úrovni. Mikrosomy sice postrádají komplexní funkční integritu vitální buňky, obecně jsou ale považovány za model schopný dobře popsat metabolické děje realizované na blanách hladkého endoplasmatického retikula, včetně metabolismu albendazolu (Lanusse a kol., 1993). Jde o využití subcelulárního kompartmentu buňky, reprezentujícího převážně hladké endoplasmatické retikulum, resp. partikule vytvořené z blan hladkého endoplasmatického retikula. Při vhodné separaci z buňky lze zachovat aktivitu přítomných enzymů, včetně FMO a CYP450. Mikrosomy jsou nejčastěji připravovány z homogenátu buněk frakční centrifugací. Mikrosomální frakci reprezentuje sediment při 105 000 g. V přítomnosti vhodných koenzymů jsou mikrosomy schopny metabolizovat xenobiotika, včetně albendazolu (viz. Kapitola II.4.). Studium vlivu diety na aktivitu mikrosomálních enzymů a biotransformaci albendazolu provedl touto metodou již dříve Virkel a kol. (2000) a zjistil, že nalezené

závislosti jsou velmi dobře reprodukovatelné, tj. schopné předurčit situaci *in vivo*.

K porovnání byli použiti pohlavně dospělí jedinci příslušného druhu v období mimo říji a příslušní kastráti hospodářských zvířat ve věku nekastrovaných. Zvířata podléhala obvyklému chovatelskému režimu hospodářských, farmových a oborních chovů, či byla součástí běžných populací volně žijící zvěře. Vzorky jater, následně použité k separaci mikrosomů, byly zajištěny do 5 minut od smrti zvířete, neprodleně zmrazeny v tekutém dusíku a po dopravení do laboratoře uchovávány dlouhodobě při teplotě -80°C . Metodika přípravy jaterní mikrosomální frakce detailně popsaná v příslušné práci byla použita pro všechny druhy. Izolované mikrosomy byly také uchovávány při teplotě -80°C .

Za optimalizovaných podmínek byla sledována rychlost sulfoxidace albendazolu a sulfonace albendazol sulfoxidu při různé koncentraci substrátu. Sulfoxidace albendazolu byla sledována jak bez (vznik celkového albendazol sulfoxidu), tak s chirálním hlediskem (rozlišení vzniku jednotlivých enantiomerů). Při sledování sulfonace byla použita racemická směs albendazol sulfoxidu jako substrát. Inkubace byla provedena při teplotě 37°C za aerobních podmínek po dobu 30 minut. Ke vzájemnému porovnání druhů byly sestrojeny grafy závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu.

Porovnávány byly následující skupiny zvířecích species a jejich forem:

„beran“; samec ovce domácí; *Ovis ammon* f. *aries*, plemeno Texel,

„skopec“; kastrát samce ovce domácí; *Ovis ammon* f. *aries*, plemeno Texel,

„muflon“; samec ovce muflona; *Ovis musimon*,

„kozel“; samec kozy domácí; *Capra aegagrus* f. *hircus*, plemeno Česká bílá ušlechtilá,

„hňup“; kastrát kozy domácí; *Capra aegagrus* f. *hircus*, plemeno Česká bílá ušlechtilá,

„býk“; samec tura domácího; *Bos primigenius* f. *taurus*, plemeno Limousin,

„kanec“; samec prasete domácího; *Sus scrofa* f. *domestica*, plemeno Landrace,

„vepř“; kastrát prasete domácího; *Sus scrofa* f. *domestica*, plemeno Landrace,

„kňour“; samec prasete divokého; *Sus scrofa*,

„srnec“; samec srnce obecného; *Capreolus capreolus*,

„daněk“; samec daňka evropského; *Dama dama*,

„jelen“; samec jelena lesního; *Cervus elaphus*.

Od každé skupiny bylo zajištěno minimálně 5 jedinců a měření bylo provedeno minimálně v tripletu od každé koncentrace substrátu.

Prvním porovnávaným parametrem byla rychlost reakce celkové sulfoxidace albendazolu na sumu enantiomerů albendazol sulfoxidu. Na grafu 11 lze porovnat aktivitu jednotlivých skupin zvířat. Je patrná nízká sulfoxidace albendazolu u všech studovaných jelenovitých, tedy srnce, jelena i daňka. Ta kontrastuje s vysokou aktivitou berana, skopce i muflona. Lze vysledovat podobnost aktivity muflona a berana, stejně tak jako kance a kňoura. Porovnáme-li kastráty a intaktní samce je u skopce pozorována signifikantně rychlejší přeměna albendazolu na albendazol sulfoxid než u berana, u dvojic kozel-hňup a kanec-vepř není rozdíl natolik vyznačen, aby se dalo hovořit o signifikantním rozdílu. Nutno dodat, že aktivita skopce dosahuje pouze přibližně 1,1 násobku aktivity berana, praktické dopady této difference jsou spíše nepravděpodobné. Naopak nízká aktivita jelenovitých, dosahující přibližně 1/2 aktivity kozla či 1/4 aktivity berana, může mít i praktické dopady do úpravy dávkování anthelmintika.

Po chirálním odlišení enantiomerů albendazol sulfoxidu bylo nejprve porovnáno procentuální zastoupení jednotlivých enantiomerů. Na grafu 12 je zaznamenán procentuální podíl (+)-albendazol sulfoxidu v závislosti na koncentraci substrátu. Tradiční hospodářské druhy přednostně tvoří (+)-albendazol sulfoxid, zatímco stejný enantiomer je u srnce, daňka a jelena zastoupen výrazně omezeněji. Mezi skopcem a beranem, stejně tak jako mezi kozlem a hňupem nebyly nalezeny rozdíly. Ve dvojici kanec a vepř bylo nalezeno vyšší zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu u kance. Pro hospodářské druhy souhlasí naše výsledky s dříve publikovanými daty z *in vivo* studií, a navíc, u vzájemně si odpovídajících zvířecích druhů se podobají i výsledky získané na úrovni hepatocytů a mikrosomů. Stereospecifické zaměření biotransformace podporuje myšlenku o dominantní účasti systému jaterních

mikrosomálních monooxygenás na metabolismu albendazolu. Mikrosomy srnce a daňka prokázaly shodnou stereospecificitu jako izolované hepatocyty (viz. kapitola IV.2), tedy vyprodukovaly přebytek (-)-enantiomeru. Výjimečnost jelenovitých druhů v tomto parametru potvrdil i jelen se zastoupením 40% (+)-ABZSO a 60% (-)-ABZSO.

Na grafech 13 a 14 je vyjádřena závislost stereospecifické reakční rychlosti vzniku (+)-albendazol sulfoxidu a (-)-albendazol sulfoxidu na koncentraci substrátu (albendazolu). Na grafu 13 je odhalena široká variace mezi studovanými druhy. Rozložení druhů je podobné jako na grafu 12, je však širší, hodnoceno jako kalkulovaný poměr nejvyšší a nejnižší hodnoty reakční rychlosti při nejvyšší koncentraci substrátu, tedy skopec/srnec= 17. Je zde patrná velmi nízká aktivita jelenovitých druhů, a naopak vysoká rychlost sulfoxidace zástupců rodů ovce a prase. Velkým překvapením jsou takřka shodné charakteristiky rychlosti sulfoxidace albendazolu na (-)-albendazol sulfoxid (graf 14). Mezi druhy nejsou více jak dvojnásobné rozdíly v reakční rychlosti. Rozdíly jsou výrazně nižší než mezidruhové rozdíly zaznamenané na úrovni celkové sulfoxidaci albendazolu či vzniku (+)-enantiomeru albendazol sulfoxidu. Je tedy pravděpodobné, že kapacita jedné části oxidace albendazolu je u jelenovitých porovnatelná s hospodářskými druhy, zatímco druhá část je u těchto species inhibována, nebo je její kapacita fyziologicky nižší. V důsledku má jednostranně nižší kapacita sulfoxidace u jelenovitých druhů vliv i na nižší celkovou rychlost sulfoxidace.

Studován byl i následující krok biotransformace albendazolu, oxidace albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon (graf 15). Jde o deaktivální krok, který se uplatňuje i *in vivo*. Dřívější studie tuto reakci charakterizovaly jako nevratnou a oproti předchozí i pomalejší. Naše závěry potvrzují, že se opravdu jedná o řádově pomalejší reakci. Jediným druhem, odlišujícím se výrazně od ostatních je býk. Jeho aktivita je přibližně dvakrát až třikrát vyšší než aktivita všech ostatních druhů, které se mezi sebou jinak významně neliší. Pozornost si ve spojení s touto reakcí zaslouží vyšší rychlost sulfonace u kance než u vepře.

V publikaci byly, na přání redakce, grafy presentovány zjednodušeně pouze pro jednu koncentraci substrátu.

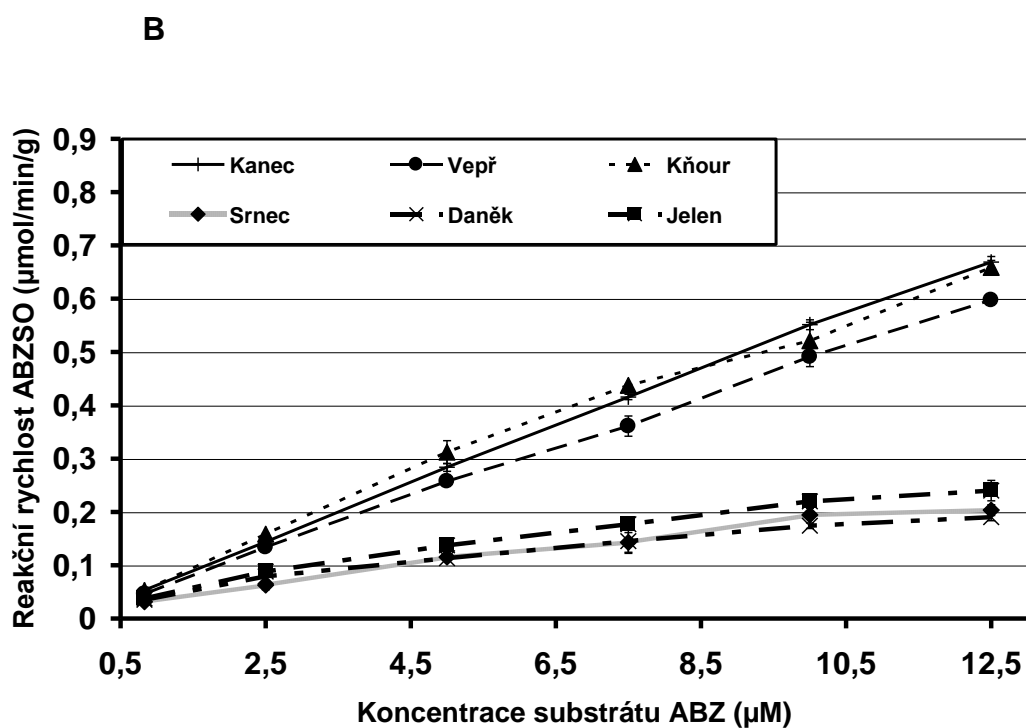
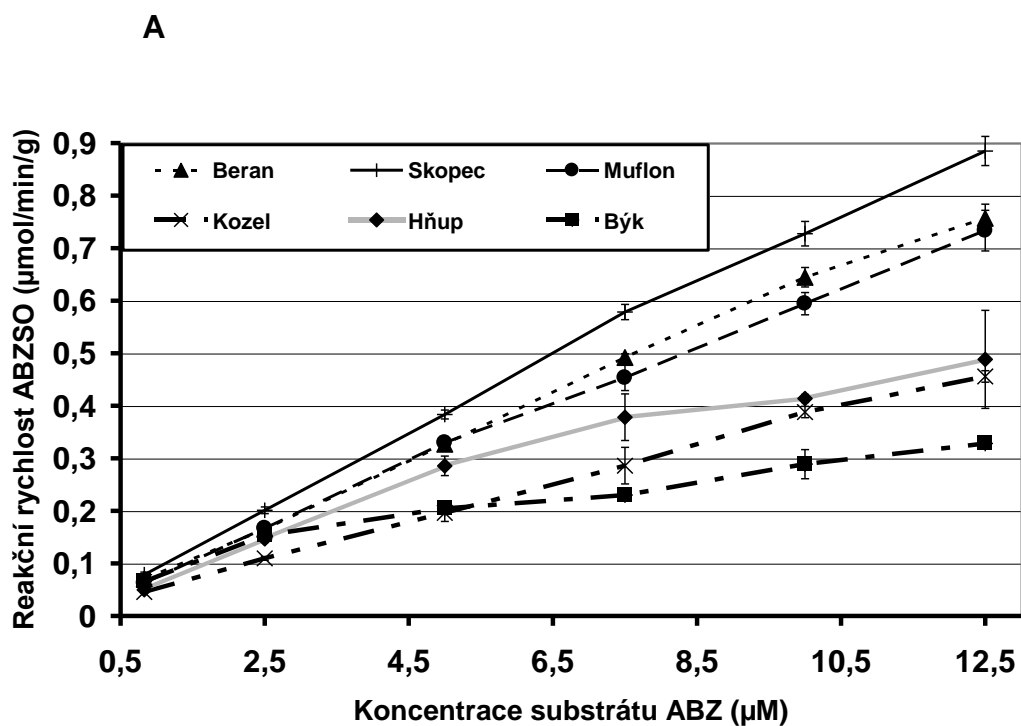
Představená studie demonstruje mezidruhové rozdíly v metabolismu albendazolu *in vitro*. U několika druhů, ze souboru námi sledovaných, byly již

farmakokinetické parametry stanoveny *in vivo*. Mezi tyto druhy patří ovce, koza, skot a prase. Rozdíly mezi druhy se odrážejí v rozdílné farmakokinetice a to reflektuje lišící se obvyklé dávky orálně podávaného léčiva. Nejvyšší dávkování 10 mg/kg je používáno u skotu a prasete, střední dávka 7,5 mg/kg je podávána koze a nejnižší dávky 4,75 mg/kg se podávají ovci. Při tomto dávkování jsou maximální plasmatické koncentrace albendazol sulfoxidu v rozmezí 1,0 až 1,2 µg/ml, liší se však v AUC tohoto metabolitu. Velikost AUC koreluje s námi nalezenými rozdíly v aktivitách mikrosomálních enzymů. Stanovené AUC se snižují v pořadí ovce>koza=prase>skot. Rozdíly v mikrosomální sulfoxidaci albendazolu stanovené v naší studii jsou velmi podobné ovce>prase>koza>skot. AUC albendazol sulfonu bylo *in vivo* při výše zmíněném dávkování takřka shodné u ovce, kozy a prasete, zatímco AUC u skotu bylo asi dvojnásobné. Mikrosomální aktivity opět velmi přesně korelují s těmito charakteristikami. Třetí shodnou veličinou mezi *in vivo* a *in vitro* situací je zastoupení jednotlivých enantiomerů. Izolované hepatocyty i mikrosomální frakce jaterní tkáně realizují oxidaci albendazolu ve stereospecifickém poměru dříve nalezeném *in vivo*. Oproti situaci *in vivo*, kde se v čase zvyšuje relativní zastoupení (+)-albendazol sulfoxidu, je poměr enantiomerů *in vivo* (mikrosomy i hepatocyty) stabilní. Naše hodnoty pak nejlépe korelují s hodnotami v prvních desítkách hodin. *In vivo* popsané odlišnosti lze vysvětlit účastí další stereospecifické, či stereoselektivní reakce do metabolické dráhy albendazolu, účastí jiné tkáně s odlišnou stereospecificitou, či účastí transportních a exkretčních mechanismů s vlastní enantiospecifickou charakteristikou. Tuto domněnku potvrzují pozorování provedené na mikrosomech ovce a skotu provedené Virkelem a kol. (2004). Autoři zjistili odlišnou stereospecificitu sulfoxidace albendazolu v játrech, ledvinách a tenkém střevě. I naše studie na mikrosomech z tenkého střeva a jater muflona (viz dále, kapitola IV.4.) potvrzuje rozdíly v tomto parametru mezi tkáněmi. Dalším důkaz poskytuje studie potvrzující stereospecificitu exkrece albendazol sulfoxidu ledvin člověka (Lanchote a kol., 2004).

Lze tedy říci, že *in vitro* jaterní biotransformace koreluje s hodnotami celkové farmakokinetiky *in vivo*. Proto u druhů, kde lze naše studie považovat za pionýrské, tedy u kastrátů a jelenovitých druhů, můžeme z našich závěrů předpovědět situaci *in vivo*. Například nelze předpokládat významný vliv

kastrace na plasmatické hladiny metabolitů albendazolu, u volně žijících druhů (muflon, divoké prase) lze doporučit dávkování léčiva pro odpovídající hospodářské druhy (ovce, prase domácí). Zcela zásadní výsledky spatřujeme v unikátní charakteristice metabolismu albendazolu u jelenovitých druhů. U všech třech zástupců (srnec, daněk, jelen) jsme našli velmi nízkou rychlost stereospecifické sulfoxidace albendazolu na (+)-albendazol sulfoxid, proto jsou plasmatické koncentrace velmi těžko odhadnutelné, a navíc, pokud se potvrdí rozdílná farmakodynamika enantiomerů albendazol sulfoxidu, jejich odlišný poměr v plasmě by mohl ovlivnit i účinnost orálně podávaného albendazolu.

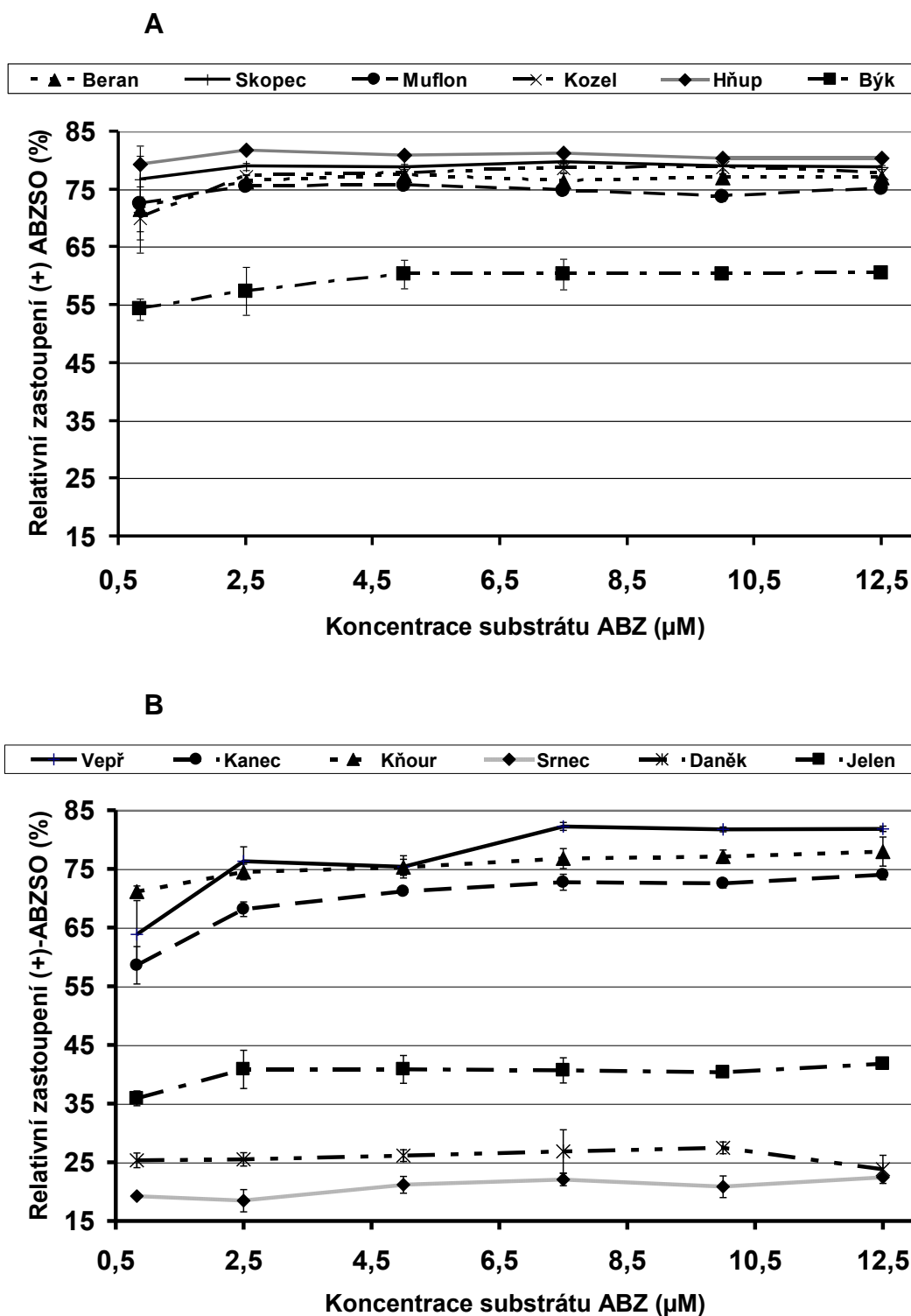
Modelová látka albendazol a nalezené výsledky dovolují i širší zobecnění získaných výsledků. Je totiž všeobecně přijímáno, že albendazol podléhá sulfoxidaci minimálně dvou systémů s odlišnou stereospecifitou. Dle Moroni a kol., (1995) je (+)-albendazol sulfoxid produktem katalýzy FMO, zatímco vznik (-)-albendazol sulfoxidu je spojen se systémem CYP450 (pravděpodobně různých isoform). Za sulfonaci albendazol sulfoxidu je pravděpodobně odpovědná pouze 1A1/2 isoforma CYP450. Sledováním vzniku (+)-albendazol sulfoxidu můžeme tedy jelenovité druhy považovat za species s pravděpodobně velmi nízkou aktivitou FMO, což kromě albendazolu může výrazně modifikovat farmakokinetiku i jiných léčiv. V našem pokusu byly mikrosomy z jater býka charakterizovány jako nejaktivnější v přeměně albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon, podobně jako 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD-specifický substrát pro CYP450 1A1/2) byla vyšší ve srovnání s beranem, kozlem i vepřem (Szotáková a kol., 2004). Z toho lze pro býka předpovědět vyšší jaterní clearance léčiv, která jsou substráty tohoto enzymu.



Graf 11. Závislost reakční rychlosti celkové sulfoxidace (vznik sumy-albendazol sulfoxidu (ABZSO) v závislosti na koncentraci substrátu albendazolu (ABZ).

A- skopec, beran, muflon, kozel, hňup, býk.

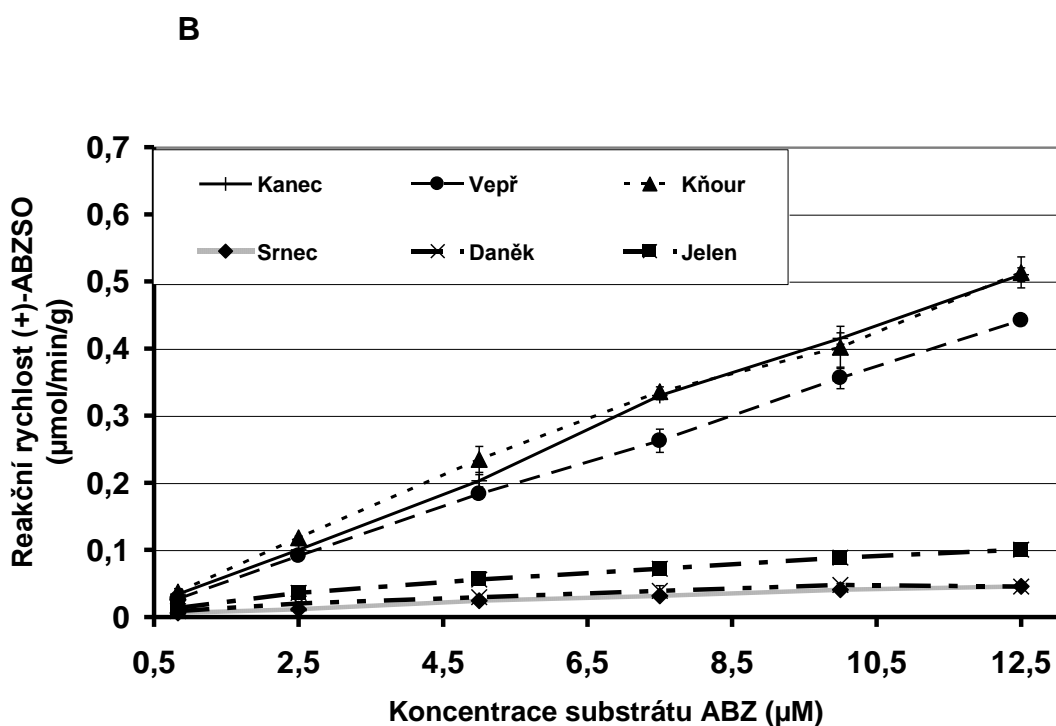
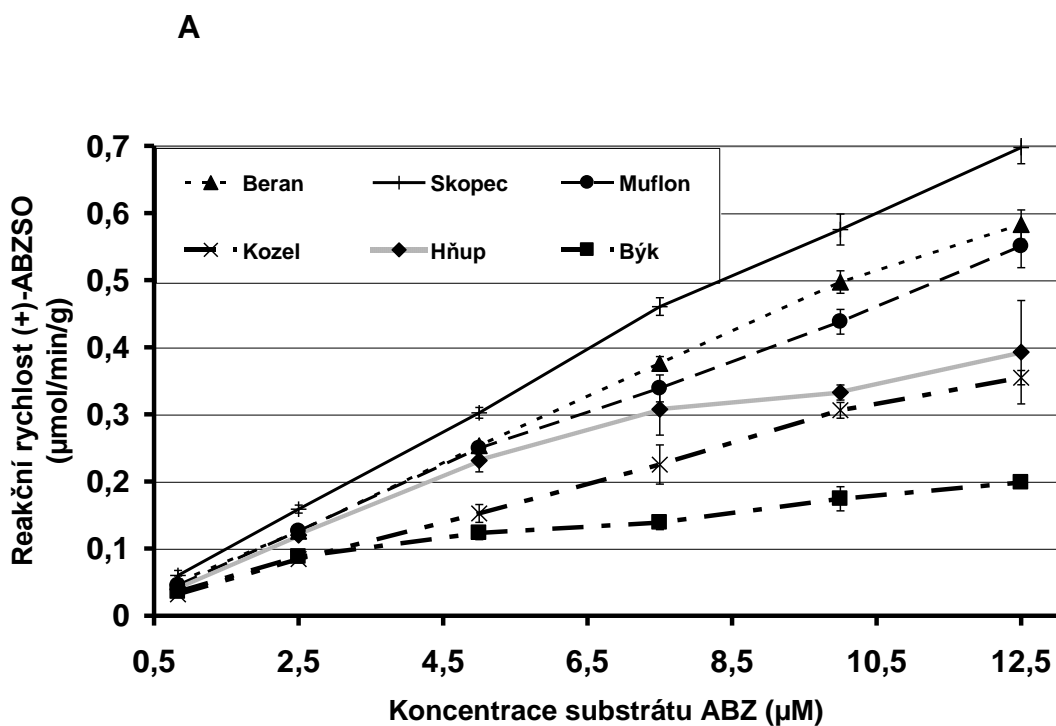
B- jelen, daněk, srnec, vepř, kňour, kanec.



Graf 12. Procentuální zastoupení vzniklého (+)-albendazol sulfoxidu ((+)-ABZSO) v závislosti na koncentraci substrátu albendazolu (ABZ).

A- skopec, beran, muflon, kozel, hňup, býk.

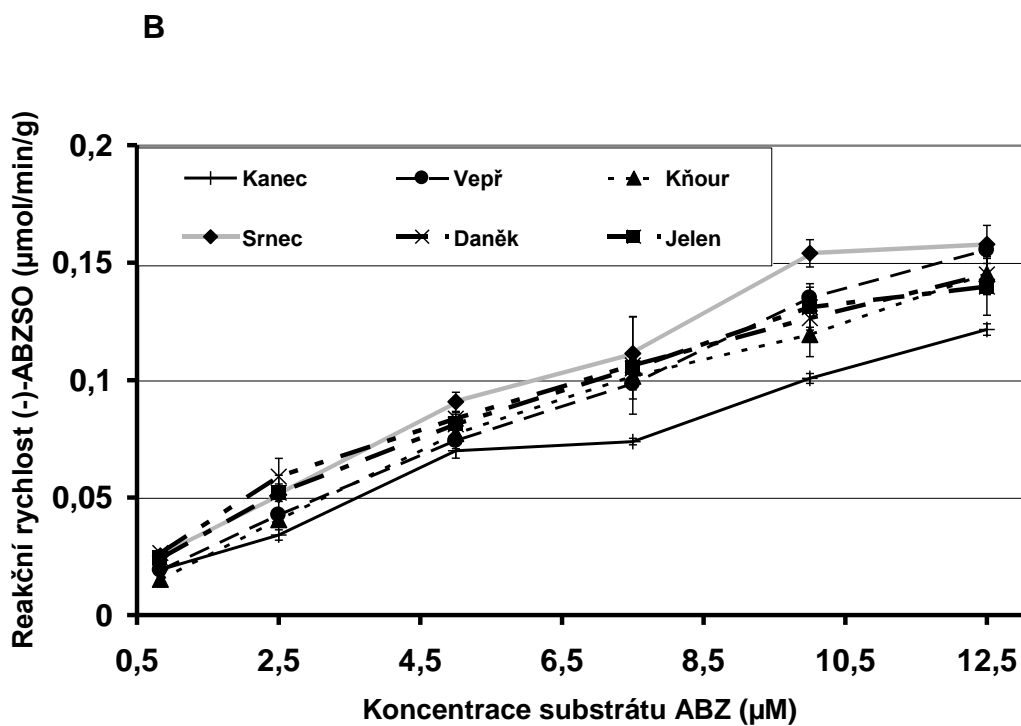
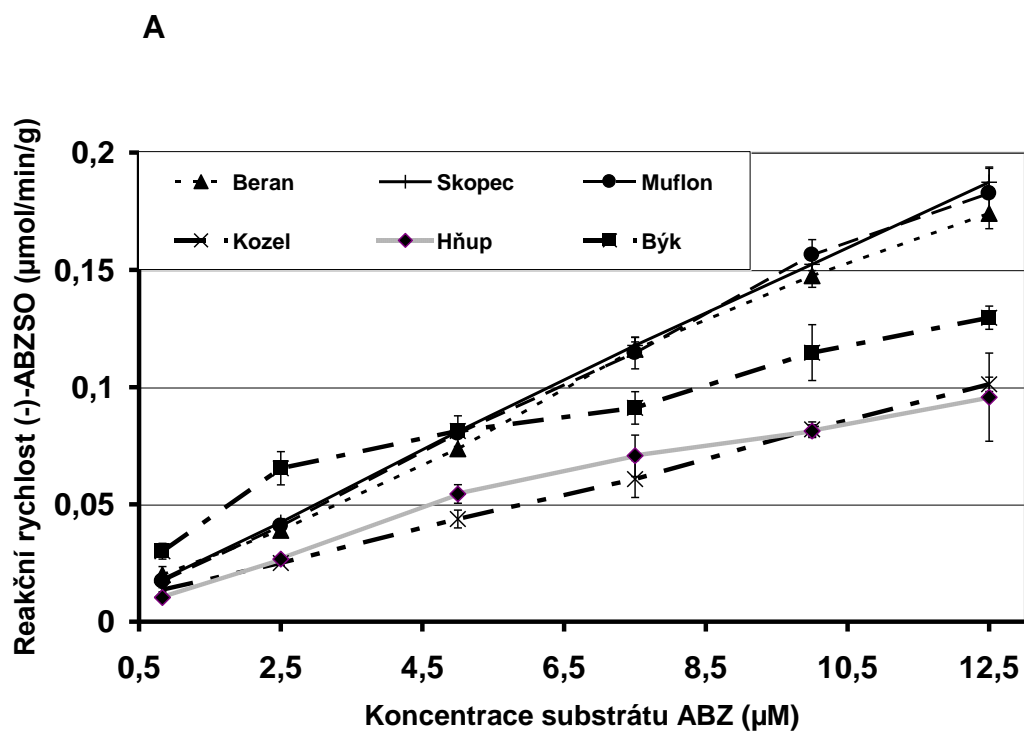
B- jelen, daněk, srnec, vepř, kňour, kanec.



Graf 13. Závislost reakční rychlosti sulfoxidace albendazolu na (+)-albendazol sulfoxid ((+)-ABZSO) v závislosti na koncentraci substrátu albendazolu (ABZ).

A- skopec, beran, muflon, kozel, hňup, býk.

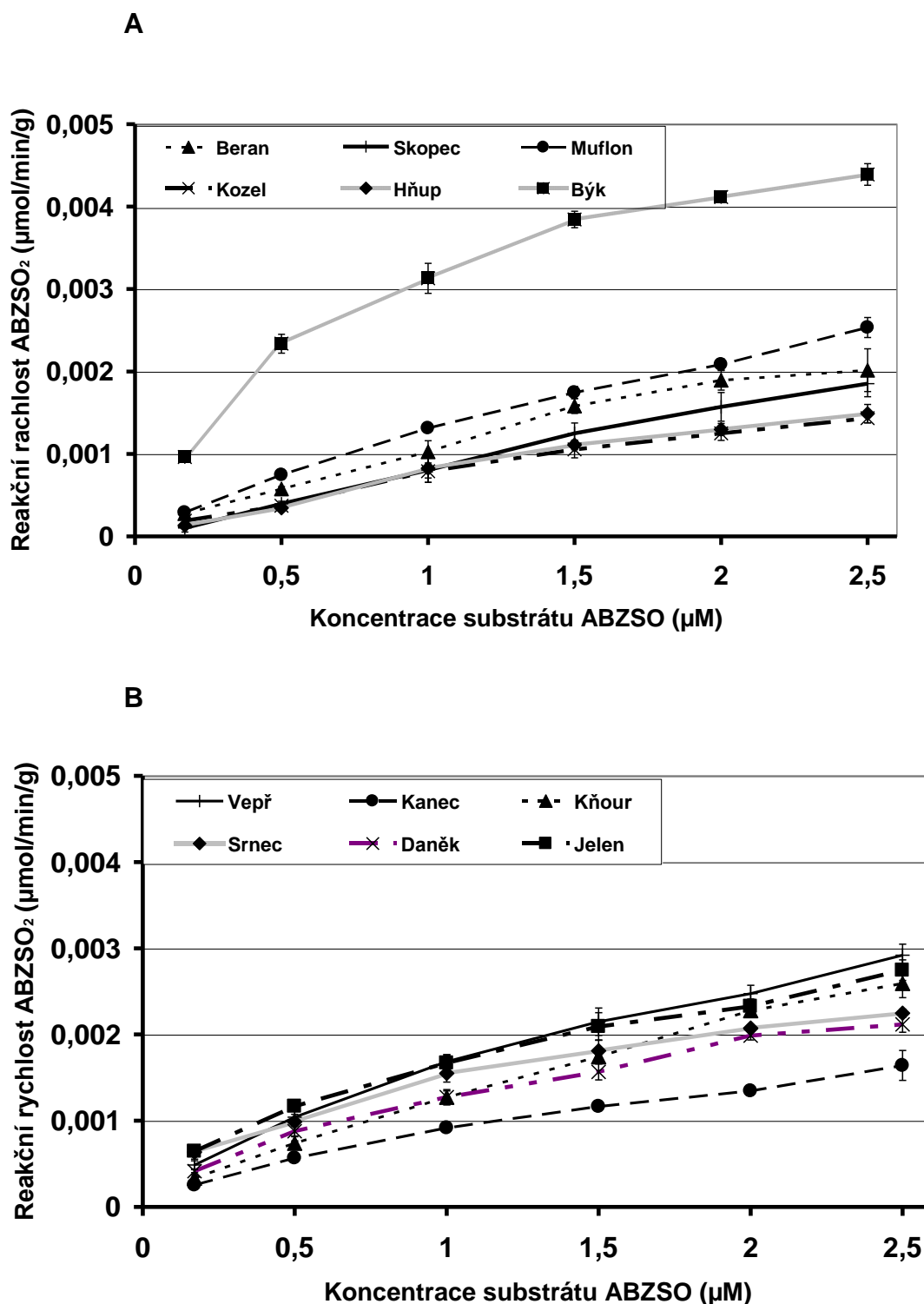
B -jelen, daněk, srnec, vepř, kňour, kanec.



Graf 14. Závislost reakční rychlosti sulfoxidace albedazolu na (-)-albedazol sulfoxid ((-)-ABZSO) v závislosti na koncentraci substrátu albedazolu (ABZ).

A- skopec, beran, muflon, kozel, hňup, býk.

B -jelen, daněk, srnec, vepř, kňour, kanec.



Graf 15. Reakční rychlost sulfonace albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon (ABZSO₂) v závislosti na koncentraci substrátu albendazol sulfoxidu (ABZSO ve formě racemátu).

A- skopec, beran, muflon, kozel, hňup, býk.

B- jelen, daněk, srnec, vepř, kňour, kanec.

IV.4.

Ověřit modulační (indukční/inhibiční) účinky albendazolu na aktivitu CYP450 1A a CYP450 3A a biotransformaci albendazolu u muflona *in vitro* a *in vivo*. Ověřit vliv probíhající jaterní parazitózy na aktivitu jaterních biotransformačních enzymů.

Velik, J., Baliharova, V., Fink-Gremmels, J., Bull, S., Lamka, J. and Skalova, L.: Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. Research in Veterinary Science 2004; 76, 95-108. (Příloha 3)

Při studiu léčiv obsahujících benzimidazolové jádro jsme zjistili, že existuje mnoho důkazů o vlivu těchto léčiv na aktivitu biotransformačních enzymů. Jelikož se tímto problémem šířeji zabývají hlavně humánní farmakologové, je nejvíce průkazů enzymatické indukce a inhibice spojeno s užíváním inhibitorů protonové pumpy, omeprazolu, lansoprazolu, pantoprazolu a rabeprazolu. Zejména indukční potenciál omeprazolu je velmi dobře charakterizovaný u laboratorních zvířat, člověku i rozličných buněčných kultur. Dokonce některé klinické interakce omeprazolu jsou dávány do souvislosti se změnou aktivity mikrosomálních enzymů. Albendazol, léčivo převážně veterinární praxe, byl paradoxně testováno na indukční vlastnosti také humánními farmakology. Bylo provedeno několik studií na laboratorních zvířatech (potkan, králík), či buněčných kulturách, kde se prokázalo, že albendazol je schopen indukce některých isoform CYP450 (zejména pak CYP450 1A1/2). Připomeňme, že CYP450 1A1/2 se přímo účastí biodegradace albendazolu, čímž by možná indukce neznamenal pouze nežádoucí urychlení metabolismu současně nebo následně podávaných léčiv, ale i klinicky závažné urychlení vlastní biotransformace. Pohled veterinárních farmakologů se indukcí zabýval pouze okrajově. Enzymatickou indukcí byla například vysvětlována změna farmakokinetiky po opakovaném, či kontinuálním podání (Galtier 1991). Žádná z prací doposud nesměřovala přímo k průkazu enzymatické indukce u cílového zvířete, proto jsme se o toto chtěli pokusit my. Muflon se nám stal dostupným modelem splňujícím všechna kritéria. Jde o druh volně žijící,

chovaný v oborách i farmových chovech. Muflon je vnímavý k širokému spektru gastrointestinálních i jaterních parazitóz, z nichž většina je též řazena k častým parazitům ovce domácí. S ovci domácí je dokázána genetická příbuznost, my jsme nadto také prokázali vysokou shodu v metabolických parametrech biotransformace albendazolu (viz kapitola IV.1, IV.2, IV.3). Dlouhodobě také studujeme účinnost albendazolu v antiparazitární terapii střevních, plicních a jaterních helmintóz. V léčbě střevních a plicních parazitóz jsme našli vysokou účinnost albendazolu podávaného již v dávkách 5 × 3 mg/kg ž. hm., pro léčbu jaterní motoličnatosti, způsobené původcem *D. dendriticum*, je potřebná dávka vyšší 5 × 7,5 mg/kg ž. hm nebo 1 × 30 mg/kg ž. hm., podávané *per os*. Pokud nás v souvislosti s léčbou jaterní motoličnatosti zajímá fenomén enzymatické indukce, nemohli jsem pominout, že změny aktivit mikrosomálních enzymů mohou být v souvislosti s probíhající parazitózou. Zdá se, že zejména infekce parazita v jaterní tkáni dokáže ovlivnit funkční parametry jaterní biotransformace. Vzhledem k dostupnosti dvou chovů muflonů zvěře s i bez dlouhodobého výskytu motolice kopinaté *D. dendriticum*, jsme zvířata zdravá a nemocná porovnali v několika parametrech jaterních mikrosomálních aktivit.

IV.4.1. Indukční vliv albendazolu na CYP450 1A a CYP450 3A u muflona a potkana in vitro

Baliharová, V., Velík, J., Lamka, J., Balarinová, R. and Skálová, L.: The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat Research in Veterinary Science 2003; 75, 231-239. (Příloha 4)

Ke studiu indukčních účinků albendazolu na cytochromy P450 u muflona byly zvoleny jako *in vitro* modelový systém primární kultury mufloních hepatocytů. Pro ověření funkčnosti našeho modelu jsme souběžně provedli stejné studie i u potkana, kde jsme dle literární rešerše indukci předpokládali. Vedle albendazolu byly testovány také jeho dva hlavní metabolity, albendazol sulfoxid a albendazol sulfon a to s cílem zjistit, která z látek je zodpovědná za indukční účinky léčiva. Hepatocyty obou druhů byly 48 hodin inkubovány se studovanými benzimidazoly (v použitých koncentracích 0,2-25,0 μM) a poté

byly měřeny CYP450 1A a CYP450 3A aktivity (sledování přeměny specifických substrátů ethoxyresorufin-O-dealkylace-EROD a benzoxyresorufin-O-dearylace-BROD), stanoveno bylo také množství CYP450 1A a CYP450 3A proteinů metodou western-blotting. Během inkubace hepatocytů s testovanými léčivy byl také sledován metabolismus albendazolu (v intervalech 0, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin byly odebírány vzorky na HPLC analýzu albendazolu a jeho metabolitů v kultivačním mediu).

Všechny tři formy albendazolu vykazovaly silný indukční účinek na potkaní CYP450 1A i CYP450 3A. HPLC analýza ukázala velmi rychlou biotransformaci ABZ, neboť již po 8 hodinách inkubace bylo v mediu detekováno jen nepatrné množství parentní látky (kapitola IV.1). Hlavní podíl představoval albendazol sulfoxid, množství následně vznikajícího albendazol sulfonu bylo oproti albendazol sulfoxidu podstatně menší. Proto lze zodpovědnost za indukční vliv léčiva přisoudit především albendazol sulfoxidu, s malou spoluúčastí albendazol sulfonu.

Na rozdíl od potkana, u muflona nebyla zjištěna terapeuticky významná indukce CYP450 1A ani CYP450 3A. Výsledky jasně demonstrují mezidruhové rozdíly v odezvě na shodné induktory, zároveň podporují i argumentaci ve prospěch realizace indukčních studií pouze na cílových species.

IV.4.2. Inhibice CYP450 1A a CYP450 3A u muflona a potkana albendazolem

Baliharová, V., Velík, J., Fimanová, K., Lamka, J., Szotáková, B. and Skálová, L.: The inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro. Pharmaceutical Reports 2005; 57, 97-106.(Příloha 5)

Výsledky našich předchozích studií (viz. kapitoly IV.4. a IV.4.1.) poukázaly na silné indukční účinky ABZ na CYP450 1A a CYP450 3A v potkaních hepatocytech. V těchto studiích byla pozorována nelineární závislost indukční odezvy na koncentraci albendazolem. Je třeba zdůraznit, že během příslušných inkubací s albendazolem nebylo zjištěno žádné cytotoxické působení tohoto léčiva na hepatocyty. Jedna z navržených hypotéz pro

vysvětlení nelinearity indukce byla založena na možném inhibičním vlivu albendazolu (nebo jeho metabolitů) na testované enzymy. Podporuje ji také zmínka o inhibičním působení fungicidních léčiv s imidazolovým kruhem ve struktuře na CYP450 3A (Anzenbacherová a Anzenbacher 1999). Pro ověření naší hypotézy byla provedena rozsáhlá inhibiční studie s albendazolem a jeho metabolity (albendazol sulfoxidem a sulfonem), ve které byly měřeny aktivity CYP450 1A a CYP450 3A (EROD a BROD) po 30 sekundové preinkubaci potkaních mikrosomů s těmito benzimidazoly (1, 5 a 25 μM). Inhibice zmíněných aktivit byla otestována také u muflona.

Albendazol a jeho první metabolit, albendazol sulfoxid, se projevily jako výrazné inhibitory měřených CYP450 aktivit jak u potkana, tak u muflona, zatímco následný metabolit albendazol sulfon nevykazoval žádný inhibiční vliv na testované CYP450 aktivity ani u jednoho species. Zjištěná inhibice byla podstatně větší u muflona (v porovnání s potkanem).

V článku jsou prezentována grafická znázornění jednotlivých inhibovaných reakcí, včetně určení typu inhibice, dále také kinetické a inhibiční konstanty a hodnoty IC_{50} (inhibiční konstanta). Většina inhibic popsaných v naší studii by neměla mít závažné (pokud vůbec nějaké) klinické důsledky, neboť plasmatické koncentrace testovaných benzimidazolů jsou podstatně nižší než stanovené hodnoty IC_{50} a K_i . Za terapeuticky významnou lze však považovat inhibici CYP450 1A u muflona. Ta by neměla negativně ovlivnit anthelmintickou aktivitu ABZ, naopak by na ni mohla mít podporující vliv. CYP450 1A se totiž významnou měrou podílí na metabolické deaktivaci albendazol sulfoxidu, který je nositelem anthelmintického účinku léčiva. Nicméně albendazol by mohl ovlivnit metabolismus případně jiných, současně podaných léčiv, na jejichž biotransformaci se podílí CYP450 1A (lékové interakce).

Podstatně důležitější je však zdůraznit skutečnost, že zatímco naše předchozí studie poukázaly na indukci CYP450 1A a CYP450 3A po působení albendazolu, v tomto projektu byly zjištěny inhibiční účinky albendazolu na zmíněné enzymy. Jedna látka tedy může působit současně jako induktor i jako inhibitor stejného enzymu. Indukce tak může být maskována současným inhibičním vlivem látky na tento enzym, a to především v *in vitro* experimentech.

Výsledky studie tedy potvrdily námi navrženou hypotézu o inhibičním vlivu albendazolu na CYP450. Tato zjištění by měla být vzata v úvahu při *in vitro* studiích indukčních účinků albendazolu na CYP a také při použití ABZ k terapii helmintóz u muflonů, případně ovce domácí.

Souhrnně se můžeme domnívat, že albendazol a jeho metabolity mohou významně modifikovat aktivitu jaterních monooxygenás, na druhou stranu si musíme přiznat nejednotnost získaných výsledků. Z pokusů realizovaných *in vitro* nelze jednoznačně říci, zda albendazol a jeho metabolity opravdu neindukují mufloní jaterní CYP450, či zda indukce byla překryta současnou inhibicí. V neposlední řadě čas naší studie, trvající 48 hodin, nemusel být pro projevení se změn v enzymatickém systému dostatečný. Naproti tomu jsme zcela zřetelně potvrdily druhové rozdíly v induktibilitě jaterních enzymů mezi laboratorním druhem a cílovým druhem.

IV.4.3. Indukční vliv albendazolu na aktivitu jaterních a střevních enzymů *in vivo*

Velík, J., Szotáková, L., Baliharová, V., Lamka, J., Šavlík, M., Wsól, V., Šnejdrová, E. and Skálová, L. Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in muflon (Ovis musimon). Research in Veterinary Science 2005; 78, 255-263. (Příloha 6)

Jednoznačný průkaz indukce lze odhalit pouze v pokusech *in vivo*. S tímto vědomím jsme se rozhodli provést takový pokus na skupině mufloní zvěře. Šesti muflonkám bylo pět po sobě následujících dnů aplikováno orální sondou 7,5 mg/kg ž.hm. albendazolu. Tři muflonky tvořily kontrolní skupinu, u které proběhly veškeré experimentální procedury bez aplikace léčiva. Podání albendazolu bylo prováděno vždy ve stejnou denní dobu, 24 hodin po každé dávce byl zajištěn vzorek krve. 24 hodin po poslední dávce byla zvířata utracena a byl zajištěn vzorek krve, žluče a obsahu bacheru. Vzorek tkáně jater a tenkého střeva byl odebrán do 5 minut od utracení, zmražen v tekutém dusíku a následně použit pro separaci mikrosomální frakce. Připravené

mikrosomy z jater i tenkého střeva byly inkubovány s albendazolem i albendazol sulfoxidem dle metodiky použité v kapitole IV.3. Po inkubaci byly stanoveny metabolity a byla stanovena rychlost sulfoxidace albendazolu i následné sulfonace. Sulfoxidace albendazolu byla opět charakterizována ve vztahu k chirálnímu charakteru tohoto procesu. Získané závislosti i hodnoty příslušných biochemických parametrů (V_{max} , K_m) byly porovnány mezi skupinami léčených a kontrolních zvířat.

Porovnání reakčních rychlostí celkové sulfoxidace albendazolu mezi mikrosomy z jater léčených a kontrolních zvířat neodhalilo žádný rozdíl (graf 16), stejně tak jako chirální rozdělení vzniklého albendazol sulfoxidu (graf 17). Je tedy zřejmé, že opakované podávání albendazolu neindukuje jaterní sulfoxidaci tohoto léčiva.

Rychlost stejné reakce sledované u mikrosomů izolovaných z tenkého střeva byla celkově mnohonásobně nižší než u mikrosomů z jater (graf 16). To dokumentuje omezenější schopnost střevní stěny metabolizovat albendazol na albendazol sulfoxid, z čehož je zřejmé, že podíl zde metabolizovaného léčiva bude pravděpodobně výrazně nižší než podíl léčiva biotransformovaného následně v játrech. Vzájemné porovnání skupin léčených a kontrolních odhalilo signifikantně vyšší aktivitu u léčených zvířat, s patrným rozdílem v rozdělení jednotlivých enantiomerů. Porovnáme-li tuto reakci v kontextu vzniku dvou enantiomerů, nalezneme signifikantní rozdíl pouze ve vzniku (-)-albendazol sulfoxidu, zatímco vznik (+)-albendazol sulfoxidu není mezi skupinami rozdílný (graf 16, 17). To naznačuje, že opakované podávání albendazolu indukuje střevní CYP450, katalyzující vznik (-)-albendazol sulfoxidu, zatímco vznik (+)-albendazol sulfoxidu, dle literatury zprostředkovaný FMO indukován není.

Vznik metabolitu, albendazol sulfonu, byl sledován a porovnán za identických podmínek pro jaterní i střevní mikrosomy skupiny léčených i kontrolních zvířat (graf 18). Bylo zjištěno, že u skupiny muflonek, kterým byl podáván albendazol, byla pozorována rychlejší přeměna albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon než u skupiny kontrolní. Na rozdíl od prvního kroku metabolické přeměny, který byl indukován pouze ve střevní tkáni, byl druhý krok ovlivněn jak ve střevě, tak v játrech léčených zvířat. Porovnáním aktivit střevní tkáně, došlo u léčených zvířat ke slabé indukci, zatímco v jaterní tkáni byla přeměna albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon přibližně trojnásobně

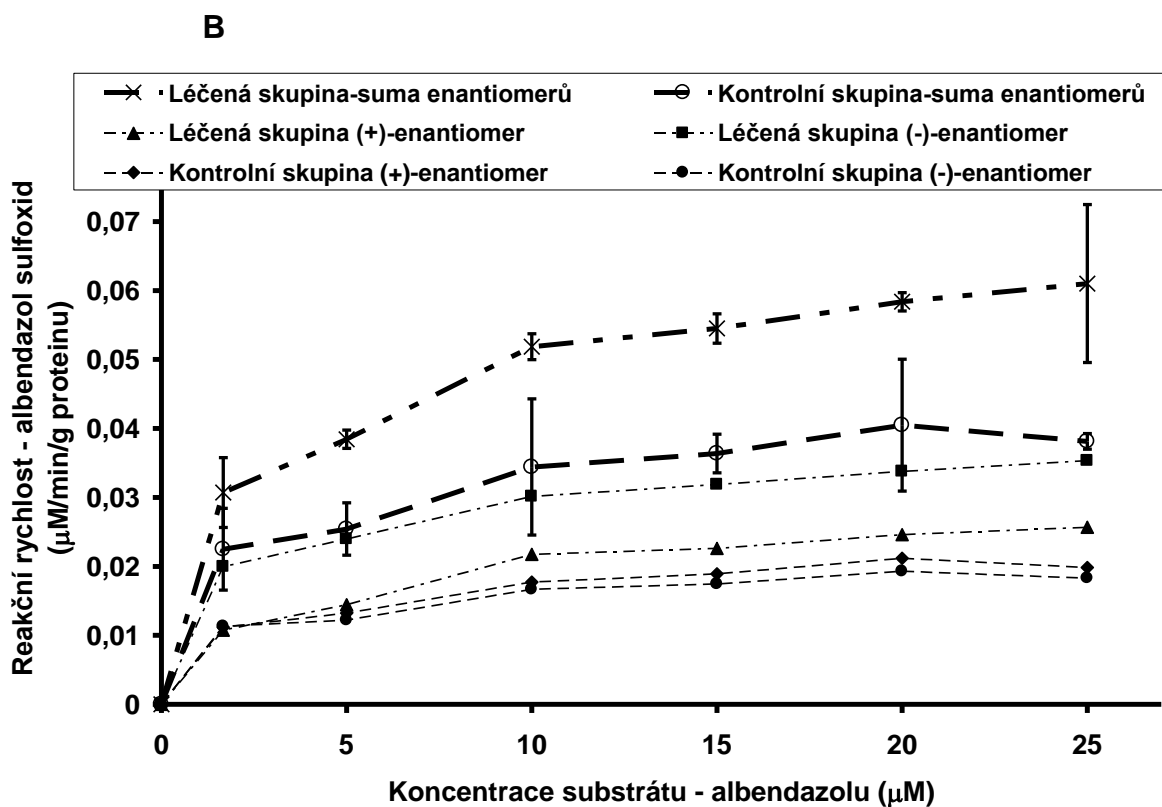
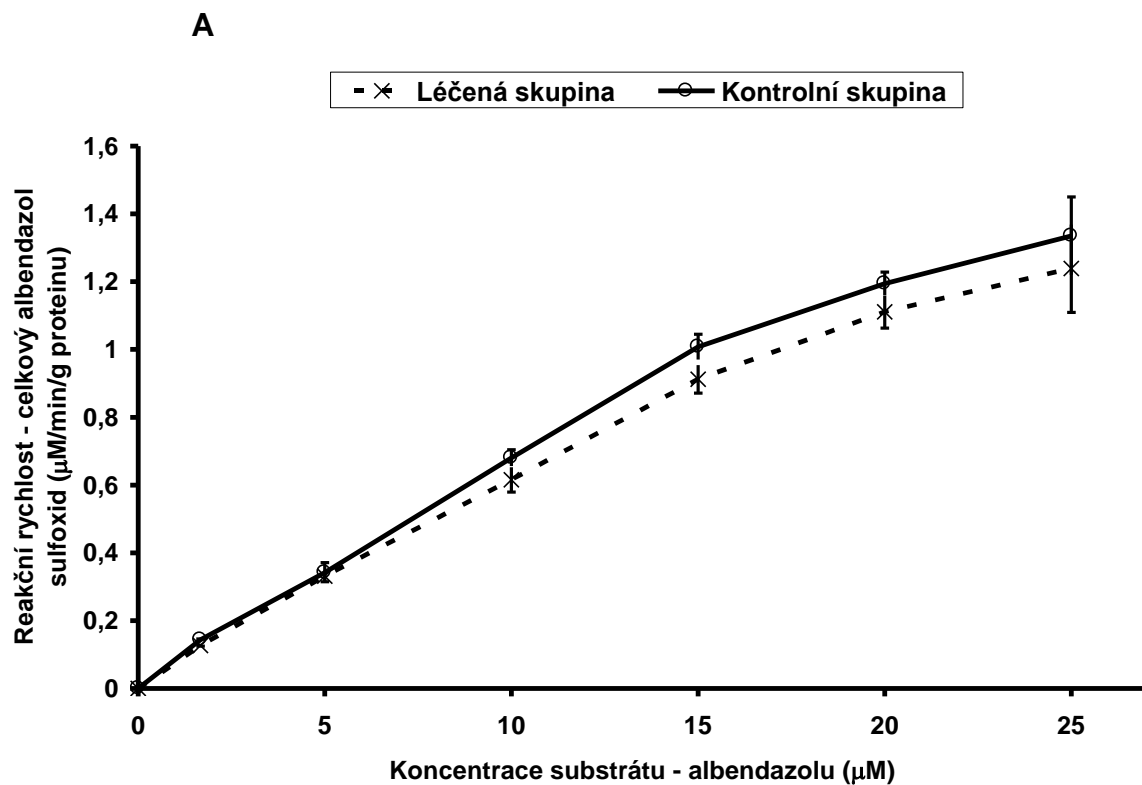
urychlena. Transformací hodnot z grafu 16, 17, 18 dle Lineweaver-Burka jsme získaly hodnoty K_m a V_{max} příslušných reakcí (tab. 2).

Ačkoliv známky indukce jsou patrné na rozdílné schopnosti metabolizovat albendazol, průkaz změn metabolických aktivit jsme provedli i s použitím všeobecně uznávaných metod stanovení aktivit biotransformačních enzymů a metod schopných kvantifikovat množství příslušného enzymu ve tkáni. Porovnali jsem aktivitu EROD a 7-methoxyresorufin demethylasy (MROD) (graf 19), které kvantifikují metabolickou převážně aktivitu CYP450 1A a mají přímí vztah k přeměně albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon. V obou tkáních byla aktivita signifikantně vyšší u vzorků získaných ze zvířat léčených albendazolem. Následně byl vzestup množství této isoformy CYP450 detekován i metodou imunoblotingu (Western blotting). Lze tedy říci, že po opakovaném podání došlo ke zvýšení množství enzymu CYP450 1A, doprovázené zvýšenou metabolickou aktivitou tohoto biotransformačního systému, které prakticky vedlo k urychlené biotransformaci albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon. Zmíněné metody přinesly další důkazy o diametrálně rozdílné aktivitě jaterní a střevní tkáně. Porovnáním hodnot EROD jsme zjistili asi 30 násobnou aktivitu v játrech v porovnání se střevem. Porovnání metabolické přeměny albendazol sulfoxidu dosahuje řádově podobných hodnot. Dále byly porovnávány aktivity 7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin demethylasy, (MFCD), testosterone hydroxylasy (TOH), FMO (stanovenou jako s-oxidaci thiobenzamidu) a UDP-glucuronosyltransferasy UGT). Mezi skupinami nebyl v těchto aktivitách nalezen signifikantní rozdíl. V případě aktivity FMO se vzhledem k hodnotám aktivit na úrovni limitních hodnot nepovedlo potvrdit domněnku o indukci FMO v systému mikrosomů tenkého střeva, vyslovenou po porovnání enantioselektivity oxidace albendazolu. Na druhou stranu v jaterní tkáni léčených a kontrolních zvířat byly stanoveny podobné hodnoty aktivit FMO, stejně tak, jako nebyl nalezen rozdíl v oxidační přeměně albendazolu.

Součástí této studie byl odběr krevní plasmy v průběhu celého pokusu, žluče a náplně batoru po ukončení studie. I v těchto vzorcích byly stanoveny koncentrace parentní látky a hlavních metabolitů. Zkoumané látky byly ze vzorků extrahovány ethylacetátem a po zahuštění stanoveny stejnou metodou HPLC zmíněnou dříve. Na grafu 20 je zaznamenán průběh plasmatických

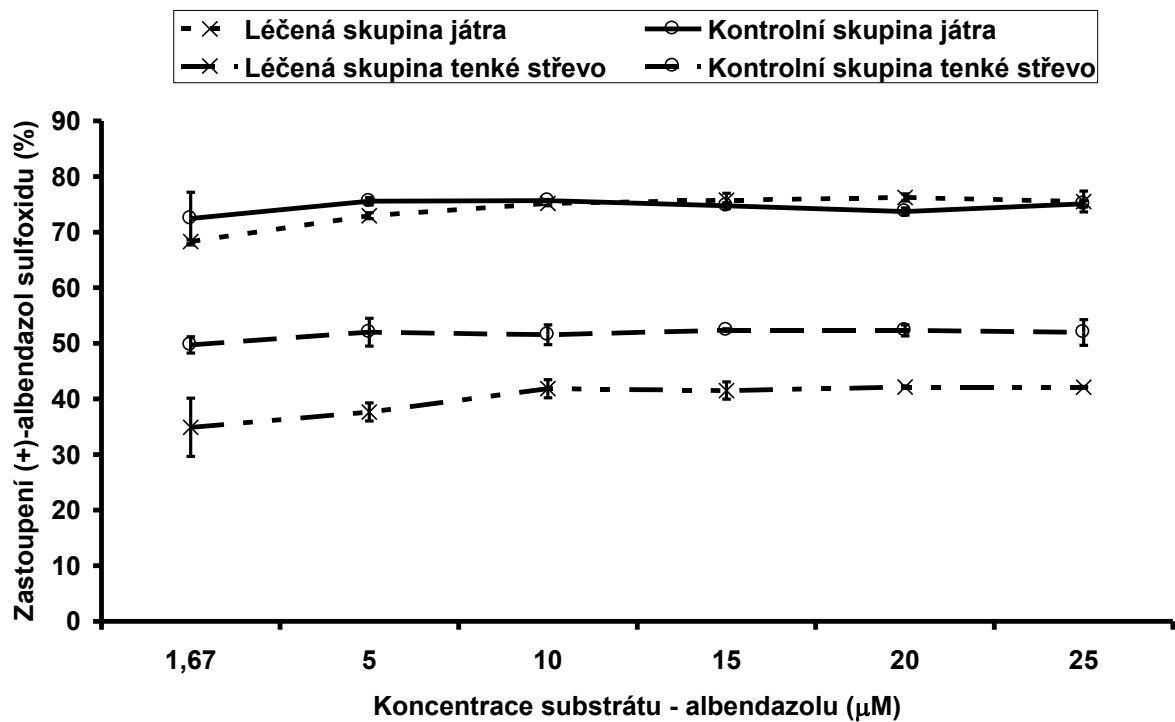
koncentrací v průběhu pětidenního podávání. Je patrné, že přes pokračující přísun léčiva do organismu, od druhého podání se již nezvyšovala plasmatická hladina albendazol sulfoxidu, naopak měla klesající tendenci. Sledování zastoupení jednotlivých enantiomerů odhalila hodnoty podílu 75% až 85% (+)-albendazol sulfoxidu, což jsou hladiny srovnatelná s hodnotami pozorovanými na izolovaných jaterních kompartmentech i *in vivo* u ovce domácí. Hladina albendazol sulfonu do třetího dne narůstala, dosáhla podobných hladin jako albendazol sulfoxid, a nadále byla stabilní. Tyto průběhy naznačují změnu aktivity biotransformačních enzymů v průběhu terapie ve smyslu urychlení transformace albendazol sulfoxidu na albendazol sulfon. Parentní látka nedosáhla v plasmě detekovatelných hladin. Po poslední dávce byly stanoveny hladiny albendazolu a metabolitů i v dalších biologických vzorcích. Ve žluči byly nalezeny hladiny albendazol sulfoxidu i sulfonu podobné plasmatickým (tab. 3), albendazol nebyl detekován. V předžaludku byly zjištěny, v porovnání s plasmou, velmi odlišné nálezy. Prvním z nich byla přítomnost albendazolu, a to přestože byl odběr realizován 24 hodin po poslední dávce, dále zde byly nalezeny vysoké koncentrace albendazol sulfoxidu a zejména albendazol sulfonu. Toto potvrzuje dřívější poznatky o ion-trappingu metabolitů albendazolu do kyselejšího prostředí žaludku, a obzvláště předžaludku (Lanusse a Prichard 1993).

In vitro jsme prokázali indukci biotransformačních enzymů v játrech a střevě po opakovaném podání terapeutických dávek albendazolu *per os*. Prokázána byla zrychlená metabolická přeměna specifických substrátů a albendazolu, ukazujících na indukci FMO a CYP450 1A ve střevě a CYP450 1A v játrech. Následně bylo potvrzeno, že touto indukcí je zasažena i vlastní biotransformace albendazolu a jeho metabolitu albendazol sulfoxidu.

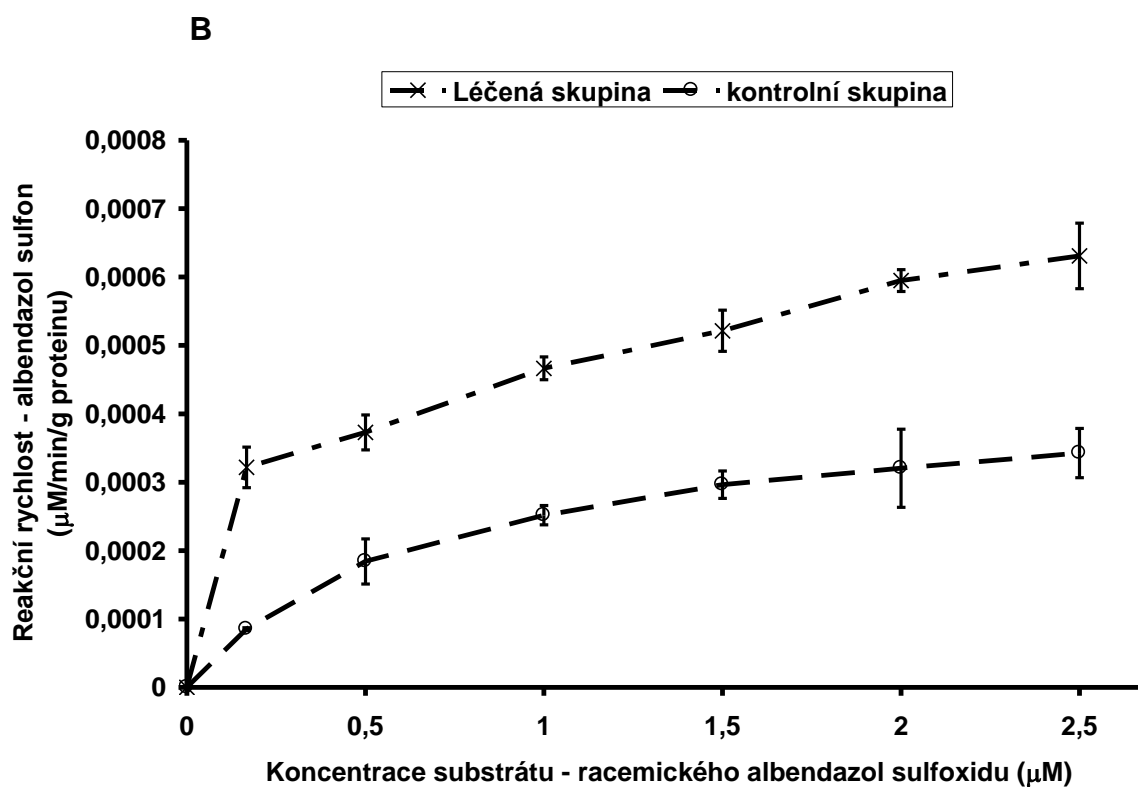
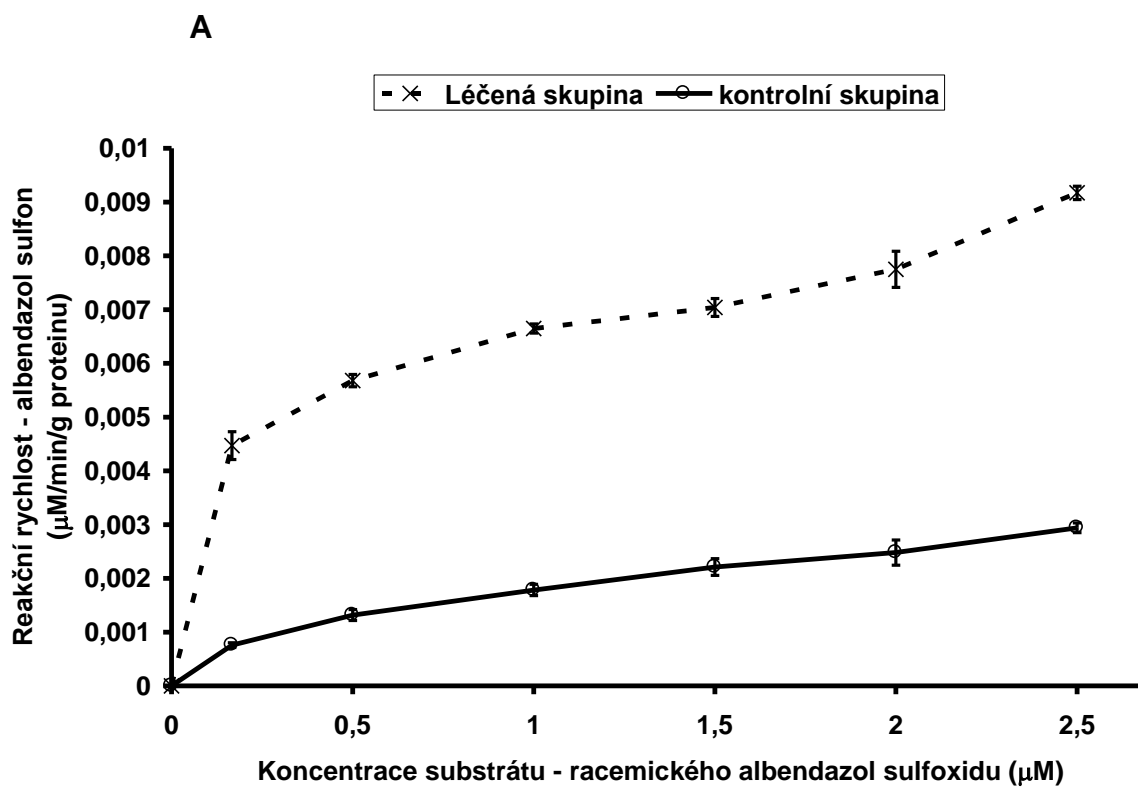


Graf 16. Reakční rychlost sulfoxidace albedazolu v závislosti na koncentraci substrátu.

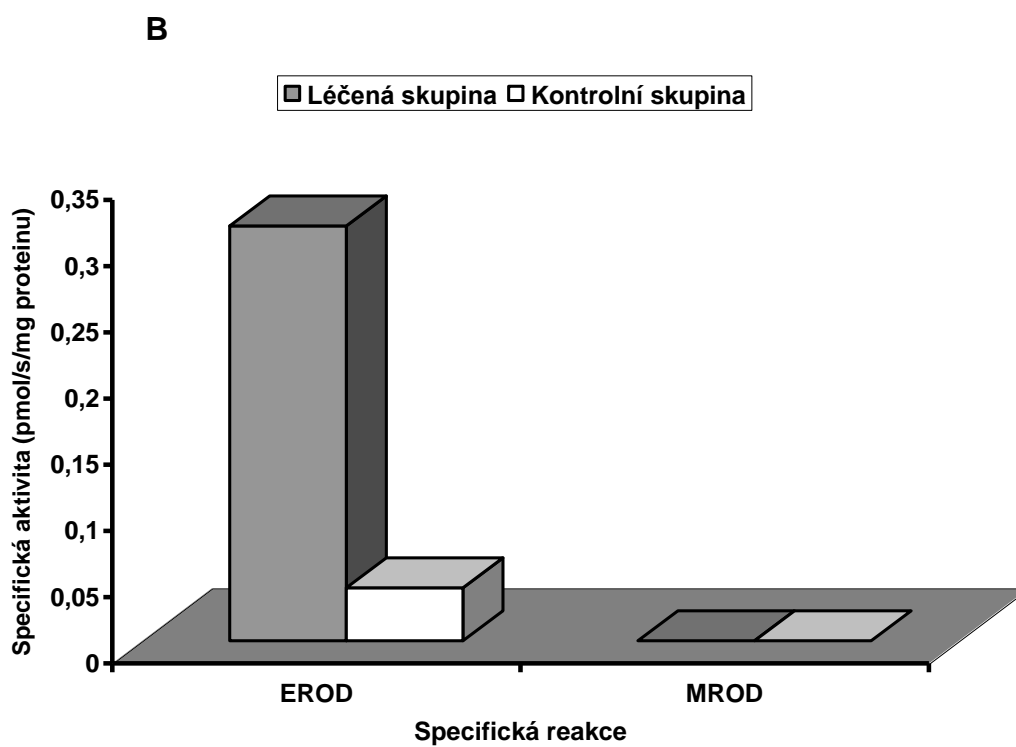
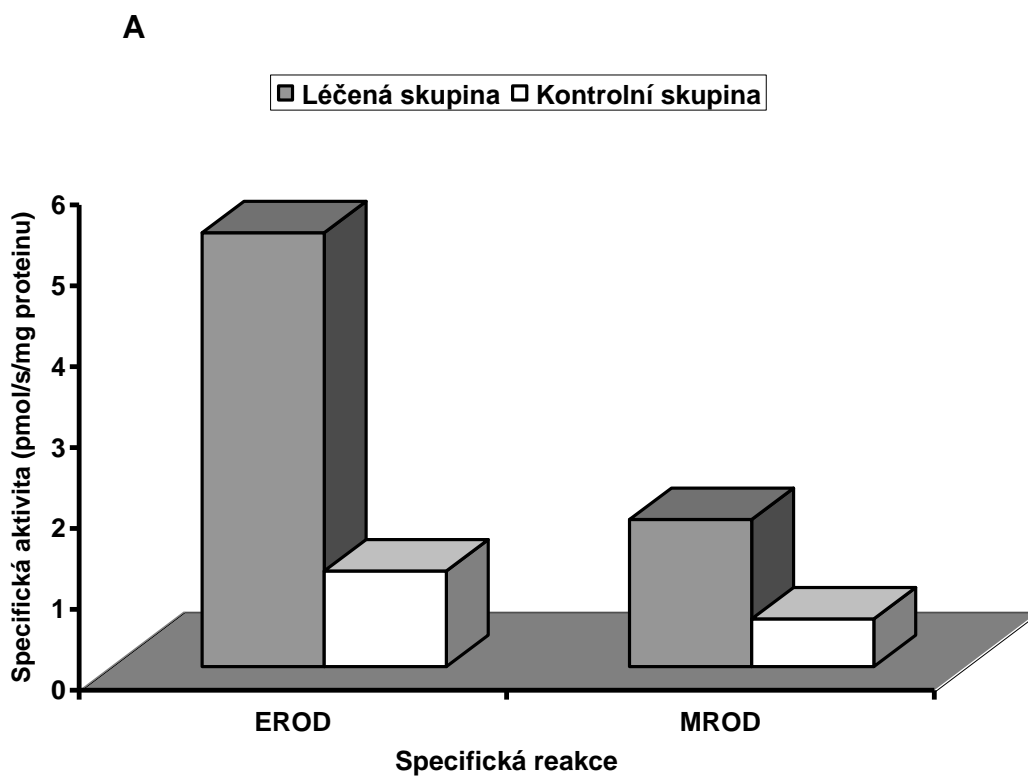
A-jaterní mikrosomy, B-střevní mikrosomy.



Graf 17. Relativní zastoupení vzniklého (+)-albendazol sulfoxidu v závislosti na koncentraci substrátu.



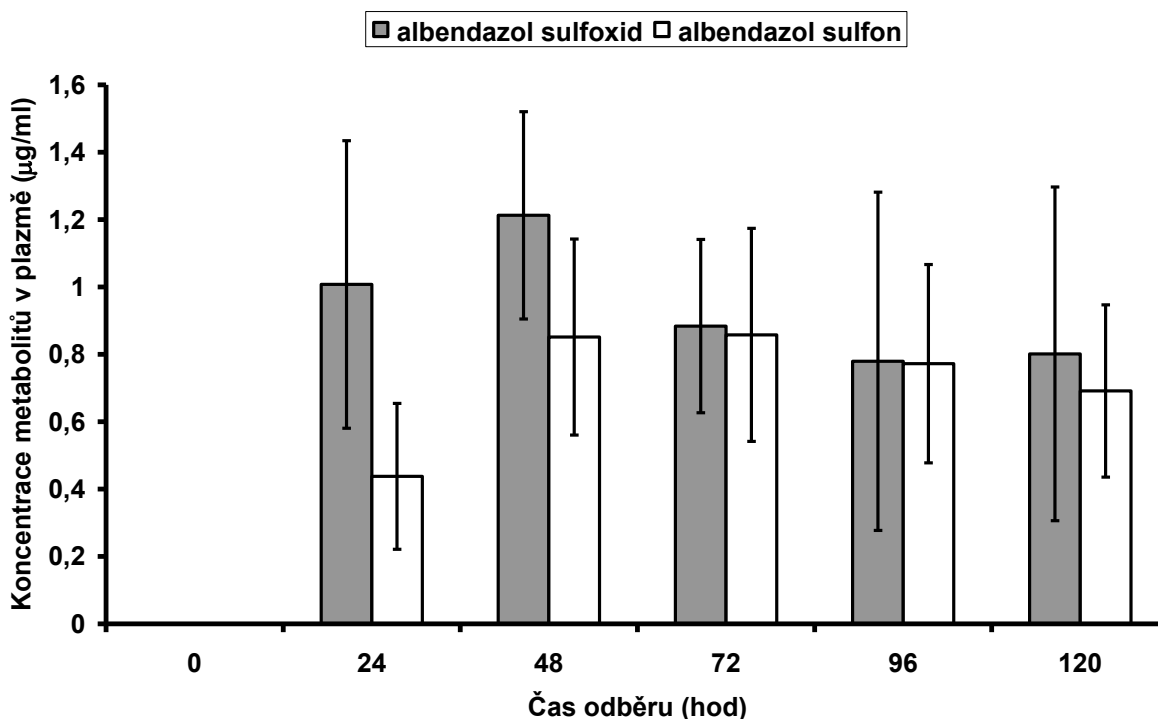
Graf 18. Reakční rychlost sulfonace albendazol sulfoxidu v závislosti na koncentraci substrátu. A-jaterní mikrosomy, B-střevní mikrosomy.



Graf 19. 7-ethoxyresorufin deethylase (EROD) a 7-methoxyresorufin demethylase (MROD) aktivita A-jaterních B-střevních mikrosomů.

Tab. 2. Odvozené kinetické parametry sulfoxidace albendazolu a sulfonace albendazol sulfoxidu.* - Signifikantní rozdíl $p < 0,05$.

Sledovaná reakce	Kinetické parametry odvozené po transformaci dle Linewevera-Burka	Játra		Tenké střevo	
		Kontrolní skupina	Léčená skupina	Kontrolní skupina	Léčená skupina
Vznik albendazol sulfoxidu	K_m' (μM)	38.1 ± 1.9	39.2 ± 2.1	4.6 ± 0.4	4.2 ± 0.2
	V_{max}' ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$)	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01 *
Vznik albendazol sulfonu	K_m' (μM)	0.78 ± 0.05	0.24 ± 0.07 *	0.67 ± 0.06	0.46 ± 0.03 *
	V_{max}' ($\text{nM}/\text{min}/\text{g}$)	3.3 ± 0.2	8.4 ± 0.2 *	0.43 ± 0.03	0.72 ± 0.04 *



Graf 20. Plasmatické koncentrací albendazol sulfoxidu a sulfonu po orálním podání albendazolu v dávce $5 \times 7,5$ mg/kg ž. hm.

Tab. 3. Koncentrace metabolitů v plasmě, žluči a bacheru léčených zvířat po podání albendazolu v dávce 5 × 7,5 mg/kg ž. hm (n=6).

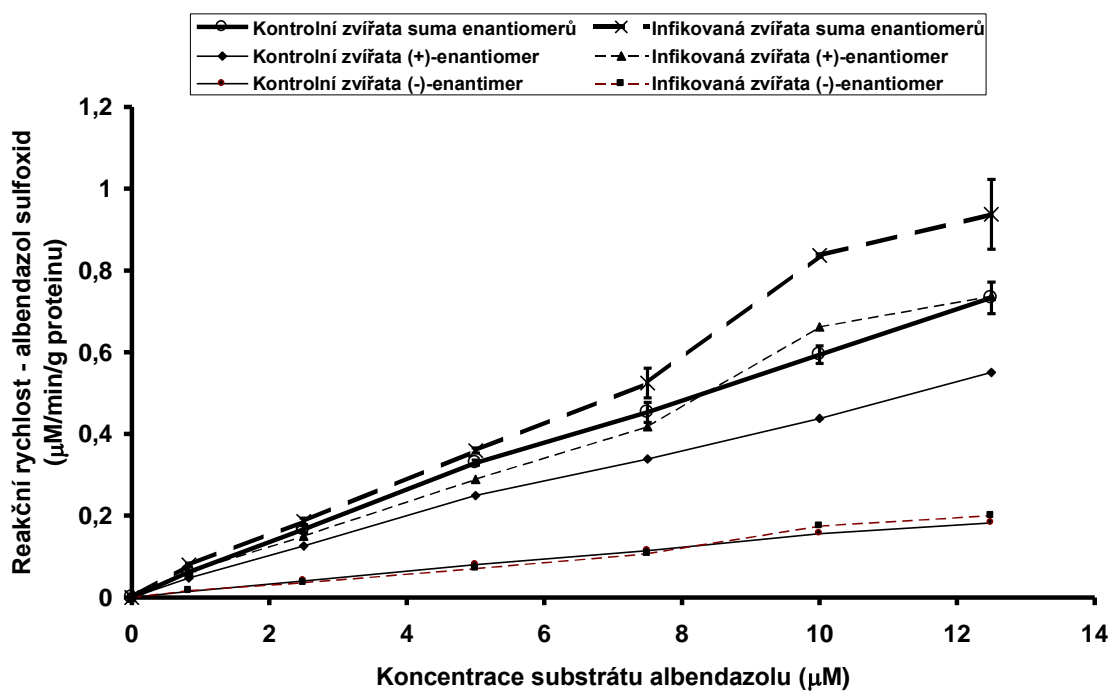
Stanovovaná látka	Plasma					Žluč	Bachor
	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	120 hod	120 hod	120 hod
ABZ (μg/ml)	0	0	0	0	0	0	13,9
Celkový ABZSO (μg/ml)	1,07	1,21	0,88	0,79	0,80	1,73	1,04
(+)-ABZSO (μg/ml) (podíl z celkového ABZSO-%)	0,81 76,0	1,01 83,6	0,76 85,9	0,68 87,0	0,68 85,4	1,07 62,0	0,81 78,5
(-)-ABZSO (μg/ml) (podíl z celkového ABZSO-%)	0,26 24,0	0,20 16,4	0,12 14,1	0,11 13,0	0,12 14,6	0,66 38,0	0,23 21,5
ABZSO ₂ (μg/ml)	0,44	0,85	0,86	0,77	0,69	0,29	8,04

IV.4.4.Vliv probíhajícího parazitárního onemocnění jater na aktivitu jaterních enzymů

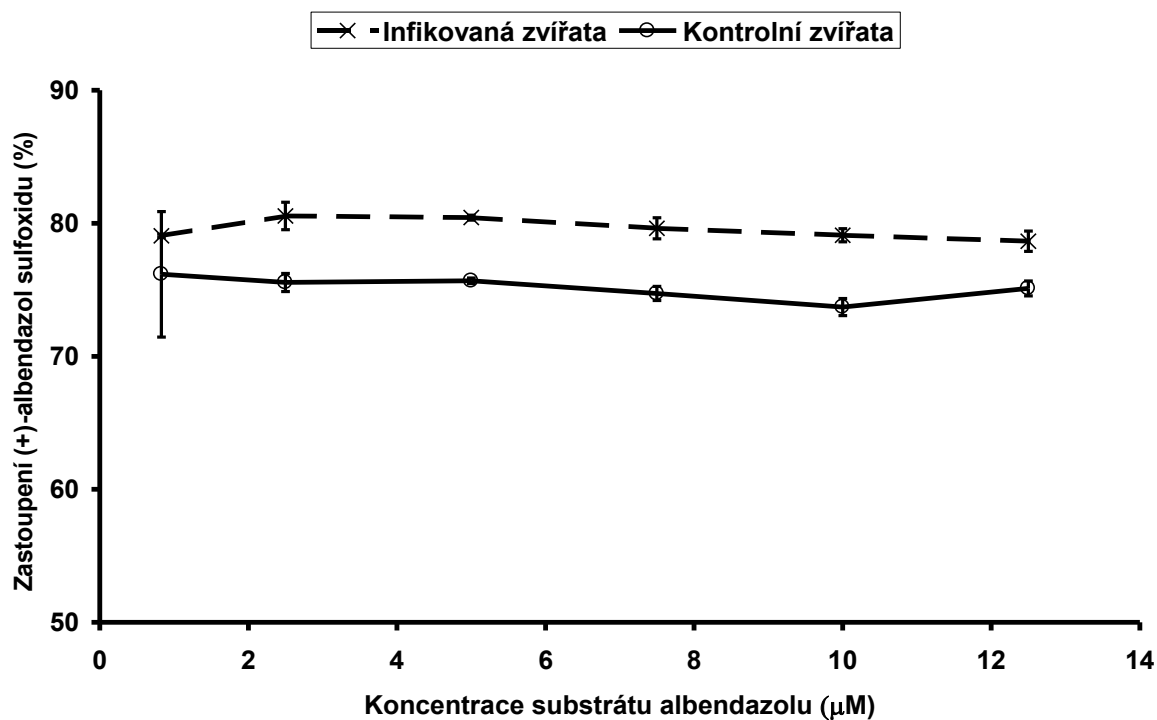
Ačkoliv je změna aktivity biotransformačních enzymů nejčastěji dávana do souvislosti s přítomností cizorodých látek v organismu, nejedná se o jediný faktor měnící kvalitativní i kvantitativní povahu metabolických pochodů ve tkáních. Mezi další prokázané faktory, ovlivňujících enzymatickou aktivitu jaterních mikrosomálních monooxygenás, patří vliv pohlavních hormonů, složení stravy, hladovění a také probíhající infekce, či patologické procesy. Právě vliv probíhající parazitózy, konkrétně parazitózy postihující jaterní tkáň, na aktivitu biotransformačních enzymů jater nás začal zajímat ve chvíli, když jsme měli možnost získat vzorky z muflonů dvou velmi podobných chovů, kde pouze u jednoho z nich byla dlouhodobě zaznamenána infekce motolicí kopinatou, *D. dendriticum*. V chovu pozitivním se dikrocelióza vyskytuje dlouhodobě, snahy o její kontrolu se zatím projevují zmírněním nálezů, nikoliv eliminací. Motolice kopinatá je biohelmint ze skupiny jaterních motolic s velmi složitým reprodukčním cyklem. Zvířata z chovu s pozitivním výskytem tohoto onemocnění jsou ve spolupráci našeho oddělení a majitelů pravidelně odčervována pomocí opakovaného podání albendazolu. Sběr vzorků pro naše studium byl ale realizován v dostatečném časovém odstupu několika měsíců, aby tato terapie nemohla ovlivnit výsledek pokusu. Nadto i skupina zdravých zvířat podléhá identickým léčebným schémátům a tak i z tohoto hlediska lze skupiny považovat za rovnocenné. Uspořádání studie bylo takřka shodné se studií popisující indukci po podání albendazolu (kapitola IV.4.3). Byla sledována a porovnávána oxidativní biotransformace albendazolu (graf 21), albendazol sulfoxidu (graf 23) a specifických substrátů pro FMO a jednotlivých isoform CYP450. Celkově lze říci, že mírné rozdíly nalezeny byly, nešlo však pravděpodobně o rozdíly klinicky významné. Rozdíl byl nalezen jak v rychlosti vzniku celkového albendazol sulfoxidu z albendazolu a také v rychlosti vzniku (+)-albendazol sulfoxidu, nikoli však (-)- albendazol sulfoxidu (graf 22 a,b). Slabý rozdíl byl nalezen po porovnání reakčních rychlostí vzniku albendazol sulfonu, při využití racemické směsi albendazol sulfoxidu jako substrátu. Ve všech zmíněných parametrech se jednalo o vyšší aktivitu mikrosomů z jater infikovaných zvířat, což podporuje domněnku o indukci související

s probíhajícím onemocněním. Studium přeměny specifických substrátů byla odhalena změna aktivit FMO, naopak nebyl prokázán vliv na aktivitu CYP450 (jmenovitě nedošlo ke zvýšení aktivit EROD a MROD). Změna rovnováhy aktivit FMO a CYP450 se projevila změnou v zastoupení jednotlivých enantiomerů albendazol sulfoxidu. Zdravá zvířata produkovala 75,2% (+)-albendazol sulfoxidu a infikovaná 79,6% (+)-albendazol sulfoxidu.

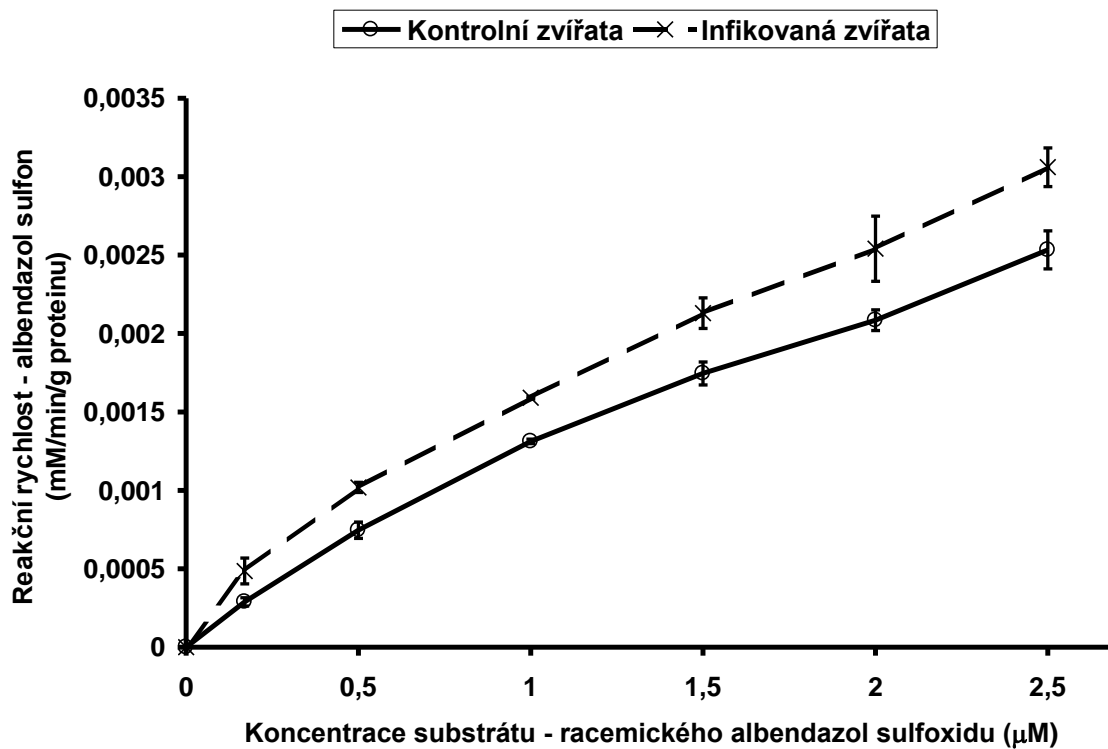
Naše studie potvrdila, že probíhající jaterní infekce parazitickou motolicí je schopna modifikovat jaterní mikrosomální biotransformaci léčiva albendazolu. Potvrdili jsme, že na poškození a iritaci tkáně přítomností parazita, nebo látek, které parazit uvolňuje do okolní tkáně, reagují jaterní buňky mobilizací metabolických procesů. Jak dokumentují naše výsledky nejde o indukci ekvivalentní kvalitativně ani kvantitativně s enzymatickou indukcí pozorovanou po expozici xenobiotika (kapitola IV.4.3). Získané rozdíly aktivit jaterních enzymů infikovaných a kontrolních zvířat nepřesahují 35% a tak lze očekávat málo významné změny v plasmatických hladinách metabolitů albendazolu. Naproti tomu, vzhledem k prokázanému urychlení jaterní biotransformace albendazolu u zvířat infikovaných dikroceliózou lze uvažovat o zvýšení terapeutické dávky v řádu desítek procent.



Graf 21 Reakční rychlost sulfoxidace albendazolu v závislosti na koncentraci substrátu zvířat infikovaných dikroceliozou a zvířat kontrolních



Graf 22. Procentuální zastoupení vzniklého (+)-albendazol sulfoxidu v závislosti na koncentraci substrátu.



Graf 23. Reakční rychlost sulfonace albendazol sulfoxidu (substrát ve formě racemátu) na albendazol sulfon v závislosti na koncentraci substrátu.

V.

DISKUSE

V.1.

Pro uskutečnění první studie nás vedl požadavek popsat biotransformaci albendazolu u muflona, tj. druhu, u kterého se nám podařilo již dříve potvrdit účinnost tohoto anthelmintika proti střevním, plicním a jaterním parazitózám. Při volbě dávky jsme použili ověřená schémata pro domácí ovci, vycházeli jsme přitom z předpokladu druhové podobnosti až shodnosti ovce muflona a ovce domácí (Koubek a Kamler 2003). Na druhou stranu jsme si byli vědomi literárních poznatků o druhových rozdílech v přeměně albendazolu v rámci hospodářských i laboratorních druhů a diametrálně odlišných chovatelských podmínek obou druhů ovce, které by mohly u důsledku modifikovat a odlišovat tyto skupiny. Rozhodli jsme se proto biotransformační přeměnu albendazolu u muflona charakterizovat. Zprvu jsme se neodhodlali k provedení *in vivo* studie, ale šli jsme cestou *in vitro* metod. Vzhledem k faktu, že přeměna albendazolu probíhá převážně v játrech, rozhodli jsme se co nejlépe popsat právě biotransformaci v této tkáni. Jednou ze zavedených metod na našem pracovišti byla metoda izolace a následné kultivace izolovaných hepatocytů. Tato metoda byla původně vypracována pro izolaci hepatocytů z tkáně laboratorních zvířat (Maurel 1996), ale po její modifikaci pro hospodářská zvířata ji bylo možno použít i pro tuto studii. Jelikož z celosvětového hlediska nebyla pro studium metabolismu albendazolu tato metoda doposud použita, prostudovali jsem metabolismus albendazolu za stejných podmínek i u potkana, tedy druhu se známou farmakokinetikou albendazolu.

Zjistili jsme, že námi připravené hepatocyty obou studovaných druhů jsou schopny transformovat albendazol na metabolity, kvantitativně dominantní *in vivo*. Naše metoda byla schopna odhalit mezidruhová rozdíly ve kvantitativních parametrech těchto pochodů. Získané závěry, hodnotící sulfoxidaci albendazolu na albendazol sulfoxid za reakci několikanásobně rychlejší než následnou sulfonaci se shodují se závěry *in vivo*. Velmi podobná

je i stereospecificita první reakce u potkana nalezená námi za *in vitro* podmínek a dříve *in vivo*, což dokladuje funkčnost modelu kultivovaných hepatocytů a vhodnost tohoto modelu pro studium biotransformace albendazolu.

Produktem této studie byl popis biotransformace albendazolu hepatocytu ovce muflona. Nalezené hodnoty jsme porovnali s dostupnými hodnotami farmakokinetiky albendazolu u ovce domácí. Mezi druhy jsme našli stejné dominantní metabolity a důležitým společným spojujícím článkem byla takřka totožná stereospecificita vzniku albendazol sulfoxidu.

Lze předpokládat, že vysoká příbuznost ovce domácí a ovce muflona je doprovázena i podobnou aktivitou jaterních biotransformačních enzymů obou druhů. Lze odhadnout, že po podání dávek doporučených pro ovci domácí se u ovce muflona vyskytnou velmi podobné plasmatické hladiny metabolitů, mj. odpovědných za anthelmintickou aktivitu, a lze tedy očekávat stejnou účinnost v antiparazitární terapii.

V.2.

Tato studie biotransformace systémem kultivovaných jaterních buněk porovnává schopnost přeměny albendazolu u celkem sedmi druhů zvířat patřících mezi laboratorní a volně žijící druhy (potkan, morče, králík, prase, muflon, srnec, daněk). Cíl studie byl vyznačit rozdíly mezi nimi a získané výsledky porovnat s literárními zdroji popisující biotransformaci albendazolu u člověka a hospodářských zvířat.

Jak je z výsledků patrné, na již dříve pozorovaných mezidruhových rozdílech *in vivo* se ve velké míře podílí jaterní biotransformace albendazolu. Obzvláště důležitým parametrem studia farmakokinetiky albendazolu je detekce stereospecifického vzniku obou enantiomerů hlavního metabolitu albendazol sulfoxidu a proto i v naší studii byl velký důraz kladen na parametry jeho vzniku, jakožto vzniku metabolitu nesoucího účinek parentní látky.

Jakkoliv se na první pohled mohou zdát získané výsledky nesourodé, lze z nich odvodit specifické charakteristiky jednotlivých druhů i rysy společné více druhům. Společným rysem biotransformace albendazolu na albendazol sulfoxid a následně i albendazol sulfon, dokumentovaným u všech studovaných druhů, je vysoká rychlost přeměny v prvním kroku s pomalejší následnou reakcí.

V rámci obou těchto reakcí lze vyzorovat mezidruhové rozdíly, navíc stereospecifické vyhodnocení prvního kroku biotransformace má i v této studii vysokou výpovědní hodnotu. Při porovnání vzniku sumy enantiomerů albendazol sulfoxidu lze za nejrychlejší metabolizátory považovat morče a králíka, následuje muflon, potkan a vepř. Výrazně pomalejší průběh lze vyhodnotit u zástupců jelenovitých druhů, srnce a daňka. S rozlišením na jednotlivé enantiomery lze odhalit další rozdíly. Zatímco muflon, morče a vepř preferují z velké části produkci (+)-enantiomeru, vyrovnané hladiny (+)- a (-)-albendazol sulfoxidu jsem našli u potkana. Opačný charakter má stereospecifita reakce u králíka, daňka a ponejvíce se preference vzniku (-)-enantiomeru albendazol sulfoxidu projevuje u srnce. V rámci dosud publikovaných prací se jedná o unikátní charakter metabolických procesů albendazolu. Důsledkem rozdílné stereospecifity vzniku albendazol sulfoxidu jsou i výraznější mezidruhové rozdíly v koncentracích vzniklého (+)-albendazol sulfoxidu, kdežto hladiny (-)-albendazol sulfoxidu jsou vyrovnanější. Na vzniku jednotlivých enantiomerů se podílejí odlišné enzymatické systémy, pravděpodobně FMO pro (+)-albendazol sulfoxid a CYP450 pro (-)-albendazol sulfoxid. Lze se domnívat, že mezi druhy jsou přirozeně širší rozdíly v aktivitách jaterních CYP450, než FMO. Vznik metabolitu následné oxidační přeměny, albendazol sulfonu, nereflektuje charakteristiky a mezidruhové rozdíly vzniku sumy albendazol sulfoxidu. Jednotlivé druhy prokázaly individuální schopnost sulfonace albendazol sulfonu. Dokumentována byla relativně nízká rychlost této reakce u volně žijících druhů (muflon, daněk, srnec) v porovnání s druhy laboratorními.

Je nutno podotknout, že součástí studie byly samozřejmě slepé pokusy popisující metabolickou přeměnu albendazolu, albendazol sulfoxidu a albendazol sulfonu bez přítomnosti hepatocytů, či v přítomnosti varem deaktivovaných hepatocytů. V těchto pokusech nebyl zaznamenán samovolný vznik oxidačních produktů, ani produktů zpětné reakce, což dokazuje, že námi nalezené metabolity jsou důsledkem funkční enzymatické přeměny hepatocytů.

V.3.

V této kapitole bylo naším cílem porovnat biotransformaci albendazolu u co nejširšího souboru druhů, které lze považovat za jeho běžné „konzumenty“, tedy druhů hospodářských zvířat. Prakticky bylo možné realizovat porovnání na takto rozsáhlém souboru (celkem 12 skupin) studiím mikrosomální biotransformace. Byli jsme si vědomi faktu, že oproti využití kultivovaných hepatocytů (kapitola V.2.) jde o metodu s menší výpovědní hodnotou, protože mikrosomální frakce buňky je pouze částí její enzymatické výbavy. Na druhou stranu hodnotu studie navyšuje všeobecně přijímaný názor, že právě mikrosomy jsou hlavním enzymatickým systémem oxidativních přeměn xenobiotik a tedy i albendazolu, což je navíc podpořeno předchozími studiemi s albendazolem *in vitro*. Naopak využití tohoto *in vitro* systému přináší bezesporu spoustu výhod, mezi které patří například jednodušší zajištění a lepší uchovávání materiálu, opakovatelnost a reprodukovatelnost pokusů a v neposlední řadě i nižší finanční nákladnost.

Společným prvkem této studie a studií předchozích provedených na kulturách hepatocytů jsou čtyři skupiny zvířat: muflon, vepř, srnec a daněk. Stejně jako vznik albendazol sulfoxidu v kulturách hepatocytů byla i sulfoxidace albendazolu mikrosomální frakcí velmi rychlá u muflona a vepře, zatímco srnec a daněk byli pomalými metabolizátory. Obě studie vykazaly unikátní stereospecificitu této reakce pro jednotlivé druhy. Hepatocyty muflona produkovaly 78,1% (+)-albendazol sulfoxidu a mikrosomy 74,5%, vepř 76,0%, resp. 69,5%; srnec 25,2%, resp. 20,7% a daněk 37,5%, resp. 25,9% (+)-albendazol sulfoxidu. I vznik albendazol sulfonu, resp. sulfonace albendazol sulfoxidu je nejrychlejší u srnce a nejpomalejší u vepře. Závěry získané z obou studií lze považovat za velmi podobné a tak se můžeme domnívat, že funkčnost systémů byla optimální. Navíc se z uvedeného zdá, že zákonitosti získané studiím biotransformace na úrovni mikrosomální frakce lze obstojně reprodukovat i pro organismus jako celek.

V této studii jsme zjistili, že sulfoxidace albendazolu je v rámci hospodářských druhů proces charakterizovaný vysokou druhovou odlišností a to na rozdíl od úrovně následné sulfonace, která byla (kromě skotu), velmi podobná mezi druhy. Prokázali jsme, že rozdíly v sulfoxidaci albendazolu jsou

dány hlavně v rozdílných schopnostech mikrosomálních systémů produkovat (+)-formu albendazol sulfoxidu. Vznik (+)-enantiomeru vykázal vysokou variabilitu mezi druhy a rozdíly v této aktivitě se odrážely i do rychlosti produkce celkového albendazol sulfoxidu. Na druhé straně vznik (-)-albendazol sulfoxidu lze považovat ve spektru studovaných skupin za takřka identický. Tyto závěry podporují dříve publikované studie o dvou enzymatických systémech produkujících specifickou optickou formu albendazol sulfoxidu. Za systém produkující (+)-albendazol sulfoxid jsou považovány FMO, zatímco za vznik (-)-albendazol sulfoxidu jsou odpovědné monooxygenázy CYP450. Propojením našich výsledků a zmíněných studií jsme vyslovili hypotézu, že právě aktivita FMO vykazuje vysokou variabilitu mezi druhy, odrážející se v rozdílné farmakokinetice albendazolu *in vitro* i *in vivo*. Velmi překvapující závěr přineslo studium biotransformace albendazolu u jelenovitých druhů, tedy u srnce, daňka a jelena. Již inkubace albendazolu s hepatocyty srnce a daňka naznačily výjimečnost těchto druhů v úrovni sulfoxidace jak z hlediska její kvalitativní i kvantitativní úrovně. Kvalitativně jsme našli jiný poměr vzniklých enantiomerů, resultující v kvantitativně nízké celkové sulfoxidaci. Toto bylo potvrzeno i na úrovni mikrosomální frakce jaterní tkáně, navíc v tomto systému jsme její úroveň mohli lépe porovnat s dalšími druhy. Zatímco úroveň sulfoxidace ve směru (+)-albendazol sulfoxidu je u jelenovitých až řádově nižší než u ostatních sledovaných druhů, vznik (-)-albendazol sulfoxidu je mezi druhy obdobný. Důsledkem aktivit těchto dvou systémů je právě rozdílná úroveň zastoupení jednotlivých enantiomerů u jednotlivých druhů. Námi zjištěné úrovně *in vitro* se shodují s publikovanými výsledky *in vivo* studií u ovce, kozy, skotu, prasete a již dříve zmíněného potkana. Proto odhadujeme, že aktivita jaterní tkáně jelenovitých bude resultovat i v plasmatických hladinách jednotlivých enantiomerů. Vzhledem k tomu, že tyto druhy preferují vznik (-)-albendazol sulfoxidu, což je neporovnatelné s ostatními druhy hospodářských zvířat, nelze optimální dávkování léčiva ani účinnost antiparazitární terapie albendazolem u těchto druhů odhadnout. Na druhou stranu, vzhledem k faktu, že farmakodynamika jednotlivých enantiomerů není dosud objasněna a nejsou důkazy o vyšší či nižší aktivitě jednotlivých enantiomerů nelze podání albendazolu předem hodnotit za nevhodné. Jak jsme již naznačili, je zmíněná jedinečnost jelenovitých druhů pravděpodobně způsobena nízkou aktivitou

FMO a proto nejen albendazol, ale i další xenobiotika podléhající oxidativním přeměnám tímto enzymatickým systémem, mohou vykazovat diametrálně odlišné farmakokinetické parametry ve srovnání s hospodářskými druhy.

Další dva studované druhy náležící mezi volně žijící zvířata, tedy muflon a divoké prase, byly porovnávány s příbuznými druhy domácích zvířat, ovcí a domácím prasetem. Zmíněné dvojice muflon-ovce a divoké-domácí prase lze na jednu stranu hodnotit z fylogenetického hlediska za vysoce podobné, na straně druhé jsou pod vlivem velmi odlišných podmínek chovu a potravní skladby. Naše studie prokazuje, že přes tyto výchozí podmínky si druhy domestikované zachovaly takřka shodnou aktivitu studovaných jaterních biotransformačních enzymů metabolizujících albendazol jako druhy volně žijící. Zdá se být proto odůvodnitelné použití albendazolu v antiparazitární terapii divokého prasete a muflona v dávkování stanovených pro jejich domestikované protějšky.

Také kastrace, významný zásah do fyziologie zvířete, který mění hlavně úroveň hladin pohlavních hormonů v těle zvířete a s tím související projevy, by se mohla odrazit na aktivitě jaterních enzymů metabolizujících albendazol. Podle našich výsledků se ale kastráti příslušných druhů chovají z hlediska přeměny albendazolu na hlavní metabolity přibližně identicky. Rozdíly mezi skopcem a beranem lze nalézt ve slabě vyšší aktivitě celkové sulfoxidace albendazolu a sulfoxidace ve směru vzniku (+)-albendazol sulfoxidu, vznik (-)-albendazol sulfoxidu a albendazol sulfonu je bez rozdílu mezi druhy. Zjištěné rozdíly jsou však natolik malé, že jejich projev *in vivo* nelze předpokládat. Mezi vepřem a kancem nebyl rozdíl v úrovni celkové sulfoxidace, ale malý rozdíl byl nalezen v chirálním poměru enantiomerů albendazol sulfoxidu. Také vznik albendazol sulfonu nebyl mezi druhy identický, u kance byla pozorována vyšší rychlost této reakce.

V.4.

Zájem o albendazol a léčiva benzimidazolové struktury nás podnítil k vytvoření rešeršní práce shrnující znalosti o dalším fenoménu souvisejícím s přítomností xenobiotik v organismu-ovlivnění aktivit jaterních enzymů. Naše práce potvrdila, že látky s benzimidazolovou strukturou, mezi něž nepatří

pouze benzimidazolová anthelmintika, ale i léčiva jiných terapeutických skupin, jsou schopné svou přítomností v organismu provokovat zvýšení množství či aktivitu jaterních enzymů. Ač nejčastěji byla indukce pozorována u inhibitorů protonové pumpy, důkazu o indukční schopnosti benzimidazolových anthelmintik nebyly ojedinělé. Mezi nejčastěji sledované indukovatelné enzymatické systémy patřily enzymy jaterního CYP450, tedy enzymy podílející se velkou měrou na biotransformaci xenobiotik včetně námi studovaného albendazolu. Zarážejícím faktem byly opakující se důkazy o indukční schopnosti benzimidazolových anthelmintik u laboratorních zvířat či z nich získaných kultur. Tyto důkazy měly takřka výhradně původ v laboratořích humánních farmakologů a to přesto, že pole humánní terapie těmito léčivy dosahuje pouze zlomku objemu aplikovanému ve veterinární praxi. Veterinárními lékaři byla indukce a inhibice po aplikaci těchto léčiv opomíjena, či byly přejímány výsledky z laboratorních modelů. Snad jen několik prací studujících farmakokinetiku albendazolu naznačilo možnost uplatnění těchto pochodů v klinické praxi. Je nutno připomenout, že laboratorní modely a výsledky takto získané jsou aplikovány v širších souvislostech, zejména do humánní a veterinární praxe a to přes známé rozdíly ve farmakokinetice těchto léčiv u člověka, hospodářských zvířat a laboratorních zvířata modelů.

My jsme se následně rozhodli realizovat soubor pokusů schopných popsat indukční a inhibiční schopnost albendazolu u muflona a potkana *in vitro*; posléze jsme indukci albendazolem u muflona sledovali i *in vivo*.

V první studii jsme prokázali indukční schopnost albendazolu a jeho metabolitů v kulturách hepatocytů potkana, kdežto u mufloních hepatocytů jsme známky indukce nenalezli. Vysvětlení částečně přinesla navazující studie, ve které jsme prokázali inhibiční schopnosti albendazolu a jeho metabolitů na obdobné enzymatické systémy sledované dříve z hlediska enzymatické indukce. I zde jsme našli druhově specifickou odpověď s vyšší inhibiční aktivitou pozorovanou u mufloních enzymů oproti enzymům potkana. Pokud jsme vzali v úvahu oba možné vlivy, nemohli jsme možnou indukci jaterních enzymů u muflona zcela vyloučit a tak konečný důkaz měla přinést až *in vivo* studie. Mimo to tyto studie přinesly další důkazy o mezidruhových rozdílech v odpovědi na přítomnost xenobiotika, což podporuje nutnost studia těchto parametrů přímo na cílových druzích zvířat, nikoliv pouze na laboratorních

modelech. Konečně po několikadenní aplikaci albendazolu v terapeutických dávkách jsem našli zvýšenou aktivitu mikrosomálních enzymů a to nejen v játrech, ale i ve tkáni tenkého střeva. Porovnáním biotransformační aktivity střevních a jaterních mikrosomů jsme též prokázali, že právě játra jsou pravděpodobně dominantním místem metabolické přeměny albendazolu na albendazol sulfoxid, tedy mimo jiné jsme si ověřili vhodnost studia metabolismu albendazolu na jaterních *in vitro* systémech ve studiích uvedených výše. V tomto pokusu jsme též stanovili plasmatické hladiny metabolitů dříve studovaných *in vitro*. Prokázali jsme, že zvýšením aktivity biotransformačních enzymů albendazolem je paradoxně urychlena i eliminace albendazol sulfoxidu, tedy aktivního metabolitu ale zároveň i nositele antiparazitárního účinku.

Aktivita jaterních biotransformačních enzymů může být ovlivněna nejen ve vztahu k přítomnosti xenobiotik, ale je znám i vliv patologických procesů na jejich aktivitu. Jak může jaterní biotransformaci ovlivnit přítomnost infekce jaterní motolicí ve tkáni mufloních jater jsme studovali v závěrečné studii. V ní jsme porovnávali aktivitu jaterních enzymů u dvou skupin zvěře, lišících se pouze přítomností, či nepřítomností probíhající jaterní parazitózy, jmenovitě infekcí *D. dendriticum*. Ostatní podmínky chovů byly shodné. Výsledkem porovnání jsou závěry popisující urychlení metabolických procesů ve tkáni infikovaných zvířat. Změna biotransformační aktivity není výrazná, její projev v praktické terapii nelze očekávat.

VI.

ZÁVĚR

Hlavním tématem předloženého souboru experimentů bylo studium a porovnání biotransformace albendazolu u laboratorních, hospodářských a volně žijících zvířat. Studované druhy patří mezi mono- i polygastrická zvířata hospodářského i mimohospodářského využití. Zvolené metodiky nám umožnily nacházet shodné znaky i rozdíly biotransformačních reakcí u druhů diametrálně se odlišujících svou hmotností, charakterem chovu, pohlavím i zdravotním stavem. Byla popsána biotransformace na úrovni celého organismu, tedy *in vivo*, ale též *in vitro* v kulturách jaterních buněk i za účasti pouze vybraného funkčního segmentu jaterní buňky-mikrosomu. Prokázali jsme, že právě mikrosomální enzymy se velkou měrou účastní prvních fází metabolismu albendazolu, tedy vzniku aktivního metabolitu-albendazol sulfoxidu a jeho následné deaktivace na albendazol sulfon.

V předložené práci je zaznamenán soubor studií popisující jaterní biotransformaci antiparazitika albendazolu včetně jeho chirálních aspektů ve velmi širokém zvířecím spektru zahrnujícím druhy laboratorních zvířat, celosvětově nejběžnějších zástupců hospodářských zvířat a skupinu zvířat volně žijících. Naše studie uspořádané se záměrem navzájem porovnat jednotlivé druhy a skupiny zvířat odhalily mezidruhové rozdíly v parametrech oxidativních přeměn albendazolu *in vitro*. Některé tyto rozdíly byly již dokumentovány *in vivo* před započítím této studie, nebylo však jasné, zda za původem rozdílů je odlišnost zažívacích traktů jednotlivých zvířecích druhů nebo rozdíly v aktivitě jejich jaterních mikrosomálních enzymů. Právě naše studie prokázala, že obzvláště za první metabolickou přeměnu albendazolu, tedy vznik albendazol sulfoxidu ve dvou optických formách, je ve velké míře odpovědná jaterní tkáň, přesněji mikrosomální monooxygenázy. U druhů jelenovitých, u kterých byla biotransformace a to nejen albendazolu velkou neznámou, jsme našli velmi odlišné parametry, u jiných druhů nepoznané a v jistém smyslu i neočekávané. Nízká mikrosomální aktivita se projevila jak při využití izolovaných hepatocytů, tak ve studii s jaterními mikrosomy. Podle

našich výsledků lze u jelenovitých druhů očekávat velmi nízkou aktivitu FMO v porovnání s běžnými druhy hospodářských zvířat. Z hlediska terapie předpokládáme u těchto druhů odlišnou farmakokinetiku albendazolu, ale i dalších léčiv. U ostatních druhů fauny volné přírody, muflona a divokého prasete, jsme potvrdili vysokou podobnost biotransformace albendazolu s odpovídajícími druhy hospodářských zvířat, tj. s ovci a domácím prasetem.

Část experimentů byla věnována studiu průkazu možného vlivu podávání albendazolu na aktivitu jaterních enzymů. Zprvu nesourodé výsledky *in vitro* studií potvrdily mezidruhové rozdíly ve schopnostech indukce a inhibice jaterních mikrosomálních enzymů. Nadto byla prokázána i inhibiční schopnost albendazolu a opět byla pozorována druhově specifická míra a povaha tohoto děje. Z výsledků *in vitro* studií nebylo jednoduché vyslovit předpoklady pro klinické důsledky pozorovaných dějů a tak rozhodné výsledky přinesla až *in vivo* studie. V té jsme jednoznačně prokázali indukci mikrosomálních enzymů po opakovaném podání albendazolu v terapeutických dávkách. Navíc jsme prokázali, že k urychlení biotransformace dochází nejen v játrech, ale i ve tkáni tenkého střeva. Zároveň jsme potvrdili, že aktivita jaterních enzymů může být pozměněna nejen v souvislosti s přítomností xenobiotika, ale i v souvislosti s probíhajícím parazitárním onemocněním lokalizovaným do jater.

VII.

POUŽITÁ LITERATURA

- ALVAREZ, L., I., MOTTIER, M., L., SANCHEZ, S., F. & LANUSSE, C., E. (2001) Ex vivo diffusion of albendazole and its sulfoxide metabolite into *Ascaris suum* and *Fasciola hepatica*. *Parasitology research*, 87, 929-934.
- ALVAREZ, L., I., SAUMELL, C., A., SANCHEZ, S., F. & LANUSSE, C., E. (1996) Plasma disposition kinetics of albendazole metabolites in pigs fed different diets. *Research in Veterinary Science*, 60, 152-156.
- ANZENBACHEROVÁ, E. □ ANZENBACHER, P. (1999) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Bulletin of Czech Society for biochemistry and molecular biology*, 27, 4–33.
- BAPIRO, T., E., ANDERSSON, T., B., OTTER, C., HASLER, J., A. & MASIMIREMBWA, C., M. (2002) Cytochrome P-4501A1/2 induction by antiparasitic drug: dose-dependent increase in ethoxyresorufin O-deethylase activity and mRNA caused by quinine, primaquine and albendazole in HepG2 cells. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 58, 537-542.
- BARRY, M. & FEELY, J. (1990) Enzyme induction and inhibition. *Pharmacology & Therapeutics*, 48, 71–94.
- BENCHAOU, H., A., SCOTT, E., W. & MCKELLAR, Q., A. (1993) Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulfoxide and netobimin in goat. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 16, 237-240.
- BENOIT, E., BESSE, S. & DELATOUR, P. (1992) Effect of repeated doses of albendazole on enantiomerism of its sulfoxide metabolite in goats. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1663-1665.
- BOLAS-FERNANDEZ, F., RAMA-INIGUES, S. & TORRADO, J., J. (2004) Ex vivo anthelmintic activity of albendazole-sulphoxide enantiomers. *Journal of Parasitology*, 90, 407-409.
- BOOBIS, A., R., SESARDIC, D., MURRAY, 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.
- CAPECE, B., P., S., CASTELLS, G., PEREZ, F., ARBOIX, M. & CRISTOFOL, C. (2000) Pharmacokinetic behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep. *Veterinary Research Communications*, 24, 339-348.
- CAPECE, B., P., S., PEREZ, R., ANDALUZ, A., PEREZ, F., GARCIA, F., CASTELLS, G., ARBOIX, M. & CRISTOFOL, C. (2002) Placental transfer of albendazole sulphoxide enantiomers in sheep. *The Veterinary Journal*, 163, 155-160.
- COPELAND, R.A. (1996) Reversible inhibitors. In: *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. VCH Publishers, Inc., New York, pp. 187–209.
- CRISTOFOL, C., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., VALLADARES, J., E. & ARBOIX, M. (1998) Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep. *Veterinary Parasitology*, 78, 233-231.
- CRISTOFOL, C., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., VALLAVERDES, J., E., CARRETERO, A., RUBERTE, J. & ARBOIX, M. (1997) Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat: developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 56-61.
- CRISTOFOL, C., VIRKEL, G., ALVAREZ, L., ARBOIX, M. & LANUSSE, C. (2000) Comparative disposition of ricobendazole enantiomers after intravenous and subcutaneous administration of a racemic formulation to calves. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 21, 303-311.
- CSIKO, G., Y., BANDIDI, G., Y., SEMJEN, G., LACZAY, P., SANDOR, G., V., LEHEL, J. & FEKETE, J. (1996) Metabolism and pharmacokinetics of albendazole after oral administration to chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 322-325.
- DAYAN, A., D. (2003) Albendazole, mebendazole, and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86, 141-159.

- DELATOUR, P., BENOIT, E., BESSE, S. & BOUKRAA, A. (1991a) Comparative enantioselectivity in the sulfoxidation of albendazole in man, dogs and rats. *Xenobiotica*, 2, 217-221.
- DELATOUR, P., BENOIT, E., CAUDE, M. & TAMBUTE, A. (1990b) Species differences in the generation of the chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats. *Chirality*, 3, 156-60.
- DELATOUR, P., BENOIT, E., LECHENET, J. & BESSE, S. (1990a) Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule. *Research in Veterinary Science*, 48, 271-275.
- DELATOUR, P., CURE, M., C., BENOIT, E. & GARNIER, F. (1986) Netobimin (Totabin.SCH): preliminary investigation on metabolism and pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9, 230-234.
- DELATOUR, P., GARNIER, F., BENOIT, E. & CAUDE, I. (1991b) Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulfoxide in sheep, goats and cattle. *Research in Veterinary Science*, 2, 134-138.
- DRESSMAN, J., B. & REPPAS, CH. (2000) In vitro –in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 11, S73-S80.
- FARGETTON, X., GALTIER, P. & DELATOUR, P. (1986) Sulfoxidation of albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes. *Veterinary Research Communications*, 10, 317-324.
- FINK-GREMMELS, J. & VAN MIERT, A., S., J., P., A., M. (1994) Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation. *Analyst*, 119, 2521-2528.
- FINK-GREMMELS, J. & VAN MIERT, A., S., J., P., A., M. (1996) Species differences in biotransformation: conventional models in unconventional animal species. *Experimental Toxicology and Pathology*, 48, 120–125.
- FRAYHA, G., J., SMYTH, J., D., GOBERT, J., G. & SAVEL, J. (1997) The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drug in man. *General Pharmacology*, 28, 273-299.

- GALTIER, P. (1991) Metabolism of benzimidazoles and enzymatic induction activity, *Revue de Medecine Veterinaire*, 142, 633-636.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M., DELATOUR, P., (1986) In vitro sulfoxidation of albendazole by ovine liver microsomes: assay and frequency of various xenobiotics. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 447-450.
- GALTIER, P. & ALVINERIE, M. (1996) Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep. *Veterinary Research*, 27, 363-372.
- GIBSON, G., G. & SKETT, P. (2001) In: *Introduction to Drug Metabolism*, Nelson Thornes Publishers, United Kingdom.
- GOTTSCHALL, D., W., THEODORIDES, V., J. & WANG, R. (1990) The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today*, 4, 115.
- GYURIK, R., CHOW, A., ZABER, B., BRUNER, E., MILLER, J., VILLANS, A., PETKA, L. & PARISH, R. (1981) Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 9, 503-509.
- HENNESSY, D., R., SANGSTER, N., C., STEEL, J., W. & COLLINS, G., H. (1993) Comparative pharmacokinetic behaviour of albendazole in sheep and goats. *International Journal of Parasitology*, 23, 321-5.
- HENNESSY, D., R., STEEL, J., W., LACEY, E., EAGLESON, G., K. & PRICHARD, R., K. (1989) The disposition of albendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 12, 421-429.
- CHARTIER, C., PORS, I., BERNARD, N. & HUBERT, J. (1996) Efficacy of an albendazole slow-release capsule for the control of susceptible or resistant nematode parasites of dairy goats. *Veterinary Parasitology*, 67, 197-206.
- CHARTIER, C., PORS, I., HUBERT, J., ROCHETEAU, D., BENOIT, C., & BERNARD, N. (1998) Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Ruminant Research*, 29, 33-41.
- CHAURET, N., GAUTHIER, A., MARTIN, J. & NICOLL-GRIFFITH, D., A. (1997) In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat and horse. *Drug Metabolism And Disposition*, 25, 1130-1136.

- JACOBS, D., E., J. & TAYLOR, M., A. (2001) Drugs used in the treatment and control of parasitic infections. In: BISHOP, J. (Ed.), *The Veterinary Formulary*, Fifth ed. Pharmaceutical Press, London, str. 219-245.
- JUNG, H., MEDINA, L., GARCIA, L., FEUENTES, I. & MORENO.ESPARZA, R. (1998) Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 43-48.
- KOUBEK, P. & KAMLER, S. (2003) Původní nebo nepůvodní, divoký nebo zdivočelý. *Svět myslivosti*, 5, 8-10.
- LACEY, E. (1990) Mode of action of benzimidazoles, *Parasitology Today*, 6, 112-115.
- LU, CH. & LI, A., P. (2001) Species comparison in P450 induction: Effects of dexamethazone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chemico-Biological Interactions*, 134, 271-281.
- LANCHOTE, V., L., TAKAYANAGUI, O., M. & MATEUS, F., H. (2004) Enantioselective renal excretion of albendazole metabolites in patients with neurocysticercosis. *Chirality*, 16, 520-525.
- LANUSSE, C., E., NARE, B., GASCON, L., H. & PRICHARD, R., K. (1992) Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminant and intestinal fluids of sheep and cattle. *Xenobiotica*, 22, 419-426.
- LANUSSE, C., E., NARE, B. & PRICHARD, R., K. (1993b) Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole. *Xenobiotica*, 23, 285-295.
- LANUSSE, C., E., GASCON, L., H. & PRICHARD, R., K. (1993a) Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle: relationship with plasma disposition kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 16, 38-47.
- LANUSSE, C., E. & PRICHARD, R., K. (1990) Pharmacokinetic behaviour of netobimin and its metabolites in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 170-178.
- LANUSSE, C., E. & PRICHARD, R., K. (1993) Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintic in ruminants. *Drug metabolism reviews*, 25, 235-279.

- LAWRENZ, A., EGLIT, S. & KROKER, R. (1992) Investigations on metabolism of albendazole in the isolated perfused gut of rats. *Deutsche Tierärztliche wochenschrift*, 99, 416-418.
- LEWIS, D., F., V. & LAKE, B., J. (1998) Molecular modelling
- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., MASTROMARINO, M. & LANUSSE, C. (1997) Enhanced plasma availability of the metabolites of albendazole in fasted adult sheep. *Veterinary Research Communications*, 21, 201-211.
- MANTOVANI, A., RICCIARDI, C., STAZI, A., V. & MARCI, C. (1995) Effects observed on gestational day 13 in rat embryos exposed to albendazole. *Reproductive Toxicology*, 9, 265-273.
- MARQUES, M., P., D., TAKAYANAGUI, O., M., BONATO, P., S., SANTOS, S., R., C., J. & LANCHOTE, V., L. (1999) Enantioselective kinetic disposition of albendazole sulfoxide in patients with neurocysticercosis. *Chirality*, 11, 218-223.
- MARRINER, S., E., MORRIS, D., L., DICKSON, B. & BOGAN, J., A. (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 30, 705-708.
- MAUREL, P. (1996) The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22, 105-132.
- MCCRACKEN, R., O. & LIPKOWITZ, K., B. (1990) Experimental and theoretical studies of albendazole, oxbendazole, and tioxidazole. *Journal of Parasitology*, 76, 180-185.
- MCCRACKEN, R., O. & STILLWELL, W., H. (1991) A possible biochemical-mode of action for benzimidazole anthelmintic. *International Journal for Parasitology*, 21, 99-104.
- 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 eighth-month-old sheep. *International Journal of Parasitology*, 25, 1207-1212.
- 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: effects of parasitism and age. *British Veterinary Journal*, 149, 101-113.

- MERINO, G., ALVAREZ, A., I., PRIETO, J., G. & KIM, R., B. (2002) The anthelmintic agent albendazole does not interact with P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 365-369.
- MIRFAZAEIAN, A., ROUINI, M., R. & DADASHZADEH, S. (2003) Time dependent pharmacokinetics of albendazole in human. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 24, 199-204.
- MORONI, P., BURONFOSSE, T., LONGIN SAUVAGEON, C., DELATOUR, P. & BENOIT, E. (1995) Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 2, 160-165.
- MURRAY, M., HUDSON, A., M. & YASSA, V. (1992) Hepatic microsomal metabolism of the anthelmintic benzimidazole fenbendazole: enhanced inhibition of cytochrome P450 reactions by oxidized metabolites of the drug. *Chemical Research in Toxicology*, 5, 60-66.
- NAVARRO, M., CANUT, L., CARRETERO, A., CRISTOFOL, C., PEREZ-APARICIO, F-C., ARBOIX, M. & RUBERTE, J. (1999) Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin. *Reproductive Toxicology*, 13, 295-302.
- NAVARRO, M., CRISTOFOL, C., MANESSE, M., SAUTET, J., CARRETERO, A., PEREZ-APARICIO, F., J., ARBOIX, M. & RUBERTE, J. (1997) Study of the distributio of albendazole-sulphoxide (ABZ-SO) in fertilized egg compartments. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 37, 191-196.
- OKEY, A., B. (1990) Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacology & Therapeutics*, 45, 241-298.
- PELKONEN, O., MÄENPÄÄ, J., TAAVITSAINEN, P., RAUTIO, A. & RAUNIO, H. (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*, 28, 1203-1253.
- PENICAUT, B., MAUGEIN, P., MAISONNEUVE, H. & ROSSIGNOL, J., F. (1983) Pharmacokinetics and urinary metabolism of albendazole in man. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, 76, 698-708.

- PISCOPO, S., E. & SMOAK, I., W. (1997) Comparison of effects of albendazole sulfoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos. *American Journal of Veterinary Research*, 58, 1038-1042.
- RAWDEN, H.C., KOKWARO, G.O., WARD, S.A., & EDWARDS, G. (2000) Relative contribution of cytochrome P-450 and flavine-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49, 313-322.
- REDONDO, P., A., ALVAREZ, A., I., GARCIA, J., L., LARRODE, O., M., MERINO, G. & PRIETO, J., G. (1999) Presystemic metabolism of albendazole: experimental evidence of an efflux process of albendazole sulfoxide to intestinal lumen. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 736-740.
- RICE, J., M., DIWAN, B., A., WARD, J., M., NIMS, R., W. & LUBET, R., A. (1992) Phenobarbital and related compounds: approaches to interspecies extrapolation. *Relevance of Animal Studies to the Evaluation of Human Cancer Risk*, 231-249.
- RODRIGUES, A., D. (2002) In: *Drug-Drug Interactions*. Marcel Dekker, New York, Basel.
- RODRIGUES, J., M., BORIES, C., EMERY, I., FESSI, H., DEVISSAGUET, J., P. & LIANCE, M. (1995) Development of an injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against echinococcus multilocularis metacestode. *International Journal for Parasitology*, 25, 1437-1441.
- ROLIN, S., EL AMRI, H.S., BATT, A.M., LEVY, M., BAGREL, D., SIEST, G., (1989) Study of the in vitro bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatome cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 5, 1-14.
- RONG, Y., F., JIANG, M., Y. & SHI, X., L. (1989) In vitro and in vivo effects of several selected anthelmintics and chemicals on egg.laying and egg development of *Ascaridia galli*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 20, 84-89.
- SANCHEZ, S., F., ALVAREZ, L., I. & LANUSSE, C., E. (1996). Nutritional condition affect the disposition kinetics of albendazole in cattle. *Xenobiotica*, 26, 307-320.

- SANCHEZ, S., F., ALVAREZ, L., I. & LANUSSE, C., E. (1997) Fasting-induced changes to the pharmacokinetic behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20, 38-47.
- SANCHEZ, S., ALVAREZ, L., SALLOVITZ, J. & LANUSSE, V. (2000) Enhanced plasma and target tissue availabilities of albendazole and albendazole sulphoxide in fasted calves: evaluation of different fasting intervals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, 193-200.
- SEGLIN, P., O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology*, 13, 29-83.
- SEGEL, I., H. (1975) Simple inhibition systems, Rapid equilibrium partial and mixed-type inhibition. In: *Enzyme kinetics*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 100–226.
- SINGH, D., SANYAL, P., K., SWARNKAR, C., P., KHAN, F., A. & BHAGWAN, P., S., K. (1999) Influence of diet type and pretreatment fasting on the disposition kinetics of albendazole in sheep. *Veterinary Research Communications*, 23, 229-240.
- SOLANA, H., D., RODRIGUES, J., A. & LANUSSE, C., E. (2001) Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitology Research*, 87, 275-280.
- SOLANA, H., D., SALLOVITZ, J., M., LANUSSE, C., E. & RODRIGUEZ, J., A., (2002) Enantioselective binding of albendazole sulphoxide to cytosolic proteins from helminth parasites. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 24, 7-13.
- SOLANA, H., D., TERUEL, M., T., NAJLE, R., LANUSSE, C., E. & RODRIGUES, J., A. (1998) The anthelmintic albendazole affects in vivo the dynamics and the de-tyrosination-tyrosination cycle of rat brain microtubules. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*, 48, 199-205.
- SOLANA, H., D., SALLOVITZ, J., M., NAJLE, R., RODRIGUEZ, J., A. & LANUSSE, C., E. (2000) Liver sulphoxidative metabolism of albendazole in rat: enantioselectivity and effect of methimazole. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22, 83-88.

- SOUHAILI EL AMRI, H., FARGETTON, X., DELATOUR, P. & BATT, A.M. (1987) Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica*, 10, 1159-1168.
- SOUHAILI EL AMRI, H., MOTHE, O., TOTIS, M., MASSON, C., BATT, A.M., DELATOUR, P. & SIEST, G. (1988) Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2, 758-764.
- SWARNKAR, C., SANYAL, P., K., SINGH, D., KHAN, F., A. & BHAGWAN, P., S., K. (1998) Comparative disposition kinetics of albendazole in sheep following oral and intraruminal administration. *Veterinary Research Communications*, 22, 545-551.
- SZOTÁKOVÁ, B., BALIHAROVÁ, V., LAMKA, J., NOZINOVÁ, E., WSÓL, V., VELÍK, J., MACHALA, M., NECA, J., SOUCEK, P., SUSOVÁ, S. & SKÁLOVÁ, L. (2004) Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Research in Veterinary Science*, 76, 43-51.
- TERUEL, M., T., FELIPE, A., E., SOLANA, H., D., SALLOVITZ, J., M. & LANUSSE, C., E. (2003) Placental and fetal toxicity of albendazole in Wistar rats. *Veterinary and Human Toxicology*, 43, 131-136.
- TESTA, B. (1995) Biochemistry of redox reactions. In *The metabolism of drugs and other xenobiotics*.
- TESTA, B & CALDWELL, J. (ed.), Academic Press, London.
- VAN'T KLOOSTER, G., A., BLAAUBOER, B., J., NOEDHOEK, J. & VAN MIERT, A., S. (1993) Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep and cattle. *Biochemical Pharmacology*, 46, 1781-1790.
- VAN'T KLOOSTER, G., A., WOUTERSEN.VAN NIJNANTEN, F., M., BLAAUBOER, B., J., NOORHOEK, J. & VAN MIERT, A., S. (1994) Applicability of cultured hepatocytes derived from goat, sheep, and cattle in comparative drug metabolism studies, *Xenobiotica*, 24, 417-428.

- VAN'T KLOOSTER, G., A., E. (1992) Drug metabolism in ruminants. An in vitro approach. Thesis, Utrecht University.
- VELIK, J., BALIHAROVA, V., FINK-GREMMELS, J., BULL, S., LAMKA, J. & SKALOVA, L. (2004) Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in Veterinary Science*, 76, 95-108.
- VILLAVERDE, C., ALVAREZ, A., I., REDONDO, P., VOCES, J., DEL ESTAL, J., L. & PRIETO, J., G. (1995) Small intestinal sulphoxidation of albendazole. *Xenobiotica*, 25, 433-441.
- VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., SORACI, A., SANSINANEA, A. & LANUSSE, C. (2000) Enantioselective liver microsomal sulphoxidation of albendazole in cattle: effect of nutritional status. *Xenobiotica*, 30, 381-393.
- 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. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24, 31-37.
- VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., PIS, A. & LANUSSE, C. (2002) In vitro ruminal biotransformation of benzimidazole sulphoxide anthelmintics: enantioselective sulphoreduction in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25, 15-23.
- VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., SALLOVITZ, J., PIS, A. & LANUSSE, C. (2004) Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulphoxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and goat. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 1-9.
- ZHANG, B., H., JIANG, Y., D., TAO, P. & SHI, R., (1984) Trial of albendazole in the removal of tapeworms from ducks and geese. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 10, 24-25.
- ZWEERS-ZEILMAKER, W., M. (1998) Effects of non steroidal anti-inflammatory drugs and sulfonamides on hepatic cytochrome P4502C activity in vitro in goats and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21, 154-157.

VIII.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP adenosin difosfát

AGP α .glykoprotein

ATP adenosin trifosfát

AUC area under curve, plocha pod křivkou závislosti plasmatické koncentrace v čase

BROD benzoxyresorufin-O-dearylace

C_{max} maximální koncentrace látky v plasmě

CYP450 cytochrom P 450

DNA deoxyribonukleová kyselina

EC₅₀ efektivní koncentrace induktoru způsobující nárůst měřené veličiny o 50%

EROD 7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita

FMO flavinové mikrosomální monooxygenázy

HPLC high performance liquid chromatography

IC₅₀ koncentrace inhibitoru způsobující pokles měřené aktivity o 50%

K_i inhibiční konstanta

K_m a Michaelisova konstanta

M molární koncentrace

mRNA messenger ribonukleová kyselina

MS mass spectofotometry

MTT

pK_a disociační konstanta

QRT-PCR quantitative real time polymerase chain reaction

S koncentrace substrátu

USP United states pharmacopoea V_{max} maximální rychlost reakce

V reakční rychlost

WHO world health organization

IX.

PŘÍLOHY

IX.1.

Vlastní uveřejněné publikace s tematikou disertační práce

PŘÍLOHA 1

Velík, J., Baliharová, V., Skálová L., Szotáková, B., Wsól, V. and Lamka, J.: Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat isolated hepatocytes. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2003; 26, 397-302.

PŘÍLOHA 2

Velík, J., Baliharová, V., Skálová, L., Szotáková, B., Wsól, V. and Lamka, J.: Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2005; 28, 377-384.

PŘÍLOHA 3

Velík, J., Baliharova, V., Fink-Gremmels, J., Bull, S., Lamka, J., Skalova, L.: Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. Research in Veterinary Science 2004; 76, 95-108.

PŘÍLOHA 4

Baliharová, V., Velík, J., Lamka, J., Balarinová, R. and Skálová, L.: The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat Research in Veterinary Science 2003; 75, 231-239.

PŘÍLOHA 5

Baliharová, V., Velík, J., Lamka, J., Fimanová, K. and Skálová, L.: The inhibition of activities of rat and mouflon hepatic cytochromes P450 by albendazole and its metabolites. Pharmaceutical Reports 2005; 57, 97-106.

PŘÍLOHA 6

Velík, J., Szotáková B., Baliharová, V., Lamka, J., Šavlík, M., Wsól, V., Šnejdrová, E. and Skálová, L.. Albendazole repeated administration

induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in muflon (Ovis musimon). Research in Veterinary Science 2005; 78, 255-263.

VII.2.

Uveřejněné publikace mimo téma disertační

1

Szotáková, B., Baliharová, V., Lamka, J., Nožinová, E., Wsól, V., Velík, J., Machala, M., Neča, J., Souček, P., Š. and Skálová, L. Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. Research in Veterinary Science 2004; 76, 43-51.

2

Skálová, L., Wsól, V., Baliharová, V., Král, R., Szotáková, B., Velík, J. and Lamka, J. Reduction of flobufen in pig hepatocytes. Effect of pig breed and castration. Chirality 2003; 15, 213-219.

3

Král, R., Skálová, L., Szotáková, B., Velík, J., Schroterová, L., Babú, Y.N. and Wsól, V. The stereospecificity of flobufen metabolism in isolated guinea pig hepatocytes. BMC Pharmacology 2003; 3, 5.

4

Baliharová, V., Velík, J., Šavlík, M., Lamka, J., Tahotná, L., Szotáková, B. and Skálová, L. The effects of fenbendazole, flubendazole and mebendazole on activities of hepatic cytochromes P450 in pig. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2004; 27, 85-90.

5

Lamka, J., Nevole, Z., Ducháček, L., Velík, J. and Zavřel, S. The comparison of mebendazole and flubendazole anthelmintic efficacy in experimental treatment of mouflon (Ovis musimon) muelleriosis. Veterinární Medicina 2000; 45,45-48.

VII.3.

Vlastní konferenční příspěvky

Jakub Velík, Vendula Baliharová, Jiri Lamka, Lenka Skálová, Vladimír Wsól: BIOTRANSFORMATION OF ALBENDAZOLE IN RAT AND MOUFLON HEPATOCYTES, XVII. Biochemický zjazd, Stará Lesná, Slovakia, 2002.

Jakub Velík, Vendula Baliharová, Jiří Lamka, Lenka Skálová, Vladimír Wsól: INTERSPECIES COMPARISON OF ALBENDAZOLE ENANTIOSELECTIVE SULFOXIDATION IN PRIMARY CULTURED HEPATOCYTES, 18th European Workshop on Drug Metabolism, Valencia, Spain, 2002.

Jakub Velík, Vendula Baliharová, Lenka Skálová, Barbora Szotáková, Vladimír Wsól, Jiří Lamka: IN VITRO STEREOSPECIFIC ALBENDAZOLE BIOTRANSFORMATION IN LABORATORY ANIMALS: COMPARISON WITH MAN, The Leiden International Medical Students Congress, Leiden, The Netherlands, 2003.

Jakub Velík, Lenka Skálová, Vendula Baliharová, Barbora Szotáková, Vladimír Wsól, Jiří Lamka: EFFECT OF REPEATED ALBENDAZOLE ADMINISTRATION TO MOUFLONS ON ALBENDAZOLE METABOLISM IN VIVO AND IN VITRO, 13th International Conference on CYTOCHROME P450, Prague, 2003.

PŘÍLOHA 1

PŘÍLOHA 2

PŘÍLOHA 3

PŘÍLOHA 4

PŘÍLOHA 5

PŘÍLOHA 6

