

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Mgr. Ivan Vokřál

**Využití LC/MS pro studium biotransformace
xenobiotik u helmintů**

Disertační práce

Vedoucí disertační práce:

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Mgr. Ivan Vokřál

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce paní **doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D.** za svědomité vedení, podporu při studiu a vědecké práci, dále pak paní **prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D.** za cenné rady při studiu. Panu **prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc.** děkuji za poodhalení tajů zajímavého světa parazitologie a veterinární farmakologie.

Dále bych rád poděkoval paní **Mgr. Haně Bártíkové** za to, že se mnou tvořila po dobu 4 let mého studia jakousi pomyslnou pracovní dvojici, doplňující se navzájem výsledky i prací.

Velký dík patří mé **ženě Veronice a mé rodině** za podporu psychickou i materiální v průběhu celého mého studia, zvláště pak ve chvílích těžkých.

Stejně tak patří dík všem postgraduálním studentům a dalším spolupracovníkům z kateder biochemických věd a farmakologie a toxikologie.

Speciální poděkování bych rád věnoval paní **Aleně Pakostové**, díky které jsem vždy našel, co jsem potřeboval a u které jsem se vždy mohl spolehnout, že mou žádost o pomoc vyslyší.

Děkuji také za finanční podporu Grantové agentury České republiky (grant číslo P502/10/0217), Grantové agentury Univerzity Karlovy (grant číslo 71808/B/2008) a Specifickému vysokoškolskému výzkumu (grant číslo SVV 2012 265 004).

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát:

Mgr. Ivan Vokřál

Školitel:

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název disertační práce:

Využití LC/MS pro studium biotransformace xenobiotik u helmintů

Parazitě každoročně způsobují mnoho ztrát na lidských životech, ale i na hospodářských zvířatech. Jednou z efektivních zbraní, které proti nim můžeme využít, jsou anthelmintika. V řadě případů však anthelmintika přestávají působit a dochází k rozvoji rezistence. Jednou z možných příčin vzniku rezistence je inaktivace léčiva na neaktivní nebo málo aktivní produkty pomocí biotransformace enzymatickým systémem parazita.

Cílem této práce bylo přinést nové poznatky o biotransformaci léčiv u helmintů. Důraz byl kladen na vztah biotransformace k rezistenci. Jednou z možných technik, jak tohoto cíle dosáhnout, je studovat přímo produkty biotransformace, tedy metabolity. V dnešní době se tato problematika nejčastěji řeší za pomoci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a proto i pro splnění našich cílů byla tato technika využita.

Byly studovány biotransformace u zástupců tasemnic, motolic a hlístic. Tam, kde to bylo možné, byli studováni zástupci hospodářsky významní jako vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) nebo motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*). U tasemnic pak byla ke studiu použita modelová tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*).

Studovány byly látky ze skupin benzimidazolů, pyrazinoisochinolinů a makrocyclických laktonů. U benzimidazolových léčiv byla schopnost parazitů inaktivovat léčivo potvrzena hlavně u těch léčiv, která obsahují karbonylovou skupinu. U vlasovky slézové byl dále potvrzen vztah mezi rezistencí a aktivitou enzymů první i druhé fáze biotransformace.

Získané informace potvrzují, že parazité jsou schopni za určitých podmínek léčiva inaktivovat a tak se bránit proti léčbě. Data naměřená v této práci jsou potenciálně využitelná při dalším studiu vztahů biotransformace a rezistence u helmintů, stejně tak, jako v možném návrhu nových odolnějších léčiv.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Ivan Vokřál
Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

The use of LC/MS for the study of biotransformation of xenobiotics in helminths

Annually, parasites cause many losses regarding not only human lives but also the livestock. One of the most effective weapons that can be used against them are anthelmintics. However, in many cases anthelmintics cease to work and resistance development occurs. One of the possible mechanisms of resistance is the biotransformation of the drug to ineffective or less active products by the parasite.

The aim of this work was to bring new knowledge about the biotransformation of drugs in helminths. Emphasis was given to the relationship between biotransformation and the resistance of parasites against anthelmintic drugs. A possible technique to achieve this goal is to study directly the products of biotransformation, i.e. metabolites. As this issue is nowadays most frequently solved by liquid chromatography and mass spectrometry, we used this technique to meet our goals.

Biotransformation was studied in representatives of tapeworms, flukes and roundworms. Where possible, economically important representatives as Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) or lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*) were in the centre of our attention. In the group of tapeworms, model rat tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) was used.

Substances from groups of benzimidazoles, macrocyclic lactones and pyrazinoisoquinolines were studied. The ability of parasites to inactivate drugs was confirmed in the group of benzimidazoles, especially for drugs containing a carbonyl group. In the case of Barber's pole worm, the relationship between the resistance and the activity of biotransformation enzymes was further confirmed.

Acquired information confirms that the parasites are able, under certain conditions, to inactivate the drug and thus resist the treatment. Data measured in this work are potentially usable in further studies of the relationship between biotransformation and resistance in helminths, as well as in possible design of new drugs.

Obsah

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | METABOLISMUS LÉČIV | 10 |
| 2.1 | METABOLISMUS XENOBIOTIK – ZÁKLADNÍ PRINCIPY | 12 |
| 2.2 | FÁZE I | 14 |
| 2.3 | FÁZE II..... | 18 |
| 2.4 | TRANSPORT (PŘÍJEM/VÝDEJ)..... | 19 |
| 3 | HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE VE STUDIU BIOTRANSFORMACE LÉČIV ...21 | |
| 3.1 | IONIZAČNÍ TECHNIKY | 22 |
| 3.2 | HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY | 24 |
| 3.3 | TYPY SKENŮ..... | 27 |
| 3.4 | TECHNIKY VEDOUcí K URYCHLENÍ IDENTIFIKACE METABOLITŮ | 28 |
| 3.5 | PŘÍPRAVA A ÚPRAVA VZORKŮ..... | 32 |
| 4 | PARAZITÉ | 36 |
| 4.1 | TASEMNICE | 36 |
| 4.2 | MOTOLICE..... | 37 |
| 4.3 | HLÍSTICE | 39 |
| 5 | LÉČBA ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÝCH HELMINTY | 40 |
| 5.1 | LÉČIVA..... | 40 |
| 5.2 | LÉČBA CESTODÓZ | 41 |
| 5.3 | LÉČBA TREMATODÓZ | 42 |
| 5.4 | LÉČBA NEMATODÓZ | 43 |
| 6 | REZISTENCE | 44 |
| 7 | CITACE | 46 |
| 8 | ZKRATKY | 55 |
| 9 | CÍLE PRÁCE | 57 |
| 10 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – VÝSLEDKY A DISKUSE | 58 |
| 11 | ZÁVĚR | 65 |
| 12 | PŘÍLOHY | 67 |
| 12.1 | PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU PRÁCE | 67 |
| 12.2 | SEZNAM PUBLIKACÍ NEVZTAHUJÍCÍCH SE K TÉMATU PRÁCE..... | 68 |
| 12.3 | SEZNAM PREZENTACÍ NA VĚDECKÝCH SETKÁNÍCH | 69 |

1 Úvod

Za miliardy let, po které existuje na zemi život, si organismy na naší planetě vybudovaly účinné mechanismy umožňující jim se vypořádat ve svém těle s látkami, které jim nejsou vlastní, s xenobiotiky. Ať už se jedná o mechanismy zahrnující transport nebo biotransformaci, je nutné s nimi počítat dnes více než kdy jindy ve vztahu k léčivům, denně aplikovaným milionům lidí i zvířat.

Technik, jak studovat metabolismus léčiv, je mnoho. Patří mezi ně techniky spojené s magnetickou rezonancí, značení pomocí izotopů a v neposlední řadě také technika hmotnostní spektrometrie. Tato technika si za desítky let své existence vybudovala pevné místo v analytických laboratořích. Bez ní si v současnosti nelze představit nový vývoj léčiv a ani seriózní farmakokinetické studie. Nejinak tomu je u studií klinických. Uživatel hmotnostního spektrometru má v rukou poměrně mocný nástroj, který mu umožňuje stanovovat hmoty a částečně i struktury studovaných látek. Spojením s vhodně zvolenou separační technikou pak získáváme nástroj, který má velmi široké využití v celém spektru přírodních a lékařských věd.

V dnešní době je možné hmotnostní spektrometrii chápat jako prostředek, pomocí něhož lze snadno určit metabolické dráhy jednotlivých léčiv. Vysoká přesnost a citlivost užívaných metod dosažení cílů usnadňuje. Spojení této techniky s technikami separačními nejčastěji typu plynové chromatografie nebo dnes hlavně vysokoúčinné kapalinové chromatografie nám umožňuje získat informace i o velice nepatrných množstvích látek a metabolitů včetně jejich charakteru.

Veškeré tyto vlastnosti předurčují spojení separační techniky zvláště kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie k využití tam, kde nelze jednoduše získat dostatečná množství vzorku např. pro nukleární magnetickou rezonanci. Jedním z takových případů je také studium metabolismu u helmintů. Zde celá řada helmintů je ve velikosti pouze několika centimetrů a díky tomu produkovaná množství metabolitů dosahují velmi nízkých koncentrací.

Na první pohled se může zdát studium metabolismu léčiv, konkrétně anthelmintik, u helmintů jako činnost, která postrádá smysl. Uvědomíme-li si však vztah metabolismu k možnému vzniku rezistence, tak jako tomu bývá u patogenních bakterií (což jsou v podstatě také organismy žijící parazitárním způsobem života), pak

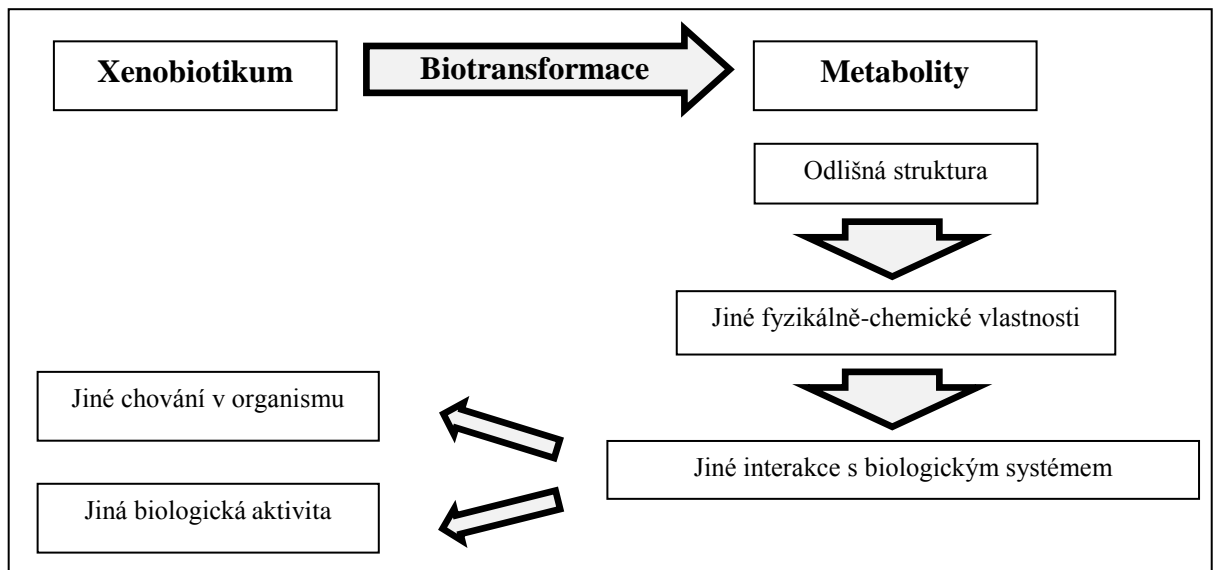
je zde důvod tohoto studia zcela jasný. Potřeba znalosti o možných mechanismech rezistence dále nabývá na významu v momentě, kdy si uvědomíme, jak velké množství různých druhů žije na světě parazitickým způsobem života a jak málo léčiv proti nim máme.

2 Metabolismus léčiv

Na začátku této práce je zcela zásadní a nezbytné ujasnit si pojmy metabolismus versus biotransformace a xenobiotikum versus eobiotikum. Termíny biotransformace a metabolismus jsou často užívány jako synonyma. Termín metabolismus má však být užíván spíše k popisu celkového osudu xenobiotika v organismu, což zahrnuje absorpci, distribuci, biotransformaci a eliminaci. Biotransformaci pak můžeme chápat úzce jako činnost, jejíž produkty nazýváme metabolity. Běžně jsou však pojmy metabolismus a biotransformace zaměňovány (Casarett et al., 2001). V souvislosti s metabolismem se také často setkáváme s výrazem „xenobiotikum“. Každý organismus se nevyhnutelně setkává s cizorodými sloučeninami, které zahrnují jak přírodní tak vyrobené sloučeniny, jakými jsou například léčiva, průmyslové chemikálie, pesticidy, polutanty, produkty pyrolýzy ve vařeném jídle, alkaloidy, sekundární rostlinné metabolity a toxiny produkované plísněmi, rostlinami a zvířaty. Všechny tyto pro tělo cizorodé látky můžeme nazvat xenobiotiky. Protikladem k tomuto slovu je pak slovo „eobiotikum“, které naopak zahrnuje látky tělu vlastní (Casarett et al., 2001).

Biotransformace je biochemický proces, pomocí kterého se endogenní komponenty a xenobiotika mění na více hydrofilní (ve vodě rozpustné) entity, což zlepšuje možnosti jejich vylučování z těla. Ve většině případů biotransformace vede k tvorbě neaktivních látek. Není však neobvyklé, že biotransformace vede i k nežádoucím jevům, zvláště v souvislosti s léčivy. Tyto mohou zahrnovat rychlou eliminaci, tvorbu farmakologicky aktivních metabolitů, interakce mezi léčivy prostřednictvím inhibice nebo indukce metabolizujících enzymů a také možnost tvorby toxických metabolitů. Z tohoto důvodu je nezbytné znát veškeré informace o metabolismu a biotransformaci nově vyvíjených látek a léčiv u člověka i zvířat. Velký důraz pak musí být kladen právě na farmakologický a toxikologický význam případných metabolitů (Prakash et al., 2007). Základní vztahy mezi biotransformací a vlastnostmi metabolitu ukazuje obrázek 1. Z hlediska tématu a cílů této práce je nutné dodat, že studium metabolismu léčiv může být také zdrojem informací o schopnosti patogenů, ať již jednobuněčných nebo vícebuněčných, bránit se léčbě pomocí biotransformace léčiva na neaktivní sloučeniny. Všeobecně známá je tvorba beta-laktamas u bakterií (Pérez-Llarena et Bou, 2009), nicméně mnohobuněčné typy

patogenů také nezůstávají pozadu a prokazuje se, že i zde může metabolismus roli ve vzniku rezistence hrát (Coles, 2005).



Obr. 1: Schéma vztahů mezi biotransformací, fyzikálně chemickými vlastnostmi metabolitů a jejich biologickou aktivitou (Skálová et Boušová, 2011, upraveno).

2.1 Metabolismus xenobiotik – základní principy

In vivo je každá molekula typicky metabolizována množstvím paralelních nebo sekvenčních reakcí, společně nazývaných metabolické dráhy. Již v roce 1947 R.T. Williams předpokládal, že metabolismus nastává ve dvou odlišných fázích, „fázi I“ a „fázi II“. Tyto termíny jsou používané do dnes. Musíme si však uvědomit, že toto pravidlo není výhradní a že může nastat situace, kdy fáze I není následována fází II a kdy fázi II nepředchází fáze I.

Reakce spojené s fází I jsou běžně popisovány jako „funkcionalizační“ a zahrnují oxidaci, redukci a hydrolýzu (detailněji viz tabulka 1.). Tyto reakce zavádějí do molekuly metabolizované látky novou polární funkční skupinu (oxidace), modifikují existující funkční skupiny na více polární (redukce), případně odhalují existující polární funkční skupiny (hydrolýzy). Nejběžnější polární funkční skupiny odkrývané nebo zaváděné v reakcích fáze I jsou hydroxyl (-OH), amino skupina (-NH-) a karboxylová skupina.

Reakce spojené s fází II se nejčastěji popisují jako konjugační a zahrnují glukuronidaci, sulfonaci, konjugaci s glycinem/glutaminem, acetylaci, metylaci a konjugaci s glutationem (detailněji viz tabulka 1.). Jedná se o substituční reakce, které spojují novou skupinu buďto s parentní látkou nebo metabolitem fáze I. Některé konjugační reakce způsobují dramatický nárůst v polaritě, a tím pádem i exkreci, léčiva přidáním ionizovatelné funkční skupiny: sulfonace, glukuronidace a konjugace s aminokyselinami. Jiné konjugační reakce pouze ukončují terapeutickou aktivitu: metylace a acetylace. Jeden typ konjugačních reakcí chrání proti reaktivním metabolitům: konjugace s glutationem (Nassar et al., 2009).

Tab. 1: Zařazení základních reakcí dle fáze I a fáze II (Gibson et Skett, 2001, upraveno)

| Fáze I | Fáze II |
|-------------|---------------------------------|
| Oxidace | Glukuronidace / Glukosidace |
| Redukce | Sulfonace |
| Hydrolýza | Metylace |
| Hydratace | Acetylace |
| Isomerizace | Konjugace s aminokyselinami |
| | Konjugace s glutationem |
| | Konjugace s mastnými kyselinami |
| | Kondenzace |

Nelze také zapomínat na transportní proteiny, které se uplatňují jak v transportu léčiv, tak endogenních substancí. Dnes je jasné, že transportéry hrají roli jak v příjmu, tak ve výdeji léčiv i jiných chemických substancí v různých tkáních a mohou být klíčovým činitelem ve farmakokinetice léčiva. Inhibice a indukce různých transportérů ve tkáních může vést, a často také vede, k interakcím, které mohou mít za následek výskyt nežádoucích účinků, případně úplné vymizení účinku (Nassar et al., 2009). Transport, konkrétně export, je také v úzkém vztahu k biotransformaci léčiva, protože právě effluxní transportéry napomáhají odstranění metabolizovaného léčiva z buňky (Marquez et Van Bambeke, 2011).

V souvislosti s tématem a cíli práce je pak dobré zmínit roli transportérů ve vztahu k rezistenci na léčbu. Například u parazita *Schistosoma mansoni* byla prokázána vyšší exprese RNA pro transportní protein SMDR2, což je homolog P-glykoproteinu, po expozici subterapeutickými dávkami léčiva praziquantel (PZQ). Stejně tak byla zjištěna vyšší exprese tohoto transporteru u izolátů *S. mansoni* z Egypta, kde byla zjištěna nižší citlivost k léčbě pomocí PZQ (Messerli et al., 2009). Parazitě jsou však zatím z hlediska této problematiky relativně málo prozkoumanou skupinou organismů. Jinak tomu ovšem je u celé řady bakterií, kde je již zcela evidentní, že effluxní transportéry přispívají k rezistenci proti léčbě antibiotiky, nebo dokonce tvoří hlavní část mechanismu rezistence. Effluxní transportéry byly zjištěny u Gram-negativních bakterií, Gram-pozitivních bakterií i mykobakterií (Li et Nikaido, 2009). S transportéry

a rezistencí na léčbu se můžeme setkat také u lidí, případně zvířat, kdy některé typy nádorů exprimují zvýšený počet effluxních transportérů, což má i zde za následek snížení účinku léčby, případně jeho plné vymizení (Baguley, 2010).

Cílem studia všech výše zmíněných jevů je identifikovat hlavní metabolity, stanovit jejich toxicitu, biologickou aktivitu, eventuálně farmakokinetiku. Minimálně v identifikaci metabolitů a ve farmakokinetice metabolitů i parentní látky mohou v dnešní době hrát velkou roli techniky kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC/MS).

2.2 Fáze I

Jak již bylo nastíněno v úvodu k této kapitole, fáze I metabolismu xenobiotika zahrnuje zvýšení polariry molekuly. Jako příklady biotransformačních reakcí jsou v této kapitole zmíněny dvě – oxidační reakce a redukční reakce. S oběma z těchto zmiňovaných reakcí se můžeme setkat u helmintů studovaných v této práci.

2.2.1 Oxidační reakce

Oxidační reakce zahrnují: hydroxylace, oxidace alkoholů a aldehydů, oxidační deaminace, dealkylace, oxidační dehalogenace, N-oxidace, S-oxidace.

Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) jsou širokou nadrodinou hemoproteinů. Jsou klíčovými enzymy nejen v metabolismu xenobiotik, ale hrají úlohu i v metabolismu eobiotik. Vyskytují se ve velkém počtu isoformech a byly nalezeny jak u prokaryotních, tak i eukaryotních organismů. V současné době je již známo několik tisíc genů kódujících CYP. V lidském organismu jsou nejčastěji zastoupeny v játrech, gastrointestinálním traktu, plicích a ledvinách, avšak v menší míře je nalezneme prakticky ve všech tkáních těla. Na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu se dělí nadrodina CYP do rodin, podrodin a jednotlivých isoformech.

Odlišnost v aminokyselinové sekvenci se projevuje i odlišnými vlastnostmi jako preference k různým substrátům či citlivost k některým induktorům a inhibitorům. Zastoupení jednotlivých isoformech se u různých organismů liší.

Nejvýznamějšími CYP z hlediska metabolismu xenobiotik u člověka jsou: CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A1, CYP1A2, a CYP2E1 (Skálová et Boušová, 2011).

Flavinové monooxygenasy

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou dalšími významnými enzymy, které se účastní oxidačních reakcí xenobiotik. Substráty těchto enzymů nejčastěji obsahují heteroatomy (hlavně N, S a P). Jedná se o membránové proteiny lokalizované na hladkém endoplazmatickém retikulu. Nejvíce jsou exprimovány v játrech, nicméně, vyskytují se i v dalších tkáních. Jako kofaktor pak využívají NADPH. Rodina FMO není ve srovnání s rodinou CYP natolik rozsáhlá (u člověka pouze 5 isoform) (Skálová et Boušová, 2011).

Další oxidasy podílející se na biotransformaci xenobiotik

Mezi další oxidasy s poměrně velkým významem lze zařadit peroxidasy, které patří k nejvýznamnějším intracelulárním enzymovým antioxidantům. Účastní se však i metabolismu xenobiotik. Ze zástupců peroxidas lze jmenovat: glutathionperoxidasy nebo myeloperoxidasy.

Oxidaseovou aktivitu vykazují ve vztahu ke xenobiotikům také alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, aldehydoxidas, xantinoxidas, monoaminoxidas a diaminoxidas. Mnohé z těchto enzymů jsou důležité v metabolismu xenobiotik (Skálová et Boušová, 2011).

Oxidace xenobiotik u parazitů

Současné informace o účasti oxidas na biotransformaci xenobiotik u helmintů jsou nedostatečné a nejasné. Čeká se na detailnější informace, které mohou přinést rozrůstající se proteomické studie (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/helminths/>). Asi nejvíce prostudovaným z tohoto pohledu je nepatogenní hlístice *Caenorhabditis elegans*, v jejímž genomu bylo nalezeno pět genů pro FMO a dále 80 genů kódujících CYP. Protože se však jedná o modelovou hlístici, která nežije parazitickým způsobem života, nelze jednoznačně význam těchto zjištění posoudit. U parazitů se setkáváme také s výrazným zastoupením peroxidas, u kterých je známo, že mohou u savců katalyzovat oxidaci xenobiotik. Role peroxidas u helmintů ve

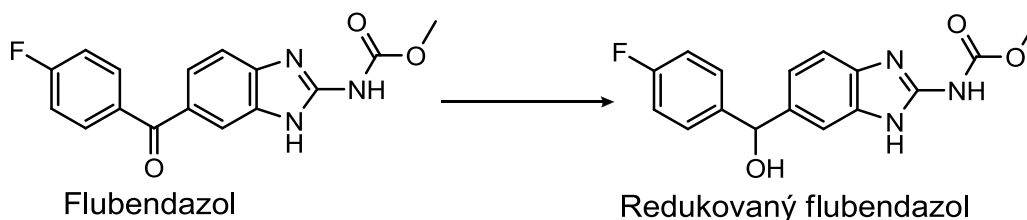
Reduktázy xenobiotik

Redukce některých aldehydů na primární alkoholy a ketonů na sekundární alkoholy je katalyzována alkoholdehydrogenasou a enzymy redukujícími karbonylovou skupinu. Enzymy redukující karbonylovou skupinu jsou monomerní NADPH-dependentní enzymy přítomné u savců v krvi a cytosolických frakcích jater, ledvin, mozku a jiných tkání. (Casarett et al., 2001) Tyto enzymy můžeme rozdělit do tří velkých nadrodin a to do nadrodiny aldo-ketoreduktas (AKR), dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenas/reduktas se středně dlouhým řetězcem (MDR) (Skálová et Boušová, 2011).

AKR jsou nadrodinou cytosolických oxidoreduktas. Vyskytují se ve většině živých organismů, jsou tkáňově specifické a využívají NADPH jako kofaktor při redukci aldehydů a ketonů na primární a sekundární alkoholy. Obecným rysem AKR je jejich nízká substrátová specifita a schopnost přeměňovat jak látky endogenní (sacharidy, ketosteroidy), tak xenobiotika (Cvilink et al., 2008b).

SDR je nadrodinou nejrozsáhlejší. Enzymy této nadrodiny byly zjištěny u všech forem živých organismů, od primitivních buněk až po vyšší organismy. Jedná se o NAD(P)(H) dependentní oxidoreduktázy dosti odlišné od rodin AKR a MDR. U SDR se můžeme setkat jak se substráty endogenními, tak také xenobiotiky (metyrapon, doxorubicin, o-chinony)

MDR je nadrodina zahrnující klasické jaterní alkoholdehydrogenasy, chinon reduktasy, leukotrien B4 dehydrogenázy a mnoho dalších forem. Substráty těchto reduktas jsou jak fyziologické (steroidy, prostaglandin, monosacharidy), tak i xenobiotika (alifatické a aromatické aldehydy a ketony (Skálová et Boušová, 2011).



Obr. 3: Příklad redukce karbonylu u léčiva FLU (Cvilink et al., 2008b).

Redukce xenobiotik u helmintů

Reduktasy a hydrolasy jsou považovány za důležité biotransformační enzymy u helmintů po mnoho let. Redukce představuje hlavní metabolickou cestu u sloučenin nesoucích karbonylovou skupinu. U *H. contortus* byla studována schopnost přeměnit FLU na jeho redukovanou formu (viz obrázek 3.). Toto zjištění můžeme považovat za snahu parazita o deaktivaci účinku dané látky. Redukce modelových sloučenin však byla zaznamenána také u dalších parazitů, jako jsou tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*) a tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) (Cvilink et al., 2009b).

2.3 Fáze II

Reakce fáze II metabolismu xenobiotika nazýváme konjugační. Tato kapitola je zaměřena detailněji na ty reakce, které bezprostředně souvisí s problematikou biotransformace léčiv u parazitů a tématem a cíli této práce.

2.3.1 Konjugace s glukózou

Konjugace s glukózou byla popsána u *H. contortus* a to pro FLU i ABZ (Cvilink et al., 2008). V tomto případě se biotransformační reakce účastní mikrosomální enzym UDP-glucosyltransferasa (UGlcT). Jedná se o reakci v živočišné říši poněkud nestandardní, protože s UGlcT v metabolismu léčiv se setkáváme spíše v říši rostlinné (Von Rad et al., 2001).

U *H. contortus* byla popsána tvorba O-glukózového konjugátu u redukovaného FLU, který je tvořen přednostně před N-glukózovými konjugáty neredukované molekuly. U léčiva ABZ pak byla pouze popsána glukosidace na parentní molekule. Pravděpodobně se opět jednalo o N-glukózové konjugáty (Cvilink et al., 2008b). Ve všech případech lze produkty glukosidace považovat za produkty bez anthelmintické aktivity.

2.3.2 Konjugace s metylem

Metylace je běžnou reakcí u eobiotických substrátů, avšak u xenobiotik je méně častou. Metylová skupina může být navázána přes kyslík, dusík nebo síru. O-metylace podléhají fenolické látky, S-metylace thioly a N-metylace dusíkaté heterocyklické sloučeniny. Donorem metylu je S-adenosylmethionin. Metylace katalyzují různé metyltransferasy, jejichž názvy vycházejí z preferovaného substrátu jako např. u katechol-O-methyltransferasy (Skálová et Boušová, 2011). Metylace je jedna z mála reakcí, které nesnižují lipofilitu xenobiotika (Cvilink et al., 2009a).

2.4 Transport (import/export)

Přenašeče nebo také transportéry můžeme charakterizovat jako proteiny lokalizované v membráně, které přenášejí látky přes lipidovou dvojvrstvu buněk. Velké množství transportních proteinů se účastní transportu eobiotik, avšak existují také transportéry, které transportují převážně xenobiotika. Řada transportérů pro eobiotika je také schopna transportovat některá xenobiotika, zvláště pak, jsou-li strukturně podobná eobiotikům. Podle směru transmembránového přenosu jsou transportéry děleny na tzv. uptake (importující) a efflux (vypuzující či exportující) transportéry. (Skálová et Boušová, 2011) Effluxní transportéry navíc mají velký význam ve vzniku lékové rezistence. ATP-binding cassette (ABC) transportéry jsou hlavní rodinou exportních transportérů, z nich nejznámějším zástupcem je P-glykoprotein (Cvilink et al., 2009b).

2.4.1 P-glykoprotein

Prvním objeveným a patrně také nejznámějším transportérem schopným přenášet xenobiotika je P-glykoprotein. Patří do rodiny ABC transportérů a je označován jako ABCB1. Je považován za součást detoxikačního systému s primární úlohou eliminace lipofilních látek z těla. Je také prokázáno, že P-glykoprotein může sloužit i jako transportér pro některá eobiotika. Z xenobiotik bylo identifikováno již několik stovek substrátů (Skálová et Boušová, 2011). V metabolismu xenobiotik jsou ABC transportéry obecně schopné zprostředkovat efflux jak lipofilních xenobiotik, tak jejich hydrofilních metabolitů a konjugátů tvořených ve fázi I a II (Cvilink et al., 2009b).

Transport xenobiotik u helmintů (import/export)

U helmintů byl z transportérů v minulosti studován hlavně P-glykoprotein. ABC transportéry byly nalezeny v mnoha druzích helmintů. Za zmínku stojí např. motolice *S. mansoni* a *F. hepatica* nebo oblí červi *H. contortus* a *Onchocerca spp.* U *H. contortus* pak byla lokalizována přítomnost P-glykoproteinu pomocí monoklonálních protilátek podél trávicího traktu. Některé studie dále zmiňují přítomnost jiného z rodiny ABC transportérů, takzvaného „breast cancer resistant protein“ (BCRP), nicméně informace o tomto transportéru u bezobratlých jsou velice limitované (Bártíková et. al., 2011).

Transport léčiva do těla helminta ve většině případů závisí na lipofilitě léčiva. V effluxu léčiva ven z těla je pak předpokládáno zapojení ABC transportérů (Cvilink et al., 2009b). Informace o přispění aktivního transportu při detoxikaci těla helmintů doposud nejsou známé.

3 Hmotnostní spektrometrie ve studiu biotransformace léčiv

Při výzkumu metabolismu léčiv, zvláště v tom raném, se uplatňují jednoduché *in vitro* systémy, jako jsou subcelulární frakce z jater, případně daného studovaného organismu, hepatocyty, buněčné kultury nebo perfundované orgány. V dalším kroku ve výzkumu metabolismu a metabolických drah se uplatňují laboratorní zvířata. Je nutné dbát na to, aby se daný druh metabolicky co nejvíce podobal druhu cílovému (Prakash et al., 2007).

Kořeny studia metabolismu léčiv sahají do doby před 200 lety, kdy byly izolovány první metabolity z moči zvířat a lidí. Jako o disciplíně pak můžeme hovořit o metabolismu léčiv v souvislosti s publikací nazvanou *Detoxification Mechanisms: The Metabolism of Drugs and Allied Organic Compounds* od autora R.T. Williamse z roku 1947, která shrnovala do tehdejší doby známé informace o metabolismu léčiv a organických sloučenin. Během let pak potřeba detekce a identifikace metabolismu léčiv dramaticky narůstala. Důsledkem této potřeby je dnes využívání hmotnostní spektrometrie téměř v každém aspektu studia metabolismu léčiv (Rossi a Sinz, 2002).

V minulosti byla pro kvantifikaci a identifikaci sledovaných komponent ve složitých směsích vzorků široce užívána plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Avšak, z důvodu složitého procesu derivatizace analytu před GC/MS analýzou, dále z důvodu vyšší rychlosti, lepšího rozlišení, vyšší senzitivity a specifity kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS) je tato upřednostňována pro rychlou identifikaci metabolitů. Nejčastěji užívané tandemové hmotnostní spektrometry zahrnují typy jako trojitý kvadrupól, trojdimenzionální iontovou past a kvadrupól následovaný analyzátozem doby letu. Existují však i jiné méně užívané typy hmotnostních spektrometrů.

Některé typy přístrojů, jako jsou např. iontové pasti, analyzátozem doby letu, analyzátozem se schopností fourierovy transformace, mají další možnosti, které mohou usnadnit identifikaci studované látky, metabolitu (Prakash et al., 2007).

3.1 Ionizační techniky

Kapalinová chromatografie je většinou kombinována s technikami ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization – API), které umožňují spojení s hmotnostním spektrometrem. Nejčastějšími API technikami, se kterými se můžeme při studiu metabolitů setkat, jsou ionizace elektrosprejem (electrospray ionization – ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization – APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization – APPI) (Ma et al., 2006). Je však nutné říci, že neexistuje univerzální ionizační technika vhodná pro všechna léčiva a jejich metabolity a je vždy potřeba zvážit na základě vlastností látky, kterou techniku použít. Další ionizační techniky, které však zatím ve studiu metabolismu léčiv nejsou tak výrazné zahrnují techniky Matrix-assisted laser/desorption ionization (MALDI) a desorpce ESI (DESI) (Holčapek et al., 2008).

ESI

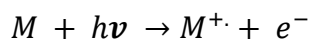
ESI je metoda, díky které látky rozpuštěné v roztoku mohou být převedeny do plynné fáze jako ionty. Sprejování je výsledkem nabíjení roztoku ve špičce kapiláry pomocí vložení vysokého potenciálu mezi kapiláru a blízkou elektrodu. Základní kroky, vedoucí k formování iontů, které následně vstupují do hmotnostního spektrometru, jsou: 1. tvorba nabitých kapiček na konci kapiláry elektrospreje, na kterou je vložen vysoký potenciál, 2. redukce velikosti nabitých kapiček odpařením mobilní fáze, která vede k rozpadu kapiček (Coulombické exploze) a tvorbě velmi malých, vysoce nabitých kapiček schopných uvolňovat ionty do plynné fáze, 3. produkce iontů v plynné fázi. Všechny tyto kroky se dějí za atmosférického tlaku. Základem všeho je tedy tvorba nabitých kapiček. Ve spektru pak nejčastěji pozorujeme ionty typu $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ a to v závislosti na tom, zda měříme v pozitivním, nebo negativním modu. Jsou však možné a časté i jiné typy iontů jako např. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ a další (Niessen, 2006; Cole et al., 2010). Sloučeniny, které lze touto technikou studovat, zahrnují iontové sloučeniny, neutrální nebo polární sloučeniny, které mohou být protonovatelné nebo deprotonovatelné a také nepolární sloučeniny, které podstupují oxidaci nebo redukci na špičce kapiláry elektrospreje (Ardrey, 2003).

APCI

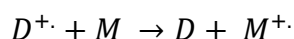
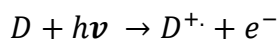
APCI je založena na rozpouštědlem zprostředkované chemické ionizaci prostřednictvím iont-molekulové reakce v iontovém zdroji, iniciované elektrony produkovanými na jehlové výbojové elektrodě. Elektrony z této elektrody spouštějí sekvenci reakcí, které nakonec vede k tvorbě nabitých iontů typu $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ ale i iontů typu aduktů se složkami rozpouštědla. Jedná se o doplňkovou techniku k ESI, která umožňuje i ionizaci nepolárních nebo slabě polárních látek (Ardrey, 2003; Niessen, 2006).

APPI

APPI je nejmladší technikou ze tří zmiňovaných ionizačních technik za atmosférického tlaku. Je to technika využitelná pro málo polární nebo nepolární sloučeniny. Stavbou zdroje se podobá APCI, avšak jehlová elektroda je zde nahrazena lampou emitující fotony. (Hayen et Karst, 2003) Základním principem této techniky je tvorba molekulárního iontu (M^+) díky absorpci fotonu a uvolnění elektronu.



Tento přímý přístup však není dostatečně účinný. Z tohoto důvodu je do mobilní fáze nebo rozprašovacího plynu přidávána látka tímto způsobem snadno ionizovatelná – dopant (D) která zvyšuje odezvu. Nejčastěji se užívá toluen nebo anisol.



Druhá reakce nastává pouze v případě, kdy je elektronová afinita analytu vyšší a/nebo pokud je ionizační potenciál analytu nižší než u dopantu. V závislosti na použité mobilní fázi pak může docházet i k tvorbě protonovaných analytů typu $[M+H]^+$ namísto tvorby radikálu (Niessen, 2006).

3.2 Hmotnostní analyzátory

Funkcí hmotnostního analyzátoru je separovat ionty vzniklé v iontovém zdroji podle jejich rozdílného poměru hmota/náboj (m/z). Kvalita hmotnostní separace je charakterizována stupněm, jak blízké m/z hodnoty mohou být v hmotnostním analyzátoru rozlišeny. Hovoříme o rozlišení hmotnostního analyzátoru (R), které je definováno jako $R_{FWHM} = m/z / \Delta m/z$, kde m/z je hmota / náboj cílového peaku a $\Delta m/z$ je plná šířka v polovině maxima tohoto peaku. Podle rozlišení jsou pak hmotnostní analyzátory rozdělovány do skupin s nízkým (kvadrupóly a iontové pasti) a vysokým (analyzátor doby letu, analyzátory s Fourierovou transformací) rozlišením (Holčapek et al., 2008). Hmotnostní analyzátor je užíván často jako základ pro rozlišení různých typů hmotnostních spektrometrů (Ramanathan, 2009). V dnešní době rozeznáváme celou řadu hmotnostních analyzátorů, které se liší principem funkce, vlastnostmi a také vhodností k různým typům analýz a experimentů. Zde je uváděn pouze krátký přehled v současnosti nejběžnějších hmotnostních analyzátorů.

Co se vhodnosti týká, iontové pasti jsou nejčastěji užívány pro studium fragmentačních cest, trojitě kvadrupóly jsou velmi vhodné pro kvantifikace. Naproti tomu analyzátory s vysokým rozlišením jako jsou TOF nebo analyzátory s Fourierovou transformací jsou lépe využitelné pro určení elementárního složení sloučenin (Holčapek et al., 2008).

Kvadrupólový hmotnostní filtr

Jedná se o nejrozšířenější hmotnostní analyzátor v LC/MS. Tento typ hmotnostního analyzátoru (quadrupole mass filter – QMF) je složen ze 4 paralelně vedoucích tyčí. Vždy na dvou protilehlých tyčích je vloženo stejnosměrné kladné nebo záporné napětí. Na tyčích je pak superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí.

Při dané kombinaci stejnosměrného napětí a střídavého napětí na tyčích jsou trajektorie iontů o zvolené m/z stabilní. Takovéto ionty následně projdou na detektor hmotnostního spektrometru. Ionty s nestabilními trajektoriemi neprojdou tímto filtrem, vybijí se na tyčích kvadrupólu a jsou odsáty vakuovým systémem. Na detektor se nedostanou.

Rozlišení tohoto analyzátoru závisí na poměrech mezi stejnosměrným a střídavým napětím a dále také na kvalitě a postavení tyčí. Všeobecně se dá říci, že QMF pracuje s jednotkovým rozlišením hmoty. Novější analyzátory tohoto typu jsou schopny poskytnout rozlišení v řádu desetin jednotek bez zhoršení odezvy analyzátoru (Niessen, 2006).

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Při studiu struktury látek však pouhá informace o hmotě daného iontu nestačí a někdy je nutné získat také další informace. Pokud zvýšíme vnitřní energii iontu se sudým počtem elektronů, můžeme dosáhnout vyvolání fragmentace. To může být vyvoláno kolizní aktivací skrze kolize vybraného iontu s molekulami neutrálního plynu. Hovoříme o tzv. kolizně indukované disociaci (z angl. Collision-induced dissociation – CID).

Tohoto jevu využívají instrumenty s trojitým kvadrupólem, kde první a třetí kvadrupól slouží jako analyzátor hmoty v klasickém režimu QMF. V prostředním, naplněném inertním plynem, dochází ke kolizím a slouží tak pouze jako kolizní cela. Na prvním kvadrupólu dochází k vybrání prekurzorového iontu, ten je následně zaveden do kolizní cely a fragmentován na produktové ionty. Tyto ionty jsou následně analyzovány. Třetí kvadrupól slouží opět k selekci rozsahu měření nebo výběru produktových iontů. O tomto přístupu můžeme hovořit jako o tandemové hmotnostní spektrometrii, zkráceně MS/MS (Niessen, 2006).

Trojité kvadrupóly nejsou jedinými instrumenty, které jsou schopné MS/MS analýz. Dalšími instrumenty jsou iontové pasti, iontové cyklotronické rezonance s Fourierovou transformací, magnetické sektory, a další hybridní typy. U těchto zmíněných instrumentů však může docházet k vyvolání CID odlišným mechanismem.

Iontová past

Pod pojmem iontová past můžeme rozumět dva typy analyzátorů hmoty. Prvním z nich je trojdimenzionální iontová past, druhým pak lineární iontová past (někdy také označovaná jako dvojdimenzionální).

Trojdimenzionální iontová past je tvořena jednou kruhovou elektrodou a dvěma elektrodami uzavírajícími z obou stran elektrodu kruhovou. Tyto koncové elektrody mají uprostřed otvory jedna pro vstup iontů z iontového zdroje a druhá pro výstup iontů na detektor. Tento analyzátor funguje v pulzním modu. Výhodou tohoto analyzátoru je možnost tvořit experimenty typu MS/MS, případně MSⁿ (Niessen, 2006).

Lineární iontová past je na rozdíl od předchozí složena ze čtyř souběžných tyčí podobně, jako tomu je u kvadrupólového analyzátoru. I u tohoto analyzátoru je možné provádět experimenty MSⁿ (Niessen, 2006).

Jak lineární tak trojdimenzionální past představuje analyzátory s nízkým rozlišením, avšak výhodou je právě jejich schopnost MSⁿ scanů, které jsou vhodné pro studium fragmentačních cest (Holčapek et al., 2008).

Analyzátor doby letu (Time-of-Flight – TOF)

Tento analyzátor je koncepčně nejjednodušší ze všech zde zmíněných typů analyzátorů. Ionty jsou do tohoto analyzátoru vpouštěny ze zdrojové oblasti v pulzech a urychleny elektrickým polem k průletu TOF trubici. Ionty s nízkým poměrem m/z cestují vyšší rychlostí a dolétnou na detektor rychleji, zatímco ionty s vysokou m/z pomaleji. Existují také hybridní instrumenty kombinující QMF a TOF analyzátory (Niessen, 2006).

TOF je zástupcem analyzátoru hmoty s vysokým rozlišením. U takovýchto typů analyzátorů je důležitým parametrem správnost určení hmoty (v orig. Mass Accuracy). Tento parametr je definován jako $MA = 10^6 \times (m/z_{\text{exp}} - m/z_{\text{teor}}) / m/z_{\text{teor}}$, kdy m/z_{exp} je experimentálně změřené m/z a m/z_{teor} je teoreticky vypočítaná hodnota. S externí kalibrací by měla správnost určení hmoty být pod 5 ppm (parts per million). To umožňuje určit, nebo alespoň usnadnit určení elementárního složení studované molekuly (Holčapek et al., 2008).

Hmotnostní spektrometr s Fourierovou transformací

Hmotnostní spektrometry s Fourierovou transformací jsou schopné poskytovat vysoké rozlišení i vysokou správnost určení hmoty. Jedná se však o instrumenty znatelně dražší, než výše zmiňované. Zástupci této techniky jsou iontová cyklotronická rezonance a orbitální past (Holčapek et al., 2008).

3.3 Typy skenů

V závislosti na konfiguraci instrumentu jsou tandemové a hybridní hmotnostní spektrometry schopny posloužit mnohem více, než pouze určit hmotu studované molekuly. Následující seznam termínů se vztahuje k různým typům skenů, které mohou přinést informace o studované látce a pomoci s její identifikací (Ramanathan, 2009). Řada z těchto modů je pak u studia metabolismu léčiv plně využitelná.

Snímání celého spektra

Jedná se o proces, při kterém jsou získány informace o hmotách z předem nastaveného rozsahu m/z (Ramanathan, 2009). Například při nastavení rozsahu m/z 50-2000 dostáváme informace o přítomnosti/nepřítomnosti iontů o m/z o velikosti od 50 do 2000.

Monitorování vybraného iontu – (Selected ion monitoring)

Hmotnostní spektrometr v tomto módu sleduje pouze molekuly o předem nastavené m/z (Ramanathan, 2009). Chceme-li například sledovat, zda jsou ve vzorku přítomny ionty léčiva monepantelu (MO), které má m/z v kladném módu 474, nastavíme předem právě tuto hmotu. Ostatní hmoty budou detektorem ignorovány.

Sken prekurzorových iontů

Prekurzorový iont je iont vybraný při první hmotnostní analýze MS/MS procesu. Dříve se užíval také termín rodičovský iont. Sken prekurzorových iontů pak znamená, že hmotnostní detektor hledá na základě nastavené hmoty produktového iontu původní molekulu. Tato technika je zvláště užitečná v případě, kdy známe typické produktové ionty pro určitou skupinu látek nebo metabolitů a hledáme tyto struktury ve složitějších maticích, jakými mohou být např. extrakty tkání, plazmy a další (Ramanathan, 2009).

Sken produktových iontů

Produktový iont je typ iontu vytvořeného fragmentací prekurzorového iontu. Dříve se užíval také termín dceřiný iont. Sken produktových iontů pak znamená určení hmoty všech možných iontů vytvořených z vybraného prekurzorového iontu. Jedná se o klíčový krok při charakterizaci neznámých sloučenin, který může usnadnit určení funkčních skupin nebo struktury (Ramanathan, 2009).

Sken neutrálních ztrát (MS/MS)

Určení kombinace prekurzor/produkt, která se vyznačuje specifickou charakteristickou ztrátou části molekulárního iontu. Obzvláště je tato technika užitečná v případech, kdy charakteristická ztráta je neutrální a nemůže být přímo detekována hmotnostním spektrometrem (Ramanathan, 2009). Příkladem může být sken neutrálních ztrát, kde sledujeme ztráty o hmotnosti 162 u a hledáme páry prekurzor/produkt, které se o tuto hodnotu liší. Ztráta 162 u je typická pro N-glukosidové metabolity benzimidazolových anthelmintik. Takto nastavený stroj by tedy v ideálním případě našel všechny N-glukosidové metabolity. Ztráta 162 u reprezentuje ztrátu anhydroglukózy (Cvilink et al., 2008b).

Monitorování vybrané reakce (MS/MS)

Monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring – SRM) je proces, při kterém je nejprve vybrán prekurzorový iont, který je následně fragmentován v kolizní cele (v případě MS trojitého kvadrupólu). V následující analýze je pak vybrán konkrétní produktový iont. Tato technika se často používá u kvantitativní analýzy dobře charakterizovaných sloučenin, u kterých je známý prekurzor-produktový pár (Ramanathan, 2009).

3.4 Techniky vedoucí k urychlení identifikace metabolitů

Existuje několik technik, které mohou usnadnit identifikaci metabolitu léčiva. Mezi tyto techniky patří značení stabilním izotopem, měření přesné hmoty, záměna vodík/deuterium, využití APCI pro odlišení N-oxidace od hydroxylace, na datech závislé měření a vyhodnocení založené na měření hmotnostního defektu (z anglického

Mass defect) (Ma et al., 2006). Pro tuto práci významnou technikou je technika měření přesné hmoty a hmotnostního defektu, které spolu úzce souvisí.

3.4.1 Měření přesné hmoty

Přesná hmota molekuly je dána sečtením přesných hmot jednotlivých izotopů pro každý základní atom v molekule a liší se od hodnoty nominální (celočíslně vyjádřená hmota). Příkladem může být molekula vody, kde hodnota nominální je 18 Da a hodnota přesné hmoty je 18,0105 Da ($2 \times 1,0078 \text{ H} + 1 \times 15,9949 \text{ O}$). Měření přesné hmoty umožňuje vypočítat elementární složení molekuly, nebo alespoň snížit počet možných variant. Přesná hmota usnadňuje také identifikaci známých sloučenin a jejich případných metabolitů s využitím MS a MS/MS spekter. Je to zásadní technika pro měření hmotnostního defektu (Ramanathan, 2009).

Poprvé bylo této techniky využito na hmotnostním spektrometru typu magnetického sektoru s dvojitou fokusací. V současné době se však více využívají hmotnostní spektrometry s Fourierovou transformací s měřením správnosti hmoty pod 1 ppm. Dále jsou to instrumenty typu orbitálních pastí se správností měření hmoty na 1 ppm a analyzátorů doby letu se správností měření hmoty mezi 5-10 ppm (Ma et al., 2006). Poslední zmíněné jsou v současné době finančně nejdostupnější.

Rozvoj v oblasti instrumentů typu spojení kvadrupól-analyzátor doby letu a spojení těchto instrumentů s technikami ionizace za atmosférického tlaku se projevil v jejich oblíbenosti pro aplikaci technik měření přesné hmoty (Ma et al., 2006).

3.4.2 Měření hmotnostního defektu

Hmotnostní defekt je definován jako rozdíl mezi přesnou atomovou váhou a nominální atomovou váhou prvku. Stupnice atomové hmotnosti definuje uhlík-12 s hmotností přesně 12,0000 Da, tudíž všechny ostatní prvky budou mít unikátně odlišný hmotnostní defekt. Například pro vodík je tato hodnota 0,007825 Da, pro kyslík - 0,005085 Da. Oxidace tedy přináší do molekuly hmotnostní defekt -5,1 mDa (oxidace přináší do molekuly 1 atom kyslíku). Tabulka 2 uvádí údaje o hmotnostním defektu pro základní organické prvky. Hmotnostní defekty většiny metabolitů I a II fáze spadají do

velikosti do 50 mDa (nicméně existují i výjimky). U LC/MS instrumentů schopných měřit správnou hmotu lze tedy odfiltrvat pryč komponenty matrice, které neleží v námi nastaveném rozsahu hmotnostního defektu. Zároveň lze této techniky využít k identifikaci, nebo alespoň přibližné identifikaci metabolitu a metabolického kroku. Tabulka 3 obsahuje příklady hmotnostních defektů pro některé metabolity první i druhé fáze biotransformace (Ma et al., 2006, Holčapek et al., 2008).

Tab. 2: Hmotnostní defekty pro základní organické prvky (Holčapek et al., 2008).

| Prvek | Nominální atomová hmotnost (Da) | Hmotnostní defekt (mDa) |
|-------|---------------------------------|-------------------------|
| H | 1 | +7,825 |
| C | 12 | 0,0 |
| N | 14 | +3,074 |
| O | 16 | -5,085 |

Tab. 3: Příklady hmotnostních defektů pro různé reakce I. a II. fáze biotransformace (Zhang et al., 2009, Holčapek et al., 2008).

| Fáze | Nominální změna hmoty (Da) | Metabolická reakce (změna základního složení atomů) | Změna hmotnostního defektu (mDa) |
|------|----------------------------|--|----------------------------------|
| I | -18 | Dehydratace alkoholu (-H ₂ O) | +10,6 |
| | -14 | Demethylace (-CH ₂) | -15,7 |
| | -2 | Oxidace alkoholu (-H ₂) | -15,7 |
| | +2 | Redukce ketonu / aldehydu (+H ₂) | +15,7 |
| | +16 | Hydroxylace (+O) | -5,1 |
| II | +14 | Methylace (+CH ₂) | +15,7 |
| | +80 | Sulfatace (+SO ₃) | -43,2 |
| | +162 | Glucosidace (+C ₆ H ₁₀ O ₅) | +52,8 |
| | +176 | Glukuronidace (+C ₆ H ₈ O ₆) | +52,8 |

3.5 Příprava a úprava vzorků

I přes všechny možnosti hmotnostní spektrometrie může dobrá příprava vzorku značně usnadnit a zjednodušit detekci metabolitů (Prakash et al., 2007). V některých případech je možné, například v případě žluči nebo moči využít přímého nástřiku, zatímco u jiných typů vzorků (plazma, trus) je nutná prekoncentrace nebo extrakce vedoucí k selektivnímu odebrání interferujících složek. Základem jakékoliv techniky, která zpracovává vzorek, je odstranit lipidy, soli, buněčné komponenty nebo proteiny z *in vivo* a *in vitro* vzorků před samotným zavedením do systému LC/MS. Toto nejen že zaručuje delší životnost kolony a kapilár, ale také zlepšuje selektivitu, citlivost a spolehlivost analýzy (Ma et al., 2006).

Často zmiňovaným důvodem pro úpravu vzorků mohou být, zvláště ve spojení s ESI, také tzv. matricové efekty. Matricí v tomto případě můžeme rozumět soubor všech molekul, krom molekul analytů, vyskytujících se ve vzorku. Matricový efekt nastává v momentě, kdy molekuly koelující se zkoumanými molekulami pozměňují účinnost ionizace ionizační technikou. Poprvé byl popsán v roce 1993 (Tang et Kebarle, 1993). Přesný mechanismus není znám, avšak pravděpodobně má původ v kompetici mezi analytem a koelující komponentou matrice, která není detekována. Důsledkem tohoto jevu je, v závislosti na prostředí, ve kterém dochází k ionizaci, snížení (známé také jako iontová suprese – ion suppression) nebo zvýšení (ion enhancement) účinnosti tvorby požadovaných iontů analytu. Schopnost analytu tvořit ionty je tedy velmi závislá na matrici, která vstupuje do iontového zdroje společně s ním (Taylor et al., 2005). V některých případech pak může být síla matricového efektu natolik výrazná, že dochází k úplnému vymizení signálu sledovaného analytu.

Nejvíce náchylnou technikou k matricovému efektu je patrně ionizační technika ESI. Techniky APCI a APPI se ukazují k tomuto jevu jako méně náchylné (Hsieh et al., 2003; Taylor et al., 2005).

Následující text obsahuje základní přehled metod, se kterými se nejčastěji setkáváme při přípravě kapalných vzorků před analýzou technikami LC/MS. Neklade si za cíl vyjmenovat všechny techniky, ale pouze seznámit čtenáře s tím nejdůležitějším, co by z hlediska studia metabolismu léčiv pomocí LC/MS mělo být zmíněno.

3.5.1 Filtrace / centrifugace

Jednoduchá filtrace může být velmi důležitá pro celou řadu vzorků, které mají být analyzovány pomocí kapalinové chromatografie, kde hrubé nečistoty mohou ucpat kolonu, frity a případně i kapiláry. Účinnost filtrace je dána porozitou filtru. Pro kapalinovou chromatografii obecně by velikost póru měla být 2 μ m a méně. U některých vzorků je pak filtrace i vhodnou metodou před aplikací dalších extrakčních technik. Je však vhodné ověřit, zda se studovaný analyt neváže částečně i na pevnou složku, která je filtrací odstraněna. (Smith, 2003) Určitou možnost zastoupení kroku filtrace poskytuje i technika extrakce na pevných fázích, kde frity i náplň extrakčních kolon poskytují určitý stupeň filtrace (Gilar et al., 2001).

Jako alternativu k filtračním technikám můžeme použít centrifugaci. Tradičně se s touto technikou setkáváme jako návaznou u precipitace proteinů. Tato technika je relativně časově náročná a nevhodná pro automatizaci. Kritickým krokem je zde hlavně sběr supernatantu (Gilar et al., 2001).

3.5.2 Přímý nástřik

Výhodou přímého nástřiku je jednoduchost a efektivnost. Tento postup je vhodný pro matrice, které neobsahují velké množství buněčných komponent a proteinů (Ma et al., 2006). Přímému nástřiku by nicméně měla předcházet centrifugace, která sníží možnost kontaminace analytického systému hrubými nečistotami.

3.5.3 Precipitace proteinů

Přidáním denaturujících organických rozpouštědel (např. methanol, aceton, acetonitril) do vzorku dochází k precipitaci proteinů. Denaturační proces zablokuje možnost interakce proteinu s molekulou analytu. Po přidání organického rozpouštědla musí následovat centrifugace, která zformuje z denaturovaného proteinu peletu na dně zkumavky. Sledované analyty pak zůstávají ve vrstvě supernatantu (Ma et al., 2006). Dalšími možnostmi krom přidání organických rozpouštědel jsou pak techniky přidávání kyselin (trichloroctová kyselina, perchlorová kyselina, sulfosalicylová kyselina), užití

extrémních teplot (90-100°) a precipitace pomocí bazí jako je hydroxid zinečnatý. Jedná se však o techniky, které mohou způsobit rozpad labilních metabolitů a léčiv (Pawliszyn et Lord, 2011). Tuto metodu lze považovat za levnou, rychlou a jednoduchou.

3.5.4 Extrakce kapalina-kapalina

Tato technika je založena na principu rozdílné rozpustnosti a rozdělovací rovnováhy molekul analytů mezi nemísitelnou vodnou a organickou fází. Výtěžnost a selektivnost extrakce může ovlivňovat mnoho faktorů. Tyto zahrnují rozpustnost analytu, jeho pKa, pH roztoku a jeho iontovou sílu. Extrakce kapalina-kapalina je velmi efektivní pro extrakci nepolárních nebo mírně polárních analytů (Ma et al., 2006). Nevýhodou této techniky je časová náročnost (často nutnost extrakci několikrát opakovat pro získání dobrého výtěžku), nutnost manuálních operací, které mohou vést k chybám, a užívání velkého množství organických rozpouštědel (Smith, 2003). Dalším kritickým bodem je pak odebrání organické fáze, kdy může dojít k nasátí i fáze vodné, což vede ke kontaminaci vzorku množstvím polárních látek z matrice.

3.5.5 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (Solid-phase extraction – SPE) je v dnešní době běžnou a účinnou technikou, která je schopná selektivně odstranit a zakoncentrovat analyty z komplexních biologických vzorků. Všeobecně SPE zahrnuje tyto základní mechanismy: reverzní fáze, normální fáze, iontově výměnné fáze a fáze umožňující kovalentní interakce (Ma et al., 2006). Iontově výměnné fáze pak dále můžeme klasifikovat na kation- a anion-výměnné (Fedeniuk et Shand, 1998). Samotná SPE extrakce se skládá ze 4 jednotlivých kroků: 1. příprava (koncidionace) sorbentu, 2. nanesení vzorku na sorbent, 3. promytí sorbentu a odstranění solí a části komponent matrice, 4. eluce sloučenin ze sorbentu (Ma et al., 2006). Krok 2. a 3. jsou z hlediska techniky esenciální. Při špatně zvoleném typu sorbentu nedojde k zadržení analytu (krok 2.). Při špatně zvoleném postupu promytí pak hrozí i vymytí analytů, které

chceme studovat, případně nedostatečné odstranění solí a matrice, což vede k interferencím při analýze a potlačení signálu.

Vhodně zvolená SPE metoda je však vhodná pro automatizační postup, při kterém se dnes uplatňují 96 pozicové kolony a destičky. Lze tak za relativně krátký čas připravit velké množství vzorků.

3.5.6 Chemická derivatizace

Chemická derivatizace se uplatňuje tam, kde se setkáváme se špatně- nebo ne-ionizovatelnými analyty. Pomocí této techniky se zavádí do molekuly analytu (studované léčivo, metabolit) ionizovatelný dusík. Tato strategie následně vede k zvýšení citlivosti detekce.

Chemickou derivatizaci lze také s úspěchem využít tam, kde dochází k tvorbě velmi malých a velmi polárních metabolitů. Tyto látky je těžké zachytit na reverzních fázích chromatografických kolon, které se běžně využívají při studiu metabolismu látek. Chemická derivatizace tak může snížit polaritu analytu a zlepšit separaci od polárních sloučenin z matrice (Ma et al., 2006). Jedním z činidel užívaných k tomuto typu derivatizace je dansyl chlorid, který v přítomnosti volné amino nebo fenolické hydroxy skupiny na metabolitu s těmito skupinami reaguje. Výsledkem ze zvýšení molekulové hmotnosti a lipofility analytu (Dalvine et O'Donnell, 1998).

3.5.7 Další možnosti úpravy vzorků

Existují i další techniky přípravy a úpravy vzorků. Některé z nich lze nalézt např. v review „Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques“ od autora Rogera M. Smitha (2003), které se mimo jiné dotýká i přípravy vzorků v pevné a plynné fázi, případně v knize „Handbook of sample preparation“ editované Januszem Pavliszynem a Heather L. Lordovou (2010) a v mnoha dalších publikacích.

4 Parazité

Parazitární způsob života je považován za jednu z nejrozšířenějších životních strategií (Volf et Horák, 2007). Parazitický způsob života můžeme nalézt na všech úrovních, tedy u virů, bakterií, jednobuněčných eukaryot až po mnohobuněčné organismy. Celosvětové rozšíření parazitů pak v některých regionech přináší celou řadu problémů. Nákazy parazity jsou velkým problémem přinášejícím i řadu obětí hlavně v rozvojových zemích, kde není dostatečně rozšířena hygiena a hygienické návyky, případně v zemích, kde není možné získat čistou vodu ani k mytí, ani k požívání. Význam parazitů můžeme demonstrovat také pouhým vypsáním počtu článků v některé z vědeckých nebo i nevědeckých databází. Např. v databázi MEDLINE provozované United States National Library of Medicine a National Institutes of Health nalezneme na dotaz parasites více jak 160 tisíc odborných článků.

Eukaryotické parazity obecně můžeme rozdělit na prvoky, červy a členovce (Volf et Horák, 2007). Právě cizopasnými červy se zabývá helmintologie (slova cizopasný červ a helmint považujeme za synonyma) (Petráčková et Kraus, 1995). Helminté jsou poměrně různorodou skupinou parazitů, kde nalezneme zařazeny zástupce sice nepříbuzných, ale z praktického hlediska sdružovaných skupin organismů. Tradičně se mezi helminty řadí zástupci neodermátních platyhelmintů (Trematoda, Cestoda, Monogenea), hlístic (Nematoda) a vrtejšů (Acanthocephala) (Volf et Horák, 2007). Protože se tato práce nezabývá metabolismem všech helmintů obecně, ale pouze vybraných zástupců ze skupin trematoda, cestoda a nematoda, bude následující text podrobněji věnován pouze jim.

4.1 Tasemnice

V této práci se primárně setkáváme s modelovou tasemnicí potkaní (*Hymenolepis diminuta*), nicméně v rámci studia metabolismu léčiv u helmintů není tasemnicí jedinou. V literatuře zabývající se problematikou metabolismu léčiv u tasemnic se setkáváme velmi často i s hospodářsky významnějšími tasemnicemi rodu *Moniezia* (např.: Solana et al., 2001; Moreno et al., 2004; Mottier et al., 2006).

Tasemnice potkaní – *Hymenolepis diminuta*

Tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) z čeledi Hymenolepididae je kosmopolitně rozšířená tasemnice. Její cyklus je obligátně dvouhostitelský. Jako mezihostitele využívá hmyz (např. potemník moučný, blechy a další). Jako definitivní hostitel slouží hlodavci (krysy, potkani), ale i člověk, avšak u člověka jsou příznaky zřídka zřejmé (Bogitsh et al., 2005). Tato tasemnice je častým experimentálním modelem díky snadnému chovu mezihostitelů (potemnicí rodu *Tribolium* nebo *Tenebrio*) a definitivních hostitelů (potkan) (Horák et al., 2007). Další výhodou může být také relativní časová nenáročnost chovu. Prepatentní doba se pohybuje mezi 13-21 dny (Arai, 1980).

Tasemnice rodu *Moniezia*

Dalšími tasemnicemi, které se objevují v literatuře v souvislosti s metabolismem anthelmintik, jsou tasemnice rodu *Moniezia* z čeledi Anoplocephalidae, které jsou celosvětově rozšířené a jsou již (v porovnání s *H. diminuta*) významnými parazity domácích přežvýkavců. Z tohoto rodu jsou pak nejvýznamnějšími zástupci *M. benedeni* infikující hlavně skot a *M. expanza* infikující hlavně ovce. Jako mezihostitele využívají celou škálu drobných půdních roztočů (Denegri et al., 1998).

4.2 Motolice

Pro tuto práci je významnou motolicí motolice kopinatá (*D. dendriticum*) s relativně složitým životním cyklem v porovnání s jinými zástupci této třídy. Další motolicí je pak motolice jaterní (*F. hepatica*), případně motolice obrovská (*Fascioloides magna*). U těchto motolic jsou dnes již alespoň částečně dostupné informace o metabolismu anthelmintik ze skupiny benzimidazolů, případně dalších.

Motolice kopinatá - *Dicrocoelium dendriticum*

Jedná se o malou motolici způsobující onemocnění zvané dikrocelióza. Toto onemocnění je široce rozšířeno u pasoucích se přežvýkavců. Nejčastěji je zmiňován výskyt v Evropě, Asii, Severní Africe a Severní Americe na nížinných a horských pastvinách, kde se vyskytují adekvátní podmínky pro rozvoj pozemních plžů a mravenců, kteří jsou pro tuto motolici mezihostiteli. Parazit žije ve žlučovodech a

žlučníku domestikovaných i divokých přežvýkavců (ovce, kozy, skot, buvoli, srnci, velbloudi i další). Občas se může vyskytnout i u králíků, prasat, psů, koní, a protože se jedná o zoonózu, tak také u člověka. U člověka je však nákaza velmi sporadická (Yilmaz et al., 2010). Nákaza motolicí kopinatou má u postižených zvířat relativně mírné příznaky, avšak může vést k ekonomickým ztrátám na produkci mléka nebo masa. Důvodem je poškození funkce jater. Pouze ve vzácných případech je toto onemocnění fatální (Otranto a Traversa, 2002).

Motolice jaterní – *Fasciola hepatica*

Jedná se o motolici napadající převážně domestikované ovce, kozy a skot. Jako mezihosteje využívá vodní plže z čeledi Lymnaeidae. Příležitostně je také možné se s ní setkat u divokých kopytníků. Její význam u divoce žijících druhů je však malý. Z hlediska výskytu můžeme mluvit o kosmopolitním druhu s významným hospodářským dopadem. Dospělé motolice nalezneme ve žlučovodech, kde způsobují jejich rozšíření a kalcifikaci (Samuel et al., 2001).

Nákaza u člověka je také možná. Uvádí se cca 2,4 miliónů případů zaznamenaných v 61 zemích světa s tím, že dalších 180 miliónů lidí je v potenciálním riziku (Muller et Wakelin, 2002). U lidí mohou být silně poškozena játra a žlučovody. Motolice může vyvolat také zánětlivé reakce. Juvenilní formy pak mohou encystovat i na neobvyklých místech a později mohou být kalcifikovány (Bogitsh et al., 2005). Příznaky onemocnění se liší dle fáze, ve které se nákaza nachází. Akutní fáze je charakterizována dyspepsií, nevolností a zvracením, abdominální bolestí a vysokými horečkami. Dále je možné pozorovat leukocytózu a eozinofilii. V chronické fázi pak můžeme pozorovat zvětšující se játra až cirhózu. Může se vyvinout obstrukční žloutenka. Úmrtí jsou vzácná (Muller et Wakelin, 2002).

Motolice obrovská – *Fascioloides magna*

Jedná se původem o druh vyskytující se primárně v Severní Americe u divoce žijících a domácích přežvýkavců. V 19. století pak byl zavlečen do Evropy společně s jelenem běloocasým a jelenem wapiti (Slavica et al., 2006). Je příkladem parazita, který je silně patogenní pro populace hostitelů, kteří na něj nejsou dostatečně adaptováni. V současnosti může být velkým problémem např. v chovech daňčí zvěře,

kde již jedna motolice dokáže způsobit vážné poškození jater. Napadená zvířata nerostou, hubnou a při silnějších infekcích hynou (Volf et Horák., 2007).

4.3 Hlístice

Hlístice tvoří velkou skupinu živočichů, z nichž ne všechny žijí parazitickým způsobem života. Pro tuto práci je významné zmínit vlasovku slézovou (*H. contortus*), která je významným patogenem přežvýkavců a jejíž nákaza často vede k ekonomickým ztrátám v chovu.

Vlasovka slézová – *Haemonchus contortus*

Vlasovky jsou parazité žijící ve slézu přežvýkavců. Jedná se o parazita vyskytujícího se široce u přežvýkavců po celém světě snad krom subarktických a arktických regionů. Jsou to typičtí parazité domácích přežvýkavců, jako jsou ovce a skot, nicméně některé druhy vlasovek mohou napadat i volně žijící druhy turovitých nebo jelenovitých. Tito parazité mají přímý vývojový cyklus, tedy bez meziphostitele. Dospělci se nacházejí ve slézu, kde sají napadenému hostiteli krev (Samuel et al., 2001).

Jako nejvýznamnější projevy hemonchózy můžeme pozorovat anémii a hypoproteinémii. Dále můžeme pozorovat u nakažených zvířat ztrátu váhy a celkovou slabost. Ve vážných případech, kdy je infekce vlasovkami masivní, dochází i k úhynu daného jedince (Jones et al., 1997).

5 Léčba onemocnění způsobených helminty

V této kapitole jsou uvedena pouze vybraná léčiva, nebo skupiny léčiv, které se vztahují k souboru publikací přiložených v této práci. Stejně tak strategie léčby v jednotlivých kapitolách léčba cestodóz, léčba trematodóz, léčba nematodóz je zaměřena pouze na parazity zmíněné v předchozí části této práce.

5.1 Léčiva

Benzimidazoly

Benzimidazolová anthelmintika jsou široce užívanými léčivy jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Jedná se o látky, v jejichž základní struktuře se nachází planární struktura benzimidazolu. Odtud také název celé skupiny. Výhodou těchto látek je široké spektrum působení proti celé řadě parazitárních onemocnění. U některých zástupců této skupiny lze pozorovat dobrou účinnost proti tasemnicím, motolicím i oblým červům (McKellar et Scott, 1990).

Mechanismus účinku těchto látek spočívá hlavně ve vazbě na β -tubulin s následnou bloádou polymerizace tubulinu, po němž dochází k rozkladu vnitřního uspořádání buněk parazita. Benzimidazoly se konkrétně váží na kladný konec β -tubulinového vlákna. Nízká toxicita pro hostitelský druh je způsobena 1000x vyšší afinitou k tubulinu parazitů, než k tubulinu savců.

Ze zástupců benzimidazolů, které se nejčastěji používají, můžeme zmínit albendazol, mebendazol, flubendazol, triklabendazol, fenbendazol, thiabendazol a další (Martin, 1997).

Prazikvantel

Prazikvantel (PZQ) je zástupcem léčiv ze skupiny pyrazinoisochinolinů a je užíván jak v humánní, tak ve veterinární medicíně jako léčivo volby proti mnoha parazitárním onemocněním způsobeným tasemnicemi a motolicemi. Je to také léčivo první volby v terapii lidské schistosomiázy způsobené parazity z rodu *Schistosoma*, kde je účinné běžně již v jedné dávce (Cioli et Pica-Mattoccia, 2003). Toto léčivo nemá

žádnou aktivitu proti oblým červům (Jeziorski et Greenberg, 2006; Angelucci et al., 2007).

Není znám přesný mechanismus, jakým PZQ v těle parazita účinkuje. Teorie se nejčastěji zmiňují o rapidním influxu kalciových iontů způsobeném různými mechanismy, což vyvolá celkovou a rychlou paralýzu parazita (Angelucci et al., 2007; Doenhoff et al., 2008).

Ivermektin

Jedná se o širokospektré anthelmintikum a antiparazitikum ze skupiny avermektinů užívané k terapiím nematodóz jak u člověka, tak u zvířat. Ve skupině spolu s ivermektinem nalezneme i další zástupce jako abamektin, doramektin, moxidektin a jiné. Mechanismem účinku je v tomto případě schopnost paralyzovat parazita zvýšením permeability pro chloridové ionty v jeho svalových a nervových buňkách. Konkrétně se jedná o působení na glutamátém řízené chloridové kanály, kde avermektiny v nízkých koncentracích potencují efekt glutamátu a ve vysokých působí na tyto kanály přímo. Savci nejsou běžně těmito léčivy poškozeni, protože nemají glutamátém řízené chloridové kanály (Martin, 1997). Ivermektin není účinný proti zástupcům tasemnic a motolic (Papich, 2011).

5.2 Léčba cestodóz

Tasemnice potkaní (*H. diminuta*)

U lidí se léčí nákaza tasemnicí potkaní pomocí prazikvantelu v dávce 25 mg/kg, nebo niklosamidem (2g v jedné dávce nebo 1g po dobu 5-7 dnů) (Mehlhorn, 2001). U nakažených zvířat by měl být účinnou volbou prazikvantel, případně léčiva typu bithionol, niklosamid, dichlorofen, paromomycin a další (Esatgil et al., 2009).

Tasemnice rodu *Moniezia*

Jako účinné se jeví léčivo albendazol (10mg/kg), které by mělo být 100% účinné (Arai, 1980). Z dalších léčiv jsou pak účinné oxfendazol, niklosamid, mebendazol (20mg/kg), fenbendazol (15mg/kg), dichlorofen a resorantel (Adams, 2001; Mehlhorn, 2001).

5.3 Léčba trematodóz

Motolice kopinatá (*D. dendriticum*)

K léčbě se užívají u zvířat nejčastěji látky ze skupiny benzimidazolů (albendazol, triklabendazol, fenbendazol, mebendazol, kambendazol či thiabendazol). Užívané dávky jsou však vyšší než je tomu při terapii proti tasemnicím, plicním a gastrointestinálním nematodům a také ostatním motolicím jako např. motolici jaterní. Např. u albendazolu se pohybují od 7,5 mg/kg do 30 mg/kg (Manga-Gonzalez et al., 2010). Z dalších léčiv jsou pak zmiňovány thiofanát, luxabendazol a netobimin. U této motolice se díky znalosti rozmnožovacího cyklu uplatňují i nefarmakologické způsoby prevence. Jedná se především o omezení pastvy ráno a v podvečer, kdy jsou nakaženi mravenci nejčastěji k nalezení na stéblech trávy (Otranto a Traversa, 2002).

U člověka se dikrocelióza léčí nejčastěji triklabendazolem (10 mg/kg) nebo prazikvantelem (3 x 600 mg/na den po dobu 3 dnů). (Rack et al., 2004; Yilmaz et al., 2010)

Motolice jaterní (*F. hepatica*)

U zvířat se můžeme setkat s léčbou pomocí rafoxanidu v dávce 5-15 mg/kg (Samuel et al., 2001), albendazolu (Adams, 2001) nebo triklabendazolu v dávce 10 mg/kg (Devine et al., 2011). Prazikvantel je popisován v terapii jako ne zcela účinný (Horák et al., 2007). Z dalších léčiv lze pak jmenovat zástupce halogenovaných fenolů (bithionol, niklofolan), sulfonamidů (klorsulon) a další salicilanilidy (krom již zmíněného rafoxanidu také oxyklozanid, klozantel) (Dalton et al., 1999).

U lidí: I když je prazikvantel účinný proti celé řadě trematodóz, v léčbě fascioloidózy je neúčinný. Účinný se zdá triklabendazol v dávce 10 mg/kg 1 až dva dny po sobě nebo bithiol 30-50 mg/kg po dobu 10-15 dnů (Muller et Wakelin, 2002; Bogitsh et al., 2005).

Motolice obrovská (*F. magna*)

K léčbě fascioloidózy se užívá několik účinných léčiv. Jsou to především triklabendazol, rafoxanid, albendazol, oxyklosanid, klorsulon (Samuel et al., 2001).

5.4 Léčba nematodóz

Vlasovka slézová (*H. contortus*)

Léčba haemonchózy nejčastěji zahrnuje podávání benzimidazolových nebo avermektinových anthelmintik (Samuel et al., 2001). U ovcí, které jsou v souvislosti s tímto parazitem asi nejvíce zmiňovány, se dnes nejčastěji užívají imidazothiazoly (levamisol - 7.5 mg/kg), benzimidazoly (albendazol - 5 mg/kg, fenbendazol - 5 mg/kg, oxfendazol - 5 mg/kg), avermektiny (ivermektin - 0.2 mg/kg, moxidektin 0.2 mg/kg) a salicylanilidy (klozantel – 10 mg/kg) (Getachev et al., 2007). Bohužel, z důvodu dlouholetého používání se vyskytuje na léčbu pomocí těchto látek v mnoha případech rezistence a to i rezistence na více léčiv z různých skupin současně.

V roce 2008 byla poprvé prezentována nová skupina léčiv, které se souhrnně nazývají dle struktury aminoacetonitrilové deriváty (Kaminsky et al., 2008). Z této skupiny je aktuálně užíváno pouze jediné léčivo – monepantel. U tohoto léčiva byl prokázán významný účinek i na rezistentní kmeny vlasovek (Sager et al., 2008).

Krom léčby klasické lze také pozorovat snahu o vývoj vakcín. Vakcinace pokusnou vakcínou byla schopna snížit produkci vajíček vlasovky o 65-82%. Využívána je často i řízená pastva (Knox et al., 2003).

6 Rezistence

Vývoj léčiv proti parazitárním onemocněním po řadu let stagnoval a na trhu zůstávala stále stejná léčiva po řadu let (Waller 1997). A tak léčiva jako ivermektin, prazikvantel, flubendazol či mebendazol, které jsou na trhu více jak 30 let, jsou používána stále znovu, v lepším případě v obměnách a kombinacích, v horším případě stejná po dlouhou dobu na jednom místě. Tato situace vedla u řady parazitů k rozvoji rezistence.

Rezistence je nejčastěji definována jako geneticky přenášená ztráta citlivosti na dané léčivo tam, kde dříve byla sledovaná populace vůči léčbě citlivá (Köhler, 2001). Rezistence na léčbu antiparazitiky bývá popisována jak ve zvířecích chovech, tak také u lidí. Jedná se o problém, který se vyskytuje celosvětově, avšak nejvíce postihuje ta místa, kde dochází k častému podávání látek s antiparazitárním působením. Všeobecně se v souvislosti s rezistencí hovoří o mechanismech zahrnujících změny v cílových strukturách, v biotransformaci léčiva nebo v transportu (import/export). (Oullette 2001)

Podíváme-li se nejdříve mezi lidskou populaci, je odhadováno, že 1,2 – 2,0 miliardy lidí trpí některým z parazitárních onemocnění. Nejčastěji, opomineme-li protozoa, pak dominují gastrointestinální helminti a krevní motolice. I když v porovnání s malými přežvýkavci není rezistence u parazitů napadajících lidskou populaci zcela zřetelná, již se objevují studie, které rezistenci na léčbu potvrzují (Geerts, 2000).

Rezistence u zvířat bývá nejčastěji popisována ve stádech ovcí a koz, kde také parazité páchají nejvíce škod. Obecně u malých přežvýkavců můžeme mluvit o celosvětovém problému. Zprávy o rezistenci na anthelmintika u gastrointestinálních nematod pocházejí ze Severní Afriky, Austrálie, Nového Zélandu, Malajsie, Španělska, Francie, Dánska, Velké Británie, Brazílie a Spojených Států. Důvodem je do nedávné doby pouze několik skupin léčiv užívaných v léčbě gastrointestinálních nematodóz. První zaznamenané případy rezistencí na anthelmintika byly dokonce již v roce 1957 a 1964. Běžně nacházíme rezistenci na benzimidazoly (např. albendazol, fenbendazol), imidazolthiazoly (např. levamizol) a makrocyclické laktony (např. ivermektin, moxidectin) i další léčiva a to často i na všechny skupiny dohromady. Nevětší

prevalence rezistence u gastrointestinálních nematod malých přežvýkavců bývá u parazita *H. Contortus* (Fleming et al., 2006).

Rezistence u dobytka se ještě před deseti lety nezdála být problémem, i když je objem chovů v porovnání s ovce a kozami větší (Knox et al., 2003). V posledních několika letech však, zdá se, význam rezistence u dobytka narůstá (Gasbarre et al., 2009). Pravděpodobně je to způsobeno šířící se vlnou rezistence, ale také zvyšujícím se počtem případů, kdy jsou parazité na rezistenci testováni. V některých regionech jako např. Nový Zéland se pak pohybuje rezistence až na 90% procentech testovaných farem. Jsou popisovány jak kmeny rezistentní k makrocyclickým laktonům (*Cooperia spp.*, *Haemonchus spp.*) tak kmeny rezistentní na benzimidazolová anthelmintika (prakticky všechny hlavní druhy napadající dobytek). Rezistence na imidazolthiazoly (např. levamisol, butamizol) a tetrahydropyrimidiny (např. pyrantel, morantel) je doposud popisována vzácně (Sutherland et Leathwick, 2010).

7 Citace

- ADAMS, H. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2001, 1201 s. ISBN 08-138-1743-9.
- ANGELUCCI, F., A. BASSO, A. BELLELLI, M. BRUNORI, L. PICA MATTOCCIA a C. VALLE. *The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist*. *Parasitology*. 2007, **134**(09), 1215-1221. DOI: 10.1017/S0031182007002600.
- ARAI, H. P. *Biology of the tapeworm Hymenolepis diminuta*. New York: Academic Press, 1980, 733 s. ISBN 01-205-8980-X.
- ARDREY, R. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. New York: J. Wiley, ©2003, 276 s. ISBN 04-714-9801-7.
- BAGULEY, B. C. Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. *Molecular Biotechnology*. 2010, **46**(3), 308-316. DOI: 10.1007/s12033-010-9321-2.
- BARRETT, J. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology*. 2009, **136**(12), 1633-1642. DOI: 10.1017/S003118200900568X.
- BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, V. FORSTOVÁ-KŘÍŽOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA a B. SZOTÁKOVÁ. The transport of albendazole and albendazole sulphoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Veterinary Parasitology*. 2011, **176**(1) 27-33. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.040.
- BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, L. SKÁLOVÁ, V. KUBÍČEK, J. FIRBASOVÁ, D. BRIESTENSKÝ, J. LAMKA a B. SZOTÁKOVÁ. The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*. 2012, 1-10. DOI: 10.1017/S0031182011002265.
- BOGITSH, B. J., C. E. CARTER a T. N. OELTMANN. *Human parasitology*. 3rd ed. Boston: Elsevier Academic Press, ©2005, 459 s. ISBN 01-208-8468-2.

- CASARETT, L. J., J. DOULL a C. D. KLAASSEN. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6th ed. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, ©2001, s. 133-224. ISBN 978-0071347211.
- CIOLI, D., L. PICA-MATTOCCIA. Praziquantel. *Parasitology Research*. 2003, **90**, 3-9. Doi: 10.1007/s00436-002-0751-z
- COLE, R. B. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, ©2010, 847 s. ISBN 978-047-1741-077.
- COLES, G. C. Anthelmintic resistance - looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*. 2005, **78**(2), 99-108. DOI: 10.1016/j.rvsc.2004.09.001.
- CVILINK, V., V. KUBÍČEK, M. NOBILIS, V. KŘÍŽOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, J. LAMKA, M. VÁRADY, M. KUBĚNOVÁ, R. NOVOTNÁ, M. GAVELOVÁ a L. SKÁLOVÁ. Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 2008a, **151**(2-4), 242-248. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.10.010.
- CVILINK, V., L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, J. LAMKA, R. KOSTIAINEN a R. A. KETOLA. LC/MS/MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed ex vivo by *Haemonchus contortus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008b, **391**(1), 337-343. DOI: 10.1007/s00216-008-1863-9.
- CVILINK, V., B. SZOTÁKOVÁ, I. VOKŘÁL, H. BÁRTÍKOVÁ, J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed ex vivo by *Dicrocoelium dendriticum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009a, **23**(17), 2679-2684. DOI: 10.1002/rcm.4170.
- CVILINK, V., J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*. 2009b, **41**(1), 8-26. DOI: 10.1080/03602530802602880.

- DALVINE, D. K., J. P. O'DONNELL. Characterization of polar urinary metabolites by ionspray tandem mass spectrometry following dansylation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, **12**(8), 419–422. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0231(19980430)12:8<419::ID-RCM176>3.0.CO;2-S
- DALTON, J. *Fasciolosis*. New York, NY, USA: CABI Pub., ©1999, s. 225-276. ISBN 0-85199-260-9.
- DENEGRI G., W. BERNADINA, J. PEREZ-SERRANO, F. RODRIGUEZ-CAABEIRO. Anoplocephalid cestodes of veterinary and medical significance: a review. *Folia Parasitol (Praha)*. 1998, **45**(1), 1-8.
- DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY a I. FAIRWEATHER. Potentiation of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. *Veterinary Parasitology*. 2012, **184**(1), 37-47. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.08.006.
- DOENHOFF, M. J., D. CIOLI aj. UTZINGER. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008, **21**(6), 659-667. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328318978f.
- ESATGIL, M. U., A. GÜLANBER a H. AYDIN. Efficacy of praziquantel (injection formula) in the treatment of *Hymenolepis diminuta* infection in laboratory rats by oral application. *Tropical Medicine and Health*. 2009, **37**(1), 13-16. DOI: 10.2149/tmh.2008-06.
- FEDENIUK R. W., P. J. SHAND. Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices, *Journal of Chromatography A*, 1998, **812**(1–2), 3-15, 10.1016/S0021-9673(98)00119-8.
- FLEMING, S. A., T. CRAIG, R. M. KAPLAN, J. E. MILLER, C. NAVARRE a M. RINGS. Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006, **20**(2), 435-444. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02881.x.

- GASBARRE, L. C., L. L. SMITH, J. R. LICHTENFELS a P. A. PILITT. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Veterinary Parasitology*. 2009, **166**(3-4), 281-285. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.08.018.
- GEERTS, S. a B. GRYSEELS. Drug Resistance in Human Helminths: Current Situation and Lessons from Livestock. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, **13**(2), 207-222. DOI: 10.1128/CMR.13.2.207-222.2000.
- GETACHEW T., P. DORCHIES a P. JACQUIET. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite*. 2007, **14**(1), 3-14.
- GIBSON, G. a P. SKETT. *Introduction to drug metabolism*. 3rd ed. Cheltenham, UK: Nelson Thornes Publishers, ©2001, 256 s. ISBN 07-487-6011-3.
- GILAR, M., E. BOUVIER a B. COMPTON. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. *Journal of Chromatography A*. 2001, **909**(2), 111-135. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)01108-0.
- HAYEN, H. a U. KARST. Strategies for the liquid chromatographic?mass spectrometric analysis of non-polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 2003, **1000**(1-2), 549-565. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00505-3.
- HOLČAPEK, M., L. KOLÁROVÁ a M. NOBILIS. High-performance liquid chromatography?tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, **391**(1), 59-78. DOI: 10.1007/s00216-008-1962-7.
- HSIEH, Y., K. MERKLE, G. WANG, J. BRISSON a W. A. KORFMACHER. High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionization/Tandem Mass Spectrometric Analysis for Small Molecules in Plasma. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(13), 3122-3127. DOI: 10.1021/ac0300082

- JEZIORSKI, M. C. a R. M. GREENBERG. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. *International Journal for Parasitology*. 2006, **36**(6), 625-632. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.02.002.
- JONES, T. C., R. D. HUNT a N. W. KING. *Veterinary pathology*. 6th ed. Baltimore, Md.: Williams, ©1997, 1392 s. ISBN 06-830-4481-8.
- KAMINSKY, R., P. DUCRAY, M. JUNG, R. CLOVER, L. RUFENER, J. BOUVIER, S. S. WEBER, A. WENGER, S. WIELAND-BERGHAUSEN, T. GOEBEL, N. GAUVRY, F. PAUTRAT, T. SKRIPSKY, O. FROELICH, C. KOMOIN-OKA, B. WESTLUND, A. SLUDER a P. MÄSER. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 2008, **452**(7184), 176-180. DOI: 10.1038/nature06722.
- KNOX, D. P., D. L. REDMOND, G. F. NEWLANDS, P. J. SKUCE, D. PETTIT a W. D. SMITH. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*. 2003, **33**(11), 1129-1137. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00167-X.
- KÖHLER, Peter a B. GRYSEELS. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance: Current Situation and Lessons from Livestock. *International Journal for Parasitology*. 2001, **31**(4), 336-345. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00131-X.
- LI, X. a H. NIKAIDO. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*. 2009, **69**(12), 1555-1623. DOI: 10.2165/11317030-000000000-00000.
- MA, S., S. K. CHOWDHURY a K. B. ALTON. Application of Mass Spectrometry for Metabolite Identification. *Current Drug Metabolism*. 2006, **7**(5), 503-523. DOI: 10.2174/138920006777697891.
- MANGA-GONZALEZ, M.Y., H. QUIROZ-ROMERO, C. GONZALEZ-LANZA, B. MINAMBRES, P. OCHOA. Strategic control of *Dicrocoelium dendriticum* (Digenea) egg excretion by naturally infected sheep. *Veterinari Medicina*, 2010, **55**(1): 19–29.

- MARQUEZ, B. a F. VAN BAMBEKE. ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions. *Current Drug Targets*. 2011, **12**(5), 600-620. DOI: 10.2174/138945011795378504.
- MARTIN, R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*. 1997, **154**, 11-34. DOI: 10.1016/S1090-0233(05)80005-X.
- MCKELLAR, Q. A. a E. W. SCOTT. The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1990, **13**(3), 223-247. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1990.tb00773.x.
- MEHLHORN, H. *Encyclopedic reference of parasitology*. 2. ed. Berlin: Springer, 2001. ISBN 3-540-66829-2.
- MESSERLI, S. M., R. S. KASINATHAN, W. MORGAN, S. SPRANGER a R. M. GREENBERG. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2009, **167**(1), 54-59. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.007.
- MORENO, L., L. ALVAREZ, L. MOTTIER, G. VIRKEL, S. SANCHEZ BRUNI a C. LANUSSE. Integrated pharmacological assessment of flubendazole potential for use in sheep: disposition kinetics, liver metabolism and parasite diffusion ability. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2004, **27**(5), 299-308. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00616.x
- MOTTIER, L., L. ALVAREZ, L. CEBALLOS a C. LANUSSE. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology*. 2006, **113**(1), 49-57. DOI: 10.1016/j.exppara.2005.12.004.
- MULLER, R. a D. WAKELIN. *Worms and human disease*. 2nd ed. New York: CABI, ©2002, 300 s. ISBN 08-519-9516-0.
- NASSAR, A. F., P. F. HOLLENBERG a J. SCATINA. *Drug metabolism handbook: concepts and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, ©2009, 1041 s. ISBN 04-701-1803-2.

- NIESSEN, W. *Liquid chromatography--mass spectrometry*. 3rd ed. /. Boca Raton: CRC/Taylor, ©2006, 608 s. Chromatographic science, v. 97. ISBN 978-082-4740-825.
- OTRANTO, D. a D. TRAVERSA. A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*. 2002, **107**(4), 317-335. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00121-8.
- OUELLETTE, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health*. 2001, **6**(11), 874-882. ISSN 1360-2276. DOI: 10.1046/j.1365-3156.2001.00777.x.
- PAWLISZYN, J. a H. L. LORD. *Handbook of sample preparation*. Hoboken, N.J.: Wiley, ©2010, 491 s. ISBN 04-700-9934-8.
- PAPICH, M. G. *Saunders handbook of veterinary drugs: small and large animal*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, ©2011, 858 s. ISBN 14-377-0152-3.
- PETRÁČKOVÁ V. a J. KRAUS. *Akademický slovník cizích slov: [A-Ž]*. 1. vyd. Praha: Academia, 1997, 834 s. ISBN 80-200-0607-9.
- PÉREZ-LLARENA F.J. a G. BOU. Beta-lactamase inhibitors: the story so far. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**(28), 3740-65.
- PRAKASH, C., C. L. SHAFFER a A. NEDDERMAN. Analytical strategies for identifying drug metabolites. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007, **26**(3), 340-369 DOI: 10.1002/mas.20128.
- RACK, J., E. ADUSU a T. JELINEK. Humane Infektion mit *Dicrocoelium dendriticum*. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2004, **129**(47), 2538-2540. DOI: 10.1055/s-2004-835298.
- RAMANATHAN, R. *Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics*. Hoboken, N.J.: Wiley, ©2009, 389 s. ISBN 978-047-1751-588.
- ROSSI, D. T. a M. W. SINZ. *Mass spectrometry in drug discovery*. New York: Marcel Dekker, ©2002, 420 s. ISBN 08-247-0607-2.

- SAGER, H., B. HOSKING, B. BAPST, P. STEIN, K. VANHOFF a R. KAMINSKY. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2008, **159**(1), 49-54. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.006.
- SAMUEL, W. M., A. KOCAN, M. J. PYBUS a J. W. DAVIS. *Parasitic diseases of wild mammals*. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press, 2001, 559 s. ISBN 08-138-2978-X.
- SKÁLOVÁ, L. a I. BOUŠOVÁ. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2011, 160 s. ISBN 978-802-4619-170.
- SLAVICA, A., T. FLORIJAČIĆ, Z. JANICKI, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN, A. ARINCULIĆ, K. PINTUR. Treatment of fascioloidosis (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in free ranging and captive red deer (*Cervus elaphus* L.) at eastern Croatia. *Veterinarski arhiv*. 2006, **76**, 9-19
- SMITH, R. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*. 2003, **1000**(1-2), 3-27, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00511-9.
- SOLANA, H. D., J. A. RODRIGUEZ a C. E. LANUSSE. Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitology Research*. 2001, **87**(4), 275-280. DOI: 10.1007/PL00008578.
- SUTHERLAND, I. A. a D. M. LEATHWICK. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. *Trends in Parasitology*. 2010, **27**(4), 176-181. DOI: 10.1016/j.pt.2010.11.008.
- TANG, L. a P. KEBARLE. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry*. 1993, **65**(24), 3654-3668. DOI: 10.1021/ac00072a020.
- TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. 2005, **38**(4), 328-334. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

- VOLF, P. a P. HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2007, 318 s. ISBN 978-807-3870-089.
- VON RAD, U., R. HÜTTL, F. LOTTSPREICH, A. GIERL a M. FREY. Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *The Plant Journal*. 2001, **28**(6), 633-642. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01161.x
- WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 1997, **72**(3-4), 391-412. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00107-6.
- YILMAZ, H., A. DULGER, M. CICEK a Z. CENGIZ. Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Turkey. *Annals of Saudi Medicine*. 2010, roč. 30, č. 2, s. 159-61. DOI: 10.4103/0256-4947.60525.
- ZHANG, H., D. ZHANG, K. RAY a M. ZHU. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2009, **44**(7), 999-1016. DOI: 10.1002/jms.1610.

8 Zkratky

| | |
|----------|--|
| ABC | ATP binding cassette |
| ABZ | Albendazol |
| AKR | Aldo-Keto Reduktáza |
| APCI | Atmospheric pressure chemici ionization |
| API | Atmospheric pressure ionization |
| APPI | Atmospheric pressure photoionization |
| ATP | adenosintrifosfát |
| CYP | cytochrom P450 |
| Da | Dalton |
| DESI | Desorpce elektrosprejem |
| ESI | Electrospray ionziation |
| FLU | Flubendazol |
| FMO | Flavinové monooxygenázy |
| FWHM | Full width at half maximum |
| GC | Gas chromatography |
| GC/MS | Gas chromatography / Mass spectrometry |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| LC/MS | Liquid chromatogramy / Mass spectrometry |
| LC/MS/MS | Liquid chromatography–tandem mass spectrometry |
| MA | Mass Accuracy |
| MALDI | Matrix-assisted lase/desorption ionization |
| MDR | Medium-chain dehydrogenase/reductase |

| | |
|-------|--|
| MEB | Mebendazol |
| NADPH | Redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid fosfát |
| ppm | parts per milion |
| PZQ | Praziquantel |
| QMF | Quadrupole Mass Filter |
| RNA | Ribonucleic acid |
| SDR | Short-chain dehydrogenase/reductase |
| SRM | Selected Reaction Monitoring |
| TCBZ | Triklabendazol |
| TOF | Time of flight |
| TOF | Time-of-Flight |
| UGlT | UDP-glucosyltransferáza |

9 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo přinést nové poznatky k problematice rozvoje rezistence u parazitů, zejména se zaměřením na téma biotransformace anthelmintik a identifikace jejich metabolitů u parazitů s využitím techniky spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Dílčí cíle práce:

1. Studium biotransformace vybraných anthelmintik ze skupiny benzimidazolů u motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) a identifikace metabolitů první i druhé fáze.
2. Studium biotransformace vybraných anthelmintik ze skupiny benzimidazolů u tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) a identifikace metabolitů první i druhé fáze
3. Studium biotransformace prazikvantelu u parazitů motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) a tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*).
4. Zhodnocení rozdílů v biotransformaci anthelmintik u 4 na léčbu různě citlivých kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) s důrazem na metabolity druhé fáze.
5. Studium biotransformace ivermektinu u parazita vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*).

10 Experimentální část – výsledky a diskuse

10.1 Identifikace metabolitů benzimidazolových anthelmintik u motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*)

CVILINK, V., B. SZOTÁKOVÁ, I. VOKŘÁL, H. BÁRTÍKOVÁ, J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed ex vivo by *Dicrocoelium dendriticum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009, **23**(17), 2679-2684. DOI: 10.1002/rcm.4170.

Tato práce se zabývala studiem metabolismu anthelmintik ze skupiny benzimidazolů. Konkrétně byly studovány flubendazol, mebendazol a albendazol. Práce byla provedena na živých jedincích motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*), což umožnilo zachytit jak metabolity první, tak druhé fáze biotransformace. Po extrakcích homogenátů i média na pevných fázích byly vzorky analyzovány pomocí LC/MS. Hmotnostní spektrometr byl v tomto případě typu trojdimenzionální iontové pasti, která se poměrně dobře hodí na studium struktury metabolitů. V případě této studie umožňoval přístroj podrobit studované metabolity štěpení až do úrovně MS⁴, což umožnilo lépe určit strukturu studovaných metabolitů.

Výsledky této práce ukázaly schopnost *D.dentriticum* metabolizovat všechny studované látky v podmínkách *ex vivo*. Zaznamenány byly oxidační a redukční reakce první fáze, i konjugační reakce druhé fáze biotransformace. Konkrétně u albendazolu (m/z 266) byla zaznamenána oxidace za vzniku albendazol sulfoxidu (m/z 282). Toto byl jediný zaznamenaný metabolit pro toto léčivo. U flubendazolu (m/z 314) a mebendazolu (m/z 296), což jsou léčiva lišící se ve své struktuře pouze o jeden atom fluoru, docházelo v obou případech k redukci karbonylové skupiny a tedy produkci metabolitů o m/z 316 u flubendazolu a 298 u mebendazolu. U obou těchto léčiv byly také zaznamenány metabolity druhé fáze biotransformace, a to konjugáty ve formě metylovaných derivátů redukovaných forem anthelmintik.

Zajímavé je zjištění, že ačkoliv jsou mebendazol a flubendazol velmi podobná léčiva, pouze u mebendazolu, resp. jeho redukované formy, docházelo k dimetylaci

(*m/z* 326) bez výskytu monometylovaného derivátu. U redukovaného flubendazolu naproti tomu bylo možné pozorovat pouze dva monometylované deriváty (*m/z* 330). Albendazol pak nebyl metylován vůbec. Z toho lze usuzovat na výraznou selektivitu enzymů vůči substrátu.

Tato práce dokazuje schopnost biotransformovat léčiva ze skupiny benzimidazolů u *D. dendriticum* pomocí redukčních a oxidačních reakcí, což může v důsledku vést k přispění rozvoje rezistence.

10.2 Studium biotransformačních enzymů a biotransformace vybraných anthelmintik u tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) a identifikace metabolitů první i druhé fáze

BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, L. SKÁLOVÁ, V. KUBÍČEK, J. FIRBASOVÁ, D. BRIESTENSKÝ, J. LAMKA a B. SZOTÁKOVÁ. The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*. 2012. DOI: 10.1017/S0031182011002265. (článek v tisku)

Cílem této práce bylo posoudit aktivity hlavních enzymů metabolizujících léčiva a také prostudovat metabolismus vybraných anthelmintik, konkrétně albendazolu, flubendazolu a mebendazolu u tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*), druhu užívaného jako modelová tasemnice. Byly provedeny jak *in vitro* experimenty se subcelulárními frakcemi, tak *ex vivo* experimenty s celými živými tasemnicemi. Metabolity vybraných léčiv byly detekovány a studovány pomocí LC/MS techniky. K studiu struktury metabolitů byl použit hmotnostní spektrometr typu trojdimenzionální iontové pasti. Zároveň byly měřeny aktivity vybraných biotransformačních enzymů (oxidačních, redukčních a konjugačních) v mikrosomální, cytosolické a mitochondriální frakci.

V podmínkách *in vitro* ani *ex vivo* nebyl pozorován žádný vznikající metabolit albendazolu. Při testech, zda nemůže docházet k sulforedukci, byly tasemnice a subcelulární frakce inkubovány také v prostředí albendazol sulfoxidu. Ani schopnost

sulforedukce však nebyla u *H. diminuta* potvrzena. Toto zjištění je v kontrastu s údaji naměřenými jinými autory u parazita *Moniezia expansa*, kde k tomuto jevu docházelo. Tato skutečnost ukazuje na fakt, že nelze poznatky o metabolismu tasemnic generalizovat.

Naproti tomu u léčiv flubendazolu a mebendazolu byla pozorována výrazná redukce karbonylové skupiny. To je v souladu s všeobecně přijímanou teorií, že redukce je u helmintů hlavní detoxikační cestou pro látky, které mají ve své struktuře karbonylovou skupinu. Struktury flubendazolu a mebendazolu jsou si velmi podobné, avšak redukční aktivita enzymů *H. diminuta* (cytosolická frakce) pro mebendazol byla výrazně vyšší. Rozdíl mezi těmito molekulami pak bylo možné pozorovat také při studiu metabolitů druhé fáze, kde byly jediné pozorovatelné metabolity určeny jako metylované deriváty redukovaného flubendazolu. Tyto metabolity jsou shodné s metabolity detekovanými dříve u *D. dendriticum*. U mebendazolu nebyly žádné metylace pozorovány.

Protože jsou metabolity s redukovanou karbonylovou skupinou považovány za méně aktivní, lze se domnívat, že tasemnice jsou touto cestou schopny snižovat účinnost takovýchto látek ve svém těle. Zjištěná fakta ukazují, že biotransformace by mohla hrát významnou roli při případném rozvoji rezistence.

10.3 Studium biotransformace prazikvantelu u parazitů tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) a motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*)

VOKŘÁL, I., R. JIRÁSKO, V. JEDLIČKOVÁ, H. BÁRTÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA, M. HOLČAPEK a B. SZOTÁKOVÁ. The inability of tapeworm *Hymenolepis diminuta* and fluke *Dicrocoelium dendriticum* to metabolize praziquantel. *Veterinary Parasitology*. 2012, **185**(2-4), 168–174 DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.09.026.

Na základě předchozích výsledků, kdy byla u parazitů motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*) i tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) pozorována

schopnost metabolizace anthelmintik ze skupiny benzimidazolů, bylo rozhodnuto o otestování léčiva jiné chemické struktury – prazikvantelu. Prazikvantel je léčivo ze skupiny pyrazinoisochinolinů, které vykazuje účinnost proti oběma zmíněným parazitům a u tasemnice potkaní (*H. diminuta*) je minimálně u lidí lékem volby.

Studium bylo zaměřeno nejen na biotransformaci u helmintů, ale také na porovnání metabolismu se savci. Jako zástupce savců posloužil potkan kmene Wistar (*Rattus norvegicus*). V práci tak došlo k zajímavému srovnání biotransformace mezi parazitem a jeho hostitelem. Bylo tím také umožněno otestovat veškeré metodiky na reálných metabolitech, z nichž část byla již v minulosti popsána, avšak jejich komerční dostupnost je nulová. V experimentech byla využita technika spojení ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu, což značně usnadnilo detekci a identifikaci metabolitů. Důraz byl kladen na vysokou správnost měření hmoty, což umožnilo určení přesné molekulární hmotnosti daných metabolitů a také informace o jejich elementárním složení.

Z provedených experimentů plyne, že oba studovaní parazité nejsou schopni *ex vivo* ani *in vitro* tvořit u prazikvantelu metabolity první ani druhé fáze a zároveň tak tedy nejsou schopni toto léčivo inaktivovat. Z toho lze usuzovat, že případně vzniklá rezistence na prazikvantel u těchto parazitů nebude mít souvislost s biotransformací léčiva, ale bude na jiném podkladě. U savců naproti tomu nacházíme celkem 35 různých metabolitů, z nichž převážná většina jsou produkty oxidačních reakcí.

10.4 Zhodnocení rozdílů v biotransformaci anthelmintik u 4 na léčbu různě citlivých kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) s důrazem na metabolity druhé fáze.

VOKŘÁL I., H. BÁRTÍKOVÁ, L. PRCHAL, L. STUHLÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, J. LAMKA, M. VÁRADY a V. KUBÍČEK. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*. (přijato do tisku)

Přínos této studie je v porovnání aktivit biotransformačních enzymů u čtyř kmenů vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*). Každý kmen (WR, BR, ISE, ISE-S) je charakterizován odlišnou odolností proti léčbě anthelmintiky. Kmen WR je odolný vůči všem běžným anthelmintikům, kmen BR vykazuje odolnost proti benzimidazolovým anthelmintikům, kmen ISE-S je rezistentní vůči ivermektinu a kmen ISE je citlivý vůči běžným anthelmintikům. Tato kombinace kmenů v experimentu umožňuje studovat ovlivnění metabolismu helmintů v různých stádiích rozvoje rezistence.

U všech kmenů byly stanoveny *in vitro* aktivity karbonyl reduktas (cytosolická frakce) a UDP-glukosyltransferasy (mikrosomální frakce). Zároveň byly sledovány rozdíly v produkci metabolitů první a druhé fáze *ex vivo*. Již dříve byla zjištěna metabolická dráha flubendazolu u *H. contortus*. Je známo, že u tohoto léčiva dochází k redukci karbonylové skupiny a také k tvorbě několika konjugátů s glukózou (jak s redukovanou formou léčiva, tak s parentní látkou). Krom redukovaného flubendazolu však pro ostatní metabolity neexistují standardy a tudíž muselo být využito při kvantifikaci pouze porovnání ploch pod peakem. Pro analýzy bylo využito HPLC spojené s MS v režimu SRM, což poskytuje dostatečnou selektivitu v jinak relativně složité matrici. Aby se předešlo efektu matrice a chybám při zpracování, byl zvolen jako vnitřní standard mebendazol, léčivo strukturou i chováním podobné flubendazolu.

Metabolity produkované *ex vivo* jednotlivými kmeny byly kvantifikovány a porovnány. Z výsledků je poměrně jednoznačně patrný rozdíl mezi jednotlivými kmeny, zvláště pak mezi kmeny WR a ISE, kde WR produkoval nejvyšší koncentrace metabolitů první i druhé fáze, zatímco ISE produkoval ze sledovaných kmenů koncentrace nejnižší. Z toho lze usuzovat, že rezistentní kmen, v porovnání s kmenem citlivým, má schopnost mnohem rychleji a ve větší míře deaktivovat pro něj toxické xenobiotikum. Zajímavostí, která poukazuje na specifitu exportních proteinů, pak může být fakt, že jeden z glukosidových konjugátů flubendazolu byl nalezen pouze uvnitř parazita. Parazit tak sice látku inaktivuje, ale nedokáže se jí zbavit.

Tyto výsledky byly podpořeny i *in vitro* studií s mikrosomální frakcí, kde za přítomnosti redukovaného flubendazolu a UDP-glukózy vznikal konjugát nejvíce opět u kmene WR a nejméně u kmene ISE.

In vitro byla také studována biotransformace flubendazolu v cytosolické frakci z jednotlivých kmenů za přítomnosti NADPH. Tyto podmínky jsou vhodné pro tvorbu

redukovaného flubendazolu. V tomto případě však rozdíly mezi kmeny byly zanedbatelné. Lze to přisuzovat rozdílným podmínkám, které panují v *ex vivo* a *in vitro* experimentech. V *in vitro* podmínkách chybí jakákoliv kompartmentizace, transportéry, modulace enzymové exprese a další. Lze se tak domnívat, že výsledky získané z *ex vivo* měření, i když nepředstavují přesné hodnoty ale pouze jakási bezrozměrná čísla, mají v tomto případě větší vypovídající hodnotu, než je tomu u výsledků získaných *in vitro*.

Shrneme-li poznatky získané z této studie, můžeme říci, že nejen enzymy účastníci se první fáze biotransformace, ale i enzymy účastníci se druhé fáze biotransformace hrají významnou roli u kmenů, které jsou rezistentní.

10.5 Studium biotransformace ivermektinu u parazita vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*).

VOKŘÁL I., R. JIRÁSKO, V. JEDLIČKOVÁ, L. STUHLÍKOVÁ, H. BÁRTÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA, M. HOLČAPEK a B. SZOTÁKOVÁ. Different fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology*. (článek odeslán k recenznímu řízení)

Předchozí výsledky ukázaly, že vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) je schopna metabolizovat léčiva ze skupiny benzimidazolů. Bylo prokázáno, že biotransformace u rezistentních kmenů probíhá ve vyšší míře, nežli je tomu u kmenů k léčbě citlivých. Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto prostudovat léčivo velmi často užívané proti tomuto druhu parazita – ivermektin. Ivermektin je léčivo ze skupiny makrocyclických laktonů, které vykazuje účinnost proti oblým červům, což zahrnuje i vlasovku. Užívá se jak ve veterinární, tak také humánní medicíně.

V tomto případě bylo studium zaměřeno na porovnání biotransformace ivermektinu u parazita a hostitele. Tím se stala ovce domácí (*Ovis aries*), která je jedním z přirozených hostitelů vlasovky. V práci tak došlo k zajímavému srovnání biotransformace anthelmintika mezi parazitem a jeho hostitelem. Bylo tím také umožněno otestovat veškeré metodiky na reálných metabolitech, z nichž část byla již v minulosti popsána, avšak nejsou komerčně dostupné. V experimentech byla využita

technika spojení ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu, což značně usnadnilo detekci a identifikaci metabolitů. V tomto případě je použití citlivé metody velmi důležité, protože ivermektin se běžně dává v mnohem nižších koncentracích, než tomu je u léčiv ze skupiny benzimidazolů. Důraz byl kladen na vysokou správnost měření hmoty, což umožnilo určení přesné molekulární hmotnosti daných metabolitů a také podalo informace o jejich elementárním složení.

Z provedených experimentů překvapivě plyne, že vlasovka není schopna *ex vivo*, ani *in vitro* tvořit u ivermektinu metabolity první ani druhé fáze. Je tak pravděpodobné, že rezistence na ivermektin, která je u některých kmenů již popsána, nemá spojitost s biotransformací ivermektinu na méně aktivní, nebo snad dokonce neaktivní metabolity. U ovce domácí byl studován metabolismus na hepatocytech a také na mikrosomálních frakcích. Dle předpokladu byly zaznamenány oxidace a demethylace, jejichž vznik z ivermektinu byl již dříve popsán. Relativně překvapivé je množství sulfatovaných metabolitů a také jeden případ glukuronidace. Celkem bylo na subcelulární i buněčné úrovni u hostitele zaznamenáno 16 metabolitů, z toho 9 metabolitů druhé fáze.

11 Závěr

V minulých desetiletích narostl počet rezistentních helmintů natolik, že dnes můžeme mluvit o globálním problému. Rezistence může být způsobena celou řadou mechanismů. Jedním z nich je i biotransformace léčiva parazitem na méně aktivní nebo neaktivní metabolity. Studium metabolismu u helmintů tedy můžeme zjistit, jaké struktury jsou k biotransformaci náchylnější a také, zda souvisí metabolismus s možnou rezistencí. Protože však jsou parazité často relativně malými organismy a jejich získávání je pracné, je nutno při studiu využít technik, které jsou schopné pracovat i s malým množstvím vzorku a malými koncentracemi. Jednou z těchto technik je hmotnostní spektrometrie, která, spojená s kapalinovou chromatografií, nám umožňuje k tomuto studiu relativně jednoduše přistoupit.

Tato práce se snažila doplnit alespoň část slepých míst v našich znalostech o biotransformaci u helmintů. Byly studovány biotransformace a biotransformační enzymy u zástupce tasemnic, motolic i hlístic. U všech zástupců, tedy motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*), tasemnice potkaní (*Hymenolepis diminuta*) i vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) byla prokázána schopnost biotransformace alespoň některých léčiv, hlavně pak těch, které obsahují karbonylovou skupinu.

D. dendriticum prokázala schopnost metabolizovat 3 testované zástupce benzimidazolových léčiv. U albendazolu byla zjištěna schopnost oxidace léčiva na albendazol sulfoxid. U léčiv flubendazolu a mebendazolu byl jasně prokázán význam redukce karbonylové skupiny a také tvorba metylovaných konjugátů. Naproti tomu u prazikvantelu, léčiva s výrazně odlišnou strukturou od benzimidazolových anthelmintik, nedocházelo k naprosto žádné biotransformaci a to jak *ex vivo*, tak *in vitro* studiích.

U *H. diminuta* je metabolismus léčiva obdobný tomu, který byl popsán u *D. dendriticum*. Odlišnosti však jsou. Jedná se zejména o neschopnost oxidovat molekulu albendazolu a neschopnost tvorby metylovaných derivátů mebendazolu. Ze studovaných parazitů je tak množstvím i charakterem metabolitů nejchudší. Ani prazikvantel, který byl testován jako léčivo s jinou strukturou pro porovnání s benzimidazoly, nebyl metabolizován.

U posledního studovaného parazita (*H. contortus*) byly známy metabolické dráhy benzimidazolových léčiv již z dřívějších prací. Studium bylo tedy zaměřeno na význam již známých metabolitů a jejich role v rezistenci. U porovnávaných rezistentních a citlivých kmenů byl prokázán vzrůst aktivity biotransformačních enzymů u rezistentů. Naproti tomu kmen citlivý vůči běžným anthelmintikům prokázal nejnižší aktivitu v tvorbě metabolitů jak první, tak druhé fáze. Ivermektin, který byl testován jako léčivo s jinou strukturou pro porovnání s benzimidazoly, nebyl vlasovkou vůbec metabolizován.

Veškeré získané poznatky nás posunují opět dál ve znalostech o možných mechanismech vzniku rezistence. Potenciálně se také jedná o informace, které v budoucnu mohou vést k návrhu nových léčiv odolnějších vůči biotransformacím, účinnějších proti parazitům a také šetrnějších vůči hostiteli.

12 Přílohy

12.1 Publikace vztahující se k tématu práce

I. CVILINK, V., B. SZOTÁKOVÁ, I. VOKŘÁL, H. BÁRTÍKOVÁ, J. LAMKA a L. SKÁLOVÁ. Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed ex vivo by *Dicrocoelium dendriticum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009, **23**(17), 2679-2684. DOI: 10.1002/rcm.4170.

II. BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, L. SKÁLOVÁ, V. KUBÍČEK, J. FIRBASOVÁ, D. BRIESTENSKÝ, J. LAMKA a B. SZOTÁKOVÁ. The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*. 2012. DOI: 10.1017/S0031182011002265. (článek v tisku)

III. VOKŘÁL I., R. JIRÁSKO, V. JEDLIČKOVÁ, H. BÁRTÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA, M. HOLČAPEK a B. SZOTÁKOVÁ. The inability of tapeworm *Hymenolepis diminuta* and fluke *Dicrocoelium dendriticum* to metabolize praziquantel. *Veterinary Parasitology*. 2012, **185**(2-4), 168–174 DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.09.026.

IV. VOKŘÁL I., H. BÁRTÍKOVÁ, L. PRCHAL, L. STUHLÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, J. LAMKA, M. VÁRADY a V. KUBÍČEK. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*. (přijato do tisku)

V. VOKŘÁL I., R. JIRÁSKO, V. JEDLIČKOVÁ, L. STUHLÍKOVÁ, H. BÁRTÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA, M. HOLČAPEK a B. SZOTÁKOVÁ. Different fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology*. (článek připraven k odeslání)

12.2 Seznam publikací nevztahujících se k tématu práce

KŘÍŽOVÁ, V., J. LAMKA, B. SZOTÁKOVÁ, I. VOKŘÁL, V. SRPOVÁ, M. URBÁNKOVÁ, V. KUBÍČEK, M. NOBILIS a L. SKÁLOVÁ. Dicrocoeliosis of Old Mouflon Ewes - Effect on Biotransformation Enzymes and Metabolism of Anthelmintics In Vitro. *The Open Veterinary Science Journal*. 2008, **2**(1), 23-32. DOI: 10.2174/1874318800802010023.

VOKŘÁL, I., V. KŘÍŽOVÁ, J. LAMKA, V. KUBÍČEK, B. SZOTÁKOVÁ, M. VÁRADY, M. NOBILIS a L. SKÁLOVÁ. Effect of Flubendazole on Biotransformation Enzymes Activities in *Haemonchus contortus*. *The Open Parasitology Journal*. 2010, **4**(1), 24-28. DOI: 10.2174/1874421401004010024.

BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, V. FORSTOVÁ-KŘÍŽOVÁ, L. SKÁLOVÁ, J. LAMKA a Barbora SZOTÁKOVÁ. The transport of albendazole and albendazole sulphoxide in the lancet fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). *Veterinary Parasitology*. 2011, **176**(1), 27-33. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.040.

BÁRTÍKOVÁ, H., I. VOKŘÁL, V. KUBÍČEK, B. SZOTÁKOVÁ, L. PRCHAL, J. LAMKA, M. VÁRADY a L. SKÁLOVÁ. Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology*. 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.02.008.

12.3 Seznam prezentací na vědeckých setkáních

Vokřál, I., B. Szotáková, J. Lamka, V. Cvilink, V. Křížová, H. Bártíková a L. Skálová. Metabolism of xenobiotics in heminths. 17th Helminthological days, 11. 5. – 15. 5. 2009 Vranov nad Dyjí, Czech Republic, Book of abstracts (2009) 32. Oral presentation

Vokřál, I., H. Bártíková, V. Křížová, J. Lamka a B. Szotáková. LC-MS identification of praziquantel metabolites formed *ex vivo* by *Dicrocoelium dendriticum*. 18th International mass spectrometry conference, 30. 8. – 4. 9. 2009, Bremen, Germany. Poster no. PWA 433

Vokřál I., H. Bártíková, B. Szotáková, L. Skálová, a J. Lamka. Biotransformation as a defence of parasitic helminths against activity of anthelmintics. 18th Helminthological days, 10. 5. - 14. 5. 2010, Rožnov pod Radhoštěm, Czech Republic, Oral presentation

Vokřál I., H. Bártíková, J. Lamka, L. Skálová a B. Szotáková B. Biotransformation as a defence of *Hymenolepis diminuta* against activity of anthelmintics. 1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 1. 2. – 2. 2. 2011, Czech Republic, Oral presentation

Vokřál I., H. Bártíková, J. Lamka, L. Skálová, B. Szotáková. *Hymenolepis diminuta* - biotransformation of anthelmintic drugs. 19th Helminthological days, 9. 5. – 13. 5. 2011, Kunžak, Czech Republic, Oral presentation

Vokřál, I., H. Bártíková, J. Lamka, L. Skálová, a Szotáková, B. Biotransformation study of anthelmintic drugs in *Hymenolepis diminuta*. The 4th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology. 19. 6. - 22. 6. 2011, Oslo, Norway. Parasites and infectious diseases in a changing world (2011). 107.

Vokřál I., H. Bártíková, M. Preslová, L. Kubíček, J. Lamka, L. Skálová a B. Szotáková. Active export of anthelmintics in helminths as a defense strategy against the treatment. 2. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 31. 1. – 1. 2. 2012, Czech Republic, Oral presentation

Szotáková B., H. Bártíková, I. Vokřál, V. Kubíček, J. Lamka a L. Skálová. Effect of Model Inhibitors on Albendazole Sulphoxidation in Lancet Fluke (*Dicrocoelium dendriticum*). 11th European Regional ISSX Meeting. 17. 5 – 20. 5. 2011, Lisbon, Portugal, Poster no. 107

Szotáková B., H. Bártíková, I. Vokřál, J. Lamka a L. Skálová. Drug transport and biotransformation as resistance mechanisms in helminths. XXVI. Xenobiochemické sympóziium. 7. 9. – 9. 9. 2011, Trenčianske Teplice, Czech Republic, Oral presentation

Bártíková H., J. Firbasová, I. Vokřál, L. Skálová, J. Lamka, V. Kubíček a B. Szotáková. Biotransformation of selected anthelmintics in rat tapeworm *hymenolepis diminuta*. XXII. Biochemický zjazd, 8. 9. – 12. 9. 2010, Martin, Slovak Republic, Poster no. 100

Jedličková V., R. Jirásko, M. Holčapek, I. Vokřál a L. Skálová. *In vitro* and *in vivo* studies of praziquantel and its metabolites using UHPLC/MS/MS, Česká konference hmotnostní spektrometrie, 19. 10. - 21. 10. 2011, Hradec Králové, Czech Republic.

Jedličková V., R. Jirásko, L. Skálová, I. Vokřál a M. Holčapek. Analytická charakterizace anthelmintik a jejich metabolitů s využitím UHPLC/MS/MS, Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XII., 4. 10. - 6. 10. 2010, Luka nad Jihlavou, Czech Republic.

Jedličková V., R. Jirásko, I. Vokřál, L. Skálová a M. Holčapek. Characterization of praziquantel and its metabolites by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011), 19. 6. - 24. 6. 2011, Budapest, Hungary. Poster no. P1-S-360-TU

Jedličková V., J. Kozic, R. Jirásko, I. Vokřál, L. Skálová a M. Holčapek, *In vitro* studies of anthelmintic drugs. YISAC 2011. 28. 6. – 1. 7. 2011, Novi Sad, Serbia. Oral presentation.