

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Diplomová práce

2006

Jitka Vlasáková

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Biotransformace antihelmintik motolicí kopinatou

Hradec Králové 2006

Jitka Vlasáková

Obsah

1	Úvod	5
2	Teoretická část	7
2.1	Biotransformace xenobiotik	7
2.1.1	Specifika metabolismu u helmintů	8
2.2	Rezistence na antihelmintika.....	13
2.3	Albendazol.....	18
2.4	Dikrocelióza.....	21
3	Cíl	29
4	Materiál a metody.....	30
4.1	Materiál	30
4.1.1	Přístroje.....	30
4.1.2	Chemikálie.....	31
4.1.3	Biologický materiál	31
4.2	Metody	32
4.2.1	Příprava pufrů a médií.....	32
4.2.2	Příprava subcelulárních frakcí.....	35
4.2.3	BCA stanovení bílkoviny	35
4.2.4	Experimenty <i>in vivo</i>	36
4.2.5	Experimenty <i>in vitro</i>	38
5	Výsledky.....	41
5.1	Stanovení bílkoviny	41
5.2	Metabolismus ABZ a ABZSO motolicí kopinatou <i>in vitro</i>	44
5.2.1	Metabolismus albendazolu 50 µM	44
5.2.2	Stanovení stereospecifity sulfoxidace ABZ	48
5.2.3	Metabolismus albendazolsulfoxidu	51
5.2.4	Sledování metabolismu ABZ v závislosti na koncentraci substrátu	55
5.2.5	Stanovení stereospecifity sulfoxidace ABZ	60
5.3	Metabolismus ABZ a ABZSO motolicí kopinatou <i>in vivo</i>	62

5.3.1	Metabolismus albendazolu	62
5.3.2	Metabolismus albendazolsulfoxidu	66
6	Diskuze	72
7	Závěr	77
8	Seznam použitých zkratk	78
9	Literatura	79

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat především Doc. RNDr. Lence Skálové, PhD. za odborné vedení a cenné rady. Dále děkuji Ing. Barboře Szotákové, PhD.; Mgr. Michalovi Šavlíkovi, PhD. a paní Aleně Pakostové za pomoc v experimentální části práce a Doc. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za odběr biologického materiálu.

1 Úvod

Parazitičtí helminté způsobují v živočišné produkci značné ekonomické ztráty. Snižují se výnosy masa, mléka i vlny, dochází k úhynům zvířat. Většina těchto ztrát je zapříčiněna gastrointestinálními infekcemi. Mezi šest nejrozšířenějších a ekonomicky nejzávažnějších nálezů se řadí i dikrocelióza, jejímž původcem je motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*). Tento parazit je rozšířen téměř celosvětově a prevalence v některých oblastech dosahuje až 100%. Příznaky dikroceliózy bývá vyhublost, anémie a poškození jater, nemoc je však často maskována přítomností infekce s výraznějšími symptomy. K léčbě dikroceliózy je nutno použít vyšší dávky léčiv než u většiny ostatních parazitů, což přispívá k rozvoji rezistence u dikrocelií.

Mezi nejčastěji používané látky při léčbě dikroceliózy patří benzimidazolové deriváty, především albendazol. Jejich neracionální užívání vedlo v mnoha zemích k rozšíření rezistence u cílových druhů parazitů. K tomu, aby bylo možné se s tímto problémem vypořádat, je nutné nejprve poznat mechanismus navození rezistence a procesy, které s tím souvisí. V této souvislosti jsou zkoumány také biotransformační enzymy, které do určité míry chrání parazity před toxickými účinky antihelmintik. U některých druhů helmintů již byla popsána biotransformace albendazolu, je znám i obecně předpokládaný mechanismus vzniku rezistence. U *D. dendriticum* však zatím podobné studie chybí, není známo, zda a jakým způsobem dochází k metabolizaci albendazolu a jeho hlavního metabolitu albendazolsulfoxidu, ani vztah biotransformace těchto látek k rozvoji rezistence. Klíčovou úlohu zde může mít schopnost přeměnit účinnou látku na neaktivní produkty (albendazolsulfon), případně její aktivní transport z těla parazita.

Předložená diplomová práce se zaměřuje na popis biotransformace albendazolu a jeho metabolitů – albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu, včetně chirální analýzy produktů a transportu těchto látek přes kutikulu parazita. Klade si za cíl nejen dokázat (případně vyvrátit) oxidativní

metabolismus u *D. dendriticum*, ale pokusit se výsledky vyhodnotit i v kontextu rozvoje rezistence parazita na podání benzimidazolových antihelmintik.

2 Teoretická část

2.1 Biotransformace xenobiotik

Látky, se kterými se organismus setkává během života mohou být rozděleny do dvou základních skupin: eobiotika a xenobiotika. Mezi eobiotika se řadí látky, které slouží jako zdroj energie, základní stavební kameny makromolekul, vitamíny a další nezbytné složky potravy. Xenobiotika jsou látky, které jsou organismům cizí a nemají výše zmíněné funkce (Testa B., 1995). Mezi nejčastější xenobiotika patří léčiva. Organismus se s jejich přítomností většinou vyrovnává biotransformací, změnou jejich chemické struktury pomocí enzymů (Kvasničková E., 1995). Cílem je přitom usnadnění eliminace látky z organismu. Vzniklé metabolity mohou být inaktivní nebo méně aktivní než mateřská molekula. V některých případech však dochází metabolickou přeměnou k aktivaci, zvýšení toxicity či změně účinku. (Katzung B. G., 1994).

Biotransformace probíhá zpravidla ve dvou fázích. V první dochází k odkrytí hydrofilních skupin nebo zavedení polárních substituentů, jako například hydroxylové skupiny, karboxylové skupiny, aminoskupiny. Těchto reakcí se účastní enzymy hydrolytické, redukční a oxidační. Ve druhé fázi je molekula konjugována se sloučeninou nízké molekulové hmotnosti. Může se jednat o aminokyselinu, cukr, glutathion, anorganické ionty (fosfát, sulfát) nebo organické ionty (propionát, acetát) (Barret J., 1997). Vzniklé konjugáty jsou v pH prostředí organismu disociovány, nemohou se proto resorbovat a jsou vyloučeny (Kvasničková E., 1995).

Pokud xenobiotikum obsahuje ve své struktuře skupiny schopné konjugace, může podstoupit přímo druhou fázi biotransformace. A naopak, je-li již po první fázi molekula dostatečně hydrofilní, xenobiotikum je vyloučeno bez konjugace s endogenní látkou. Někdy je rozlišována i třetí fáze biotransformace, která zahrnuje transport xenobiotik, jejich metabolitů a konjugátů (Duchon J., 1995).

2.1.1 Specifika metabolismu u helmintů

Obecné principy biotransformace jsou shodné pro nižší i vyšší živočichy. Po absorpci může být xenobiotikum enzymaticky zpracováno, jak je popsáno výše. Může být také exkretováno v nezměněné podobě nebo modifikováno neenzymatickými procesy. To může nastat například vlivem vysokého či nízkého pH v trávicím traktu (Barrett J., 1997).

2.1.1.1 Fáze I

2.1.1.1.1 Cytochromy P450

U obratlovců a hmyzu jsou podstatou první fáze biotransformace reakce oxidační, zejména ty, které jsou katalyzovány cytochromem P450 (Barrett J., 1997). Cytochromy P450 jsou ubikvitní hemoproteiny, řadí se mezi mikrosomální monooxygenasy. Jsou schopny katalyzovat i některé redukční reakce. Při monooxygenasové reakci získávají elektrony z NADPH prostřednictvím NADPH cytochrom P450 reduktázy nebo z NADH prostřednictvím cytochromu b5 (Mansuy D., 1998). Zvýšená metabolická aktivita CYP450 bývá hlavní příčinou rezistence na insekticidy u hmyzu. Nicméně pokusy dokázat přítomnost monooxygenas u parazitických helmintů byly doposud neúspěšné. Bylo u nich však prokázáno široké spektrum hydrolas (včetně O- a N-deacetylas) a enzymových systémů schopných redukce aldehydů, ketonů. Byly zjištěny i azoreduktasy a nitroreduktasy (Barrett J., 1997).

Enzymatické preparáty získané z různých druhů tříd *Cestoda* a *Nematoda* nebyly schopné oxidovat modelové substráty, které jsou běžně metabolizované cytochromem P450 (Barrett J., 1997). Určitá aktivita P-450 však byla zjištěna u larválních stádií nematod (Robinson W. M. et al., 2004). Neúspěšné byly pokusy detekovat monooxygenasu spektrofotometricky mimo jiné u druhů *Moniezia expansa*, *Haemonchus contortus* a *Ascaris lumbricoides*.

Expozice helmintů induktorům (20-methylcholantren, fenobarbital)

rovněž nepřinesla pozitivní výsledky. Detoxifikace cestou oxidativního metabolismu u helmintů tedy nebyla prokázána, nicméně přítomnost cytochromu P450 v malé míře nemůže být zcela vyloučena vzhledem k relativní nízké senzitivitě použitých metod. Naproti tomu u parazitických prvoků byl již cytochrom P450 zjištěn u rodů *Trypanosoma* a *Plasmodium* (Barrett J., 1997).

Nízká monooxygenasová aktivita cytochromu P450 byla zaznamenána u *Trichostrongylus colubriformis* a *Turbatrix aceti*, stejně jako u volně žijících larev *H. polygyrus*. Je možné, že tato aktivita souvisí spíše než s detoxifikací se syntetickými reakcemi, například se syntézou feromonů či leukotrienů. Lze předpokládat, že některé z oxidačních reakcí fáze I, jsou katalyzovány peroxidasami. (Barrett J., 1997).

Schopnost vyrovnávat se s nároky prostředí je u helmintů vzhledem k absenci CYP450 velmi limitována. Jsou do značné míry závislí na detoxifikačních enzimech svého hostitele, přestože častým následkem parazitární infekce bývá snížení aktivity těchto enzymů (Barrett J., 1997).

2.1.1.1.2 Obrana před oxidačním stresem

Nepřítomnost monooxygenasy P450 zřejmě koreluje s anaerobní nebo mikroaerobní povahou přirozeného prostředí parazitů, ačkoli parazitující helminti vykazují některé oxidativní reakce, například konverzi prolinu na hydroxyprolin. Další příčinou absence CYP450 může být potřeba omezit peroxidaci lipidů membrán. Ve srovnání s jinými organismy mají helminti vysoké procento nenasycených mastných kyselin v membránových lipidech a cytochrom P450 je významným zdrojem superoxidových aniontů (Barrett J., 1997). Kromě endogenních oxidantů jsou parazité vystaveni oxidativnímu stresu buněk hostitelského organismu. Novější výzkumy ukazují, že *Platyhelminthes* jsou schopni se s těmito nároky vyrovnávat (Salinas G., 2004).

U *Fasciola hepatica* dosud nebyla změřena žádná katalasová aktivita, což vyvolává otázku, jak u tohoto organismu probíhá metabolismus peroxidu

vodíku (Jefferies J. R., 2001). Brophy et al. (1995) soudí, že nadbytek peroxidu vodíku může znamenat pro parazita výhodu. Pronikání peroxidu do okolní hostitelské tkáně může fungovat jako obranný mechanismus, přičemž parazit je schopen bránit se oxidativnímu stresu cytochrom c oxidasou.

Salazar-Calderón (2000) uvádí, že funkci katalas zde přejímají další enzymy. Při prvním kroku, kterého se účastní superoxiddismutasa, vzniká ze superoxidu molekulární kyslík a peroxid vodíku. Ten je dále metabolizován prostřednictvím peroxiredoxinu (=thioredoxin peroxidasa) a thioredoxinu. Obě tyto bílkoviny již byly u *Fasciola hepatica* popsány. Jejich funkcí je mimo jiné chránit buňku před oxidativním stresem (Salazar-Calderón M., 2000). Spolu s dalším v přírodě hojně zastoupeným redoxním činidlem glutathionem se také účastní přeměny thiolu na disulfid. U *Platyhelminthes* byl popsán spřažený systém thioredoxin-glutathion, kde redukční ekvivalenty předává thioredoxin glutathion reductasa (TGR). Na rozdíl od savců se u ploštěnců pravděpodobně nevyskytuje thioredoxin reductasa ani glutathion reductasa. Zřejmý nedostatek dalších enzymů, které by byly schopny dodávat redukční ekvivalenty, činí z TGR potencionální farmakologický cíl. Selektivní inhibice tohoto enzymu by vedla k poškození syntézy DNA a protioxidační obrany (Salina G., 2004).

2.1.1.2 Fáze II

Reakce fáze II dávají vznik metabolitům, které jsou více rozpustné ve vodě než parentní sloučenina a mohou být proto vyloučeny z organismu (Robinson M. W., 2003). Ve srovnání se savčím hostitelem se metabolismus fáze II jeví podobně limitovaný jako u fáze I. Helminté zřejmě nejsou schopni konjugovat fenoly a karboxylové kyseliny s glycinem nebo glukoronovou kyselinou, tak jako tomu je u obratlovců. Byla u nich však prokázána schopnost N-acetylace při deaktivaci biogenních aminů a konjugace s glukózou, sulfáty či fosfáty v metabolismu ekdysteroidů. Bioaktivní peptidy jsou inaktivovány aminopeptidasami, endopeptidasami a deamidásami.

Dalším důležitým enzymem helmintů je rhodanasa, která katalyzuje konjugaci kyanidu a sulfidu s thiosulfátem, čímž snižuje jejich toxicitu (Barrett J., 1997).

2.1.1.2.1 Glutathion-S-transferasa

Základní reakcí metabolismu fáze II je konjugace s glutathionem, která je katalyzována glutathion-S-transferasou (GST) (Barrett J., 1997). Tyto proteiny se vyskytují v širokém spektru organismů od bakterií po savce, včetně většiny rostlin. Tvoří hlavní rodinu detoxifikačních enzymů. Jedná se o dimery molekulové hmotnosti přibližně 52kDa (Rossjohn J. et al., 1997). Každý monomer má vazebné místo pro glutathion (G-site) a pro vodík (H-site). U ploštěnců byly všechny izolované isoenzymy homodimery, u hlístic byly identifikovány i heterodimery (Barrett J., 1997). V závislosti na substrátové specifitě a primární struktuře byly rozděleny do šesti skupin: alfa, **mí**, pí, théta, sigma a kappa (Rossjohn J. et al., 1997). Toto dělení bylo vytvořeno na základě znalosti savčích enzymů. Enzymy hlístů však nezapadají zcela do tohoto schématu. U *F. hepatica* bylo zatím rozpoznáno 8 isoenzymů. Zatímco u savců je přibližně deset procent GST isoenzymů mikrosomálních, u helmintů jsou zřejmě všechny isoenzymy lokalizovány v cytoplazmě (Barrett J., 1997).

Nejvyšší hodnoty GST aktivity byla naměřeny u tříd *Cestoda* a *Trematoda*, nižší u *Nematoda*. Aktivita u gastrointestinálních parazitů je vyšší než u parazitů krevních či tkáňových. To může souviset s cytoplazmatickým tegument, který činí *Cestoda* a *Trematoda* citlivější na přítomnost xenobiotik a sekundárních metabolitů v gastrointestinálním traktu hostitele (Barrett J., 1997).

U *F. hepatica* byla objevena souvislost zvýšené GST aktivity s rezistencí na salicylanilid, obdobně jako u rezistencí na thiabendazol a cambendazol u *H. contortus* (Robinson M. W., 2003).

2.1.1.2.2 Glyoxylasa

Dalším glutathion dependentním detoxifikačním mechanismem je cesta glyoxylasy, která zahrnuje dva enzymy - glyoxylasu I a II katalyzující rozklad 2-oxoaldehydů. U hlístic se vyskytují oba enzymy, u tasemnic a motolic chybí glyoxylasa I. Zatím není zřejmé, co to znamená pro detoxifikační schopnosti parazita (Barrett J., 1997).

2.1.1.3 Fáze III

Do fáze III bývá řazen transport a exkrece, případně sekvestrace. Výsledným produktem fáze II jsou především konjugáty s glutathionem, které u savců mohou podléhat další metabolizaci jednou z mnoha cest, například na kyselinu merkapturovou. U parazitických helmintů však chybí důkaz metabolizace konjugátů na další deriváty. Pokusy změřit aktivity enzymů katalyzující tyto reakce vedla jen k nízkým hodnotám u jednoho z nich – cystein konjugát β -lyasy (Barrett J., 1997).

2.1.1.3.1 Transport

Konjugáty s glutathionem jsou tedy exkretovány v nezměněné podobě a to prostřednictvím pumpy o základních charakteristikách shodných s membránovým přenašečem u savců. Zvýšení počtu tegumentálních transportních míst může být jedním z mechanismů zahrnutých ve vývoji lékové rezistence (Barrett J., 1997).

2.1.1.3.2 Sekvestrace

Alternativou metabolismu a následného transportu může být sekvestrace. V buňkách dochází k sekvestraci prostřednictvím proteinů specificky vázících toxické sloučeniny. U nematod byly nalezeny metalothioneiny, bílkoviny vázící toxické kovy (Pb, Zn, Cd). V savcích i parazitárních buňkách se nalézají dvě hlavní skupiny proteinů vázící xenobiotika: ligandiny Y a Z. Ligandiny Y jsou v podstatě GSH-transferasy schopné vázat řadu neutrálních i nabitých sloučenin

a těžké kovy. Ligandiny Z jsou nízkomolekulární bílkoviny vážící mimo jiné mastné kyseliny, steroly, nepolární organické sloučeniny (hem, bilirubin). Nová třída těchto proteinů, která je schopná vázat mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, steroidy a řadu antihelmintik (nikoliv však benzimidazoly, ivermektin a prazikvantel), byla objevena v *M. expansa*. Tyto bílkoviny mají kromě detoxifikační funkce i funkci transportní, usnadňují například přesun antihelmintika na specifické místo uvnitř parazitární buňky (Barrett J., 1997).

2.2 Rezistence na antihelmintika

2.2.1.1 Definice

Rezistenci parazitů vůči antihelmintikům lze definovat jako dědičnou změnu ve schopnosti jednotlivých parazitů přežít terapii doporučenou dávkou antihelmintika. Původně citlivá populace se opakovaným podáváním léčiva mění na rezistentní, tedy schopnou odolávat působení terapie (Hunt K. R., Taylor M. A., 1989).

Použití výše zmíněné definice je vázáno na dvě podmínky. První je znalost citlivosti u původní populace parazitů, což nebývá vždy splněno. Druhá znamená nutnost rozlišení mezi sníženou citlivostí na léčivo způsobené rezistencí a vnitřní fluktuací senzitivity zapříčiněnou: rozdílným stádiem vývojového cyklu, rozdílným pohlavím, různými geomorfologickými variantami druhu či rozdílným hostitelem u jednoho druhu parazita (Sangster N. C., Gill J., 1999).

Boční rezistence znamená situaci, kdy parazité rezistentní k jednomu antihelmintiku určité chemické třídy zároveň jeví rezistenci k dalším látkám téže skupiny. Vyskytuje se například u benzimidazolů, imidothiazolů a avermektinů.

O zkřížené rezistenci mluvíme v případě, kdy je parazit rezistentní na antihelmintika z různých chemických skupin. Vyskytuje se například mezi imidothiazoly a organofosfáty (Sangster N.C., 1998).

2.2.1.2 Vznik

Biochemický a genetický podklad vzniku rezistence na antihelmintika ještě není zcela vysvětlen. Jedná se o komplexní proces, jehož mechanismus se liší nejen mezi druhy helmintů, ale dokonce i mezi jednotlivými izoláty. Hlavním mechanismem, kterým parazité získávají rezistenci, je pravděpodobně ztráta nebo snížení počtu receptorů pro léčivo v jeho cílovém místě. Znalost mechanismu účinku antihelmintika a rozvoje rezistence může být využita při hledání cest k překonání parazitární rezistence nebo při vývoji nových léčiv (Kohler P., 2001).

V podstatě lze říci, že čím více jsou helmintózy pod farmaceutickým dohledem, tím vyšší je pravděpodobnost vzniku rezistence. Je to proto, že léčba vede k přežívání odolných jedinců, kteří ve vhodných podmínkách předávají geny zodpovědné za rezistenci další generaci. Časem se zvyšuje koncentrace těchto genů v populaci. Rezistence se pravděpodobně dědí podle zákonů klasické Mendelovy genetiky (Sangster N.C., 1998).

Je pravděpodobné, že geny pro rezistenci se vyskytují u mnoha populací helmintů ještě před vznikem rezistence. Mohou vzniknout procesem náhodné mutace. Výzkumy ukazují, že zpočátku se rezistence vyvíjí pomalu a potom vzroste k maximálním hodnotám relativně rychle. To je způsobeno tím, že po počátečním objevením genů pro rezistenci následuje jejich akumulace až po určitou hranici, kdy selže léčba. V první fázi rozvoje, kdy ještě nedošlo k selhání terapie, lze někdy rezistenci rozpoznat pouze laboratorními testy. K tomu může dojít u druhů, které jsou k antihelmintiku citlivější než cílový druh a kde jsou léčiva podávána v dávkách nad 99% účinností pro tyto cílové druhy (Sangster N.C., 1998).

2.2.1.3 Rozšíření

Rezistence se v dnešní době proměnila z kuriozity na důležitý ekonomický problém v mnoha živočišných výrobcích a začíná se týkat i lidských parazitů (Sangster N.C., Gill J., 1999).

Prvním parazitem, u kterého byl zjištěn výskyt rezistence, byl nematod *Haemonchus contortus*. Rezistence k thiabendazolu, zástupci skupiny benzimidazolů, byla poprvé zaznamenána roku 1961 v USA. V Evropě se první zprávy o snížené účinnosti benzimidazolových antihelmintik objevily začátkem osmdesátých let.

Rezistence způsobuje nejzávažnější problémy v oblastech, kde klimatické a epizootologické podmínky vyžadují častou aplikaci antihelmintik (Drudge J. H. a kol., 1964). Frekvence podávání antihelmintik je přitom jedním z nejdůležitějších faktorů rozvoje rezistence (Prichard R., 1994).

Rezistence se již objevila u mnoha živočišných druhů včetně člověka, zahrnuje několik kmenů helmintů a pokrývá všechny hlavní chemické skupiny antihelmintik (Sangster N. C., Gill J., 1999). Přestože je obtížné přesně určit rozšíření rezistence, trend jasně směřuje k zvyšování počtu zasažených chovů i počtu zemí. Přesto stále existují určité druhy parazitů a třídy antihelmintik, u kterých se rezistence ještě nevyskytla nebo je neobvyklá. Příkladem je rezistence na avermektin/milbemycin u *Trichostrongylus colubriformis* nebo na levamisol u *Haemonchus contortus* (Sangster N.C., 1998).

Situaci komplikuje obtížné studium mechanismu vzniku rezistence. Různá stadia parazitů musí být často studována *in vitro*, kde je náročné zajistit vhodné podmínky pro jejich dlouhodobé přežití. Částečně lze problém vyřešit studiem volně žijících vývojových stádií, jejich metabolismus však často není zcela totožný s biotransformací dospělců. Hledání rozdílů mezi rezistentními a citlivými jedinci může objasnit ty momenty v interakci léčiva s organismem, které jsou pro vznik rezistence klíčové. Výzkum v této oblasti pomůže najít cestu, jak používat antihelmintika takovým způsobem, aby se šíření tohoto fenoménu zastavilo či alespoň zpomalilo (Sangster N.C., Gill J., 1999).

2.2.1.4 Reverze

Rezistentní izoláty mají mírný sklon revertovat k původní citlivosti. Protichůdná selekce, jako je použití chemicky odlišného léčiva, může snížit frekvenci výskytu genů pro rezistenci. Nicméně alely stále zůstávají v populaci

a protože proti určitým chemickým strukturám znamenají silnou selekční výhodu, pak v případě léčby antihelmintikem dané skupiny jejich frekvence opět prudce vzroste (Sangster N. C., 1998).

2.2.1.5 Prevence

Souhrn opatření proti rezistenci vůči antihelmintikům se soustředí zejména na prevenci. Až na druhém místě jsou pokusy o zvládnutí již rozvinutého stavu. Při studiu možností prevence rezistence je nezbytné charakterizovat faktory, které působí při jejím vzniku a šíření. Těmito faktory jsou především: podávání nedostatečné dávky léčiva, vysoká frekvence dehelmintizace, kontinuální používání jednoho typu antihelmintika a přesuny zvířat nakažených rezistentními nematody (Čorba J. a kol., 2001).

Nejdůležitějším opatřením, které zpomaluje vývoj rezistence je snížení frekvence používání antihelmintik. Toho lze docílit načasováním léčby tak, aby byla v souladu s enviromentálními vlivy, které regulují rozšíření parazitů v přírodě. Úspěšnost tohoto schématu je obtížně měřitelná, protože původní rozšíření rezistence je většinou neznámé a další faktory, jako například počasí, nejsou konstantní. Tento postup zřejmě nezastaví rozvoj rezistence, ale může být efektivní v prodloužení doby účinnosti některých skupin antihelmintik (Sangster N. C., 1998).

Nejsnadněji se selekce uplatňuje při účinnosti léčiva 90-99,99%. Vyvarování se tomuto intervalu by mělo přinést výsledky. Vyšší účinnost znamená v podstatě úplné vymýcení populace a tak i rezistentních genů. Snížená účinnost pak představuje redukci selekčního tlaku (Sangster N.C., 1998).

Jednou z možností, jak zvýšit procento účinnosti nad hranici 99,99% a tak i potlačit vývoj rezistentních kmenů je používat kombinace antihelmintik. Například kombinace benzimidazolů s levamisolem byla v některých oblastech (Austrálie, Nový Zéland) dlouho používaná, avšak ani tento postup rozvoji rezistence nezabránil (Waller P. J., 1994).

Z matematických modelů populací hlístů vyplývá, že dlouhodobě působící antihelmintika způsobují vyšší selekční tlak než léčiva s krátkodobým účinkem. Eliminační poločas zřejmě nemá takový vliv, ačkoli pro upřesnění těchto vztahů jsou nezbytné další studie (Sangster N.C., 1998).

I přes širokou škálu antihelmintik používaných v prevenci a regulaci nálezů přežvýkavců a přes množství kontrolních programů zavedených do velkochovů stále chybí účinné opatření, které by šíření rezistence zastavilo. Jádrem problémů souvisejících s léčbou antihelmintiky je podle J. Williamse dlouhotrvající koncepce rozšířená v živočišné produkci, podle které stačí k obraně proti parazitům a jejich účinkům na hostitelský organismus používání antihelmintik. Spolu s rozvojem rezistence tento postup přináší znepokojení v oblasti environmentální toxicity, tkáňových reziduí a nadměrných finančních investic do vývoje nových protiparazitárních léčiv. Pokroky byly učiněny ve výzkumu alternativních metod ochrany před helminty, například použití vakcín, selekce odolných chovných kusů, regulátory růstu nematod (Williams J. C., 1997).

2.2.1.6 Rezistence na benzimidazoly

Spoléhání na benzimidazolová antihelmintika (BZ) od doby jejich zavedení v šedesátých letech minulého století při kontrole gastrointestinálních parazitů u přežvýkavců vedlo k rozšíření BZ rezistence u cílových druhů parazitů. Benzimidazoly se při svém působení v buňce parazita váží na β -tubulin, hlavní protein mikrotubulů. Ačkoli tubulin je přítomen jak u hostitele, tak parazita, BZ vykazují relativně nízkou toxicitu pro savčí buňky. Selektivita těchto léčiv může být vysvětlena mnohem vyšší afinitou BZ k parazitárnímu tubulinu než k tubulinu hostitelských buněk. Tento rozdíl v afinitě odráží značně nízkou rychlost disociace BZ z vazby na parazitární tubulin (Lacey E., Gill J. H., 1994).

Rezistence na benzimidazoly u nematod je spojena s jedinou záměnou aminokyseliny (fenylalanin za tyrosin) v pozici 200 v molekule β -tubulinu (Robinson M. W. et al., 2002). Tato substituce je způsobena poškozením genu

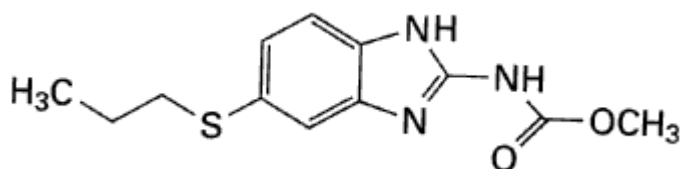
pro β -tubulin, což sníží nebo zruší schopnost benzimidazolů vázat se na tubulin těchto organismů (Prichard R., 1994). U *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Ostertragia circumcincta* je prokázána bodová mutace v β -tubulin izotyp 1 genu a postupná delece několika izotypů (Sangster N. C., 1998). Tato znalost může být využita k syntéze DNA sond pro detekci rezistence/citlivosti na benzimidazoly u jednotlivých organismů (Prichard R., 1994).

Dílčí kroky vzniku rezistence se mohou objevit v průběhu několika generací a umožňují tak její rychlý rozvoj. Další změny mohou zahrnovat dodatečné mutace a delece v alelách izotypu 2 (Sangster N. C., 1998).

Na rozdíl od situace u nematod nebyly u kmenů *Fasciola hepatica* rezistentních na triklabendazol zjištěny mutace genu pro β -tubulin. Musí zde tedy existovat jiný mechanismus rezistence, přičemž jednou z možností je zvýšený metabolismus antihelmintik (Robinson M. W. et al., 2003).

2.3 Albendazol

Albendazol (ABZ) se spolu s dalšími léčivými (fenbendazol, oxfenbendazol, thiabendazol, triclabendazol) řadí mezi benzimidazolová antihelmintika. Jeho chemický název je methyl-5-(propylthio)1H-benzimidazol-2-ylkarbamát, souhrnný vzorec $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, relativní molekulová hmotnost je 265,34. Jeho strukturní vzorec:



2.3.1.1 Vlastnosti

Jedná se o bílý až lehce nažedlý prášek, který je dobře rozpustný v dimethylsulfoxidu, silných kyselinách a silných bázích. Je těžce rozpustný

v methanolu, chloroformu, ethyl acetátu, acetonitrilu a prakticky nerozpustný ve vodě (<http://us.gsk.com>).

2.3.1.2 Použití

Albendazol je jedním z nejdůležitějších benzimidazolových derivátů, používaný v humánní i veterinární praxi. Je účinný proti plicním i gastrointestinálním parazitům (Redondo P. A. et al., 1999). Jeho nízká toxicita, vysoká účinnost a široké spektrum účinku vedly k jeho značnému rozšíření především v prevenci a terapii helmintóz savců (Velík J. et al., 2005).

2.3.1.3 Účinnost

Vlastní účinnou látkou je metabolit albendazolu, albendazolsulfoxid (ABZSO), známý též pod názvem ricobendazol. Je zodpovědný za antihelmintickou aktivitu stejně jako za potencionální embryotoxicitu u některých živočišných druhů (Velík J. et al., 2003). Antiparazitární účinnost albendazolu nezáleží pouze na jeho afinitě k parazitárnímu β -tubulinu, předpokládaném mechanismu účinku (viz výše), ale také na jeho schopnosti dosahovat vysokých a stálých koncentrací v tkáni napadené parazity. To závisí střídavě na jeho farmakokinetice, metabolismu a distribuci v hostitelském organismu (Alvarez L. I., 2000).

2.3.1.4 Farmakokinetika a metabolismus

Albendazol lze podat perorálně, intraruminálně nebo parenterálně. Jeho farmakokinetika je druhově specifická a je ovlivněna řadou dalších faktorů, jako je pohlaví, strava a přidružené choroby. Po vstřebání do systémového oběhu je albendazol distribuován do jaterní tkáně, kde je mikrosomálními enzymy oxidován na albendazolsulfoxid.

2.3.1.5 Albendazolsulfoxid

ABZSO je hlavním metabolitem a je zodpovědný za antihelmintický účinek. Rozsáhlý first-pass metabolismus v játrech vede k absenci parentní látky (ABZ) v plazmě. Sulfoxidace je rychlý, reverzibilní proces, ve kterém je

rovnováha ustanovena ve prospěch ABZSO. Enzymové systémy účastníci se této přeměny jsou dva: flavinmonooxygenázový (FMO) a cytochromy P450 (u potkanů především CYP3A) (Velík J. et al., 2003, 2005). Oba tyto mikrosomální systémy se podle studií provedených na mikrosomech jaterních buněk potkana na sulfoxidaci podílí přibližně stejnou měrou (Redondo P. A., 1999).

2.3.1.5.1 Farmakodynamika a farmakokinetika enantiomerů ABZSO

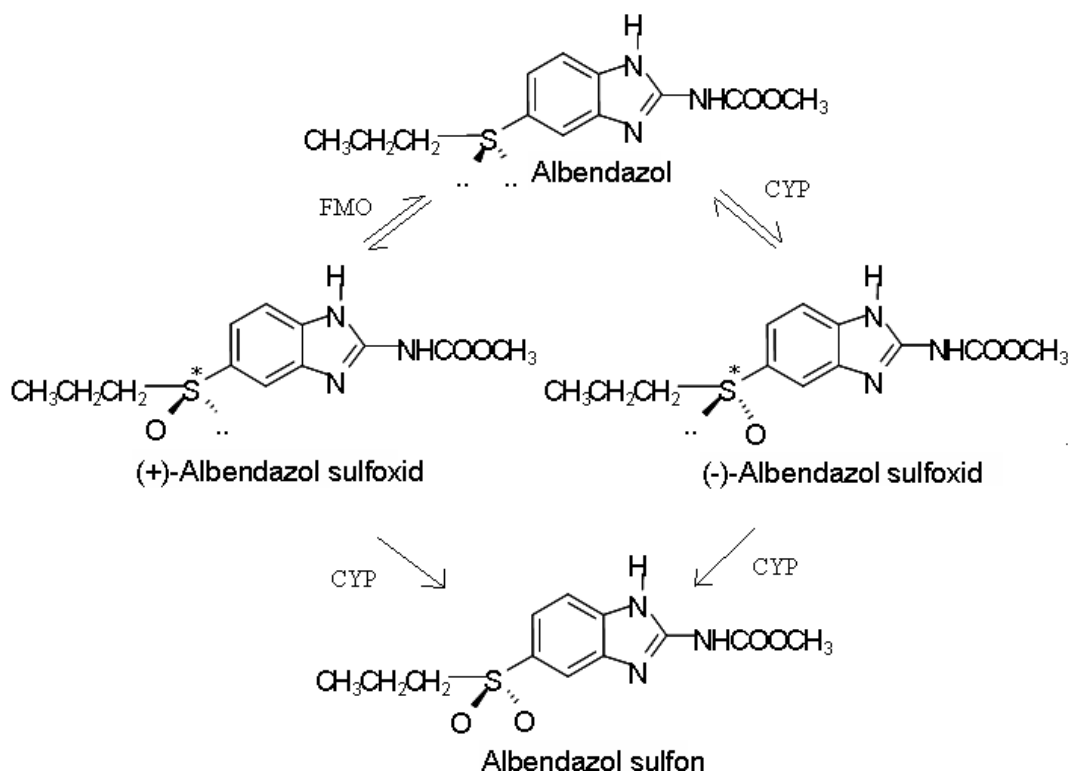
Molekula albendazolsulfoxidu má chirální centrum. Vznikají oba enantiomery, přičemž je známo, že (-)-ABZSO je produkován systémem CYP450, zatímco syntéza (+)-ABZSO podléhá FMO systému (Velík J. et al. 2003, 2005; Redondo P. A., 1999).

ABZSO byl prokázán jako aktivní metabolit, ale farmakodynamika jednotlivých enantiomerů ještě není zcela objasněna. Významnější komponentou v protiparazitární aktivitě je zřejmě (+)-ABZSO, což vyplývá z rozdílů ve schopnosti difúze do buněk parazita, afinitě k tubulinu a metabolismu u helmintů. Bylo zjištěno, že vazba enantiomerů ABZSO na parazitární β -tubulin je enantioselektivní, na rozdíl od vazby na tubulin savčích buněk (Velík J. et al., 2003, 2005).

Charakteristika farmakokinetiky enantiomerů souvisí s účinností léčiva. Při podání ABZ byl počáteční podíl (+)/(-)-ABZ v plazmě v čase T_0 nižší než po 24 hodinách. Poměr v T_0 byl u člověka roven 1 (racemická směs), zatímco u ovcí 3 a u skotu 4. V T_{24} se podíl zvýšil u člověka na 13, u ovcí na 9 a u skotu na 24. Tyto rozdíly jsou způsobeny stereospecifickou sulfoxidací a odlišnou plazmatickou clearance obou antipodů (Velík J. et al., 2003). U muflona byl poměr v průběhu 24 hodin téměř konstantní (2,8-3,8) (Velík J. et al., 2003).

2.3.1.6 Albendazolsulfon

ABZSO podléhá druhému oxidativnímu kroku, který je pomalejší a ireverzibilní. Vzniká při něm albendazolsulfon (ABZSOO), který je farmakodynamicky neaktivní. Tento proces je na rozdíl od oxidace ABZ na ABZSO katalyzován pouze CYP (u potkanů CYP1A).



Obr. 1: Schéma metabolismu ABZ

2.4 Dikrocelióza

2.4.1.1 Charakteristika

Dikrocelióza je helmintóza způsobena motolicí *Dicrocoelium dendriticum* (syn. *Dicrocoelium lanceolatum*, *Dicrocoelidae*, *Trematoda*, *Platyhelminthes*, *Scolecida*). Dikrocelióza se řadí do skupiny šesti hlavích a ekonomicky nejnáročnějších helmintóz ovcí a skotu. Parazituje v žlučovodech a žlučnicích domácích i divokých přežvýkavců (ovcí, koz, skotu, srnčí zvěře, muflonů, velbloudů). Příležitostně napadá další živočišné druhy, jako například králíky, prasata, psi, koně a ve výjimečných případech i člověka (Otranto D., 2002).

2.4.1.2 Rozšíření

Dikrocelióza je rozšířena celosvětově v nížinách i v oblastech horských pastvin všude tam, kde jsou vhodné podmínky pro přežití a vývoj určitých druhů suchozemských plžů a mravenců. Parazit infikuje domestikovaná i divoká zvířata. Nákaza se běžně vyskytuje v Evropě, Asii, Severní Africe a Americe. Podle údajů z roku 1999 se dikrocelióza zatím neobjevila v Austrálii. V jižní Africe se vyskytuje jiný původce nemoci - *Dicrocoelium hospes*. V České republice se vyskytuje v oblastech pastvin (střední a jižní Čechy, severní Morava). Chroust (1999) ohodnotil prevalenci dikroceliózy u muflonů na 0-89%, u kamzíků na 0-11%, u srnčí zvěře na 0-12%. Prevalence na Slovensku (centrální a východní část) kolísá od 8 do 54% (Ducháček L., Lamka J., 2003).

2.4.1.2.1 Faktory

Hlavními faktory, které ovlivňují rozšíření dikroceliózy jsou:

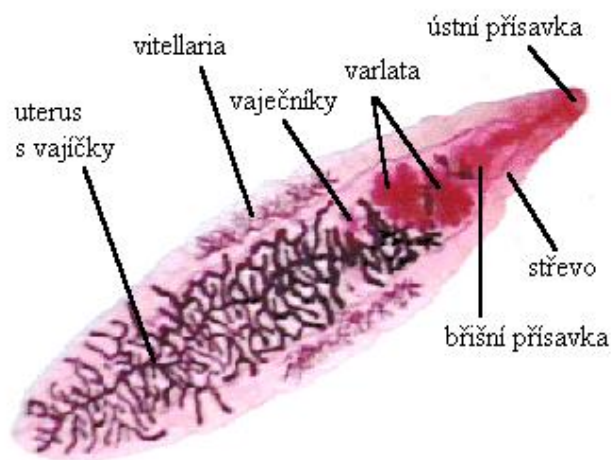
- místní enviromentální a ekologické podmínky - pH půdy (příznivější pro výskyt *D. dendriticum* jsou vápenité, alkalické půdy), roční období
- přítomnost a etologie mezihostitelů
- přítomnost a charakteristiky definitivního hostitele - stres, věk, pohlaví (samice skotu jsou nakaženy ve vyšším procentu, což lze vysvětlit jejich častější volnou pastvou oproti volům a chovným býkům) (Otranto D., 2002).

2.4.1.3 Motolice kopinatá a její biologický cyklus

2.4.1.3.1 Morfologie

D. dendriticum (motolice kopinatá) dorůstá délky 8-14mm a šířky 2-3mm. Tělo je dorsoventrálně zploštělé, poloprůsvitné, pouhým okem lze rozpoznat tmavý uterus, bílá vitellaria (Otranto D., 2002). Motolice kopinatá má dvě přísavky, jednu na břišní stěně a druhou na konci těla - v jejím centru je umístěn ústní otvor (Buchar J. et al., 1995). Ten pokračuje ektodermálním

hltanem, dále úzkým jícnem, který ústí v slepě zakončené entodermální střevo. Tělo je kryté tuhou kutikulou (bez obrveného epitelu), která má ochrannou funkci (Dogel V. A., 1947). Vajíčka jsou zbarvena tmavohnědě, jsou oválného tvaru, velikosti 35-45 μ m x 22-30 μ m (Otranto D., 2002). Obsahují první vývojové stádium - miracidium, obrvennou larvu (Dogel V. A., 1947). Vykazují vysokou odolnost vůči vysokým a nízkým teplotám i suchu, mohou přezimovat a přežít na pastvině nejméně 10-12 měsíců (Ducháček L., Lamka J., 2003).



Obr. 2: Morfologie motolice kopinaté

2.4.1.3.2 Biologický cyklus

Díky své komplexnosti byl životní cyklus *D. dendriticum* vysvětlen teprve po více než sto letech po prvním morfologickém popisu parazita (Rudolphi, 1819). Cyklus trvá přibližně 6 měsíců a je nepřímý. Zahrnuje dva meziphostitele a jednoho definitivního hostitele.

Primárním hostitelem je suchozemský plž, který pozřel vajíčka. Zatím je známo 99 druhů plžů účastnících se tohoto cyklu. V plžích se z vajíček líhnou miracidia, která se přeměňují v první a druhou generaci sporocyst. Tato asexuální fáze trvá 3-4 měsíce. Z druhé generace sporocyst vznikají cercárie, které v době zralosti migrují z hepatopankreatu do plicních kavít. Odtud jsou ve

slizových koulích exkretovány. Celkem je vyloučeno až 5000 cercárií, kolem 400 v jedné kouli velikosti přibližně 2mm (Ducháček L., Lamka J., 2003).

Druhým mezihostitelem je mravenec (*Formica spp.*), který spolknul cercárie. Ty se v těle mravence encystují a během 1-2 měsíců se vyvinou v metacercárie. V jednom mravenci jich může být až 100. (Ducháček L., Lamka J., 2003). Jedna nebo dvě metacercárie mohou být přítomny v subesofageálním ganglionu mravence, kde při nízkých teplotách (pod 15°C) vyvolají kataleptickou křeč. Mravenec zůstává ochromený na vrcholcích rostlin, kde snadněji dojde k jeho spasení přežvýkavcem. Toto chování mravenců pravděpodobně navazuje na pradávne mechanismy některých blanokřídlých, předchůdců mravenců, kteří spali stejným způsobem jako nakažení mravenci. Zajímavý je i fakt, že cercárie lokalizovaná v subesofageálním ganglionu se obětuje pro přežití a rozmnožení ostatních cercárií, čili se chová jako altruista (Otranto D., 2002).

V definitivním hostiteli se metacercárie uvolní z mravence působením duodenálních enzymů. Migrují žlučovody do jater, kde dospívají a rozmnožují se (hermafroditismus). Vajíčka se uvolňují do okolí spolu s faeces (Otranto D., 2002). Jedno vajíčko může dát teoreticky vznik až 400 000 dospělcům (Ducháček L., Lamka J., 2003).



Obr. 3: Vajíčko motolice kopinaté

2.4.1.4 Patogeneze a klinické symptomy

Ve srovnání s fasciolózou má dikrocelióza mírnější příznaky. Mladé motolice migrují přímo žlučovody, aniž by přitom vážněji poškodily játra či stěnu střeva (na rozdíl od *Fasciola hepatica*, která stěnu střeva a jaterní parenchym penetruje). Někdy se ani při těžké infekci nemusí dikrocelióza manifestovat. Hlavní jaterní léze jsou zjistitelné až při nekropsii. Zvíře postižené dikroceliózou může trpět anémií, edémem, vyhublostí. V pokročilejších stádiích (až tisíce jedinců *D. dendriticum*) se připojí cirhóza, zjizvení jater, rozšíření žlučvodů (Otranto D., 2002).

Změny jsou způsobeny nejen mechanickým drážděním, ale i produkty metabolismu motolic. K poškození jater dochází zejména oxidativním stresem. Zhoršení jaterních funkcí se stupňuje se zvýšením počtu přítomných dikrocelií v rozmezí 0-300. V počtu 301-600 byl zaznamenán útlum v progresi poškození, možná díky reakci hostitelského organismu (Ducháček L., Lamka J., 2003).

Přestože symptomy dikroceliózy bývají mírné a k úhynu dochází jen zřídka, způsobuje tato parazitóza vlivem poškození jater hostitelů vážné ekonomické ztráty, a to především v produkci mléka a masa (Otranto D., 2002).

2.4.1.5 Imunogeneze

V definitivním hostiteli mohou parazité perzistovat až šest let a imunitní systém není schopen infekci regulovat a snížit počet dikrocelií v populaci. Mezi hladinou protilátek a intenzitou infekce zřejmě není žádná korelace. Přestože imunologická odpověď a množství protilátek tedy neznamena vyšší obranu před dikroceliózou, detekce těchto protilátek je důležitá pro imunodiagnostiku. (Ducháček L., Lamka J., 2003).

2.4.1.6 Profylaxe

Regulace rozšíření dikroceliózy byla vždy složitá a neuspokojivá vlivem komplexnosti životního cyklu a epidemiologie. Je založena na hospodářských opatřeních, například vyvarování se pastev brzy zrána nebo pozdě večer (kdy je riziko nakažení mravenci vyšší) a na kontrole mezihostitelů. Může být

zhodnocena situace v souvislosti s alkalinitou půdy, která je vhodná pro šíření *D. dendriticum* (Otranto D., 2002).

2.4.1.6.1 Metody kontroly meziphostitelů

Většina postupů umožňující regulaci výskytu primárního a sekundárního meziphostitele je proveditelná pouze v malých oblastech, jejich využití brání zejména vysoké náklady.

Použití kalciumkyanamidu, moluscicidu a chemického hnojiva je omezena ekologickými i finančními faktory.

Další možností je chov krůt, drůbeže, kachen nebo hus na malých pastvinách (kolem 50 ptáků na hektar), které by se živily mravenci a plži.

Na malých pastvinách se nabízí i alternativa prevence kontaktu dobytka s mravenci, kteří pod vlivem metacerkárie zůstávají zachyceni na vrcholcích trávy do vzdálenosti 30-50cm od báze mraveniště. Kruhová zábrana z větví kolem této oblasti může zabránit většině nákaz infikovaným mravencem.

V praxi se setkáváme především s profylaktickým podáváním antihelmintik všem jedincům vystaveným možnosti nákazy volnou pastvou (Otranto D., 2002).

2.4.1.7 Léčba a prevence antihelmintiky

2.4.1.7.1 Benzimidazoly

Nejrozšířenějšími antihelmintiky jsou benzimidazolové deriváty (albendazol, triclabendazol, fenbendazol, mebendazol, cambendazol, thiabendazol). Jsou širokospektré a dobře tolerované. Proti *D. dendriticum* musí být použity ve vyšších dávkách než proti jiným motolicím, tasemnicím a plicním či gastrointestinálním hlísticím (Otranto D., 2002). Je to způsobeno lokalizací dikrocélií v tenkých žlučovodech, proto bylo i u antihelmintik jiné chemické skupiny upraveno dávkování zvýšením jednotlivé dávky i frekvence jejího podání.

Albendazol, podávaný v dávce 15-20mg/kg, způsobí průměrné snížení populace hepatálních parazitů o 98,2% při perorálním podání a o 99,6% při

intraruminálním podání. Dávka 10mg/kg per os redukuje nákazu o 92,22%. Někteří autoři doporučují podat dvě dávky 7,5mg/kg v patnáctidenním intervalu.

U ovcí byla testována i účinnost intraruminálních kapslí s postupným uvolňováním. Léčená zvířata měla po 10 týdnů po podání kapslí negativní koprologický test. Proti gastrointestinálním nematodám byl index účinnosti 96,2-99,2%, proti *D. dendriticum* byl pouze 88,5%. Bylo pozorováno zvýšení produkce mléka i vlny.

Pro produkci masa a mléka je nutné určitou dobu vysadit podávání ABZ, nejen vzhledem k bezpečnosti těchto produktů pro člověka, ale je třeba vzít do úvahy i riziko rozvoje rezistence (Otranto D., 2002).

Fenbendazol se užívá v jednotlivé dávce (150mg/kg) nebo opakovaně pod dobu pěti dnů (25mg/kg). Někdy je pro zvýšení účinnosti kombinován s triclabendazolem.

Dalšími užívanými antihelmintiky jsou: thiabendazol (200mg/kg), mebendazol (80mg/kg), cambendazol (25mg/kg) (Ducháček L., Lamka J., 2003).

Luxabendazol je při zvýšené dávce (12,5mg/kg dvakrát v intervalu jednoho týdne) také vhodným léčivem.

Další benzimidazolový derivát, triclabendazol, se proti dikrocelióze jeví jako neúčinný i přes svou efektivnost vůči *F. hepatica*.

2.4.1.7.2 Další antihelmintika

Thiofanát (50mg/kg) se řadí do skupiny tzv. pro-benzimidazolů. Vykazuje velmi dobrou účinnost, zejména u ovcí. Může být podávána i kombinace thiofanátu a brotianidu (Otranto D., 2002).

S úspěchem je používán i netobimin v dávce 20mg/kg, prazikvantel (50mg/kg), diamfenetid (240-300mg/kg). Nedostatečně účinnou látkou je v testované dávce klosantel (5mg/kg i.m.), oxyklozanid (15 mg/kg) (Ducháček L., Lamka J., 2003).

2.4.1.7.3 Strategie léčby

V souvislosti s epidemiologií *D. dendriticum* a jeho mezipřenositelů je v chovech doporučeno podání antihelmintik dvakrát až třikrát za rok: na začátku jara a na podzim před ustájením. Takto stanovená prevence/léčba by měla být doprovázena koprologickou diagnózou a ohodnocením živočišné produkce vztažené na pastvu a krmení (Otranto D., 2002).

V současné době není k dispozici žádná vakcína proti dikrocelióze, přestože již byla popsána protilátková odpověď.

3 Cíl

Cílem diplomové práce bylo:

- 1) Zjistit, zda parazit motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) biotransformuje antihelmintikum albendazol a jeho biologicky aktivní metabolit albendazolsulfoxid.
- 2) Stanovit závislost tvorby metabolitů na čase a koncentraci substrátu při inkubaci intaktních motolic v kultivačním mediu (*in vivo*).
- 3) Určit jakou měrou se při inkubaci *in vitro* podílí jednotlivé subcelulární frakce homogenátu motolic na biotransformaci substrátů a stanovit stereospecifitu sulfoxidace ABZ v jednotlivých frakcích.
- 4) Zjistit závislost metabolismu albendazolu na koncentraci substrátu a stanovit kinetické parametry oxidace ABZ.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

- inkubátor Eppendorf Thermomixer komfort
- inkubátor Heraeus Hera cell
- hlubokomrazicí box Ultra-low freezer So-low
- centrifuga Eppendorf 5415D
- ultrazvukový homogenizátor Sono puls
- ultrazvuková lázeň Tesla UC 005 AJ 1
- třepačka Velp. Scientifica
- předvážky OWA Labor
- předvážky Kern KB
- analytické váhy Scaltec SBC 22
- digitální pH metr Thermo Orion model 410A
- skleněný homogenizátor podle Pottera a Elvehjema s teflonovým pístem
- centrifuga Heraeus Biofuge Stratos
- centrifuga Beckman Coulter, Avanti J-301
- vakuový koncentrátor RWO 64 mikrotechna
- čtečka Biorad (BCA)
- spektrofotometr Spectronic Unicam Heliosβ
- HPLC: vysokotlaká pumpa Spectra series P 200, automatický dávkovač Hewlett Packard HP 1100, zařízení pro temperování kolon, kolona Discovery C/8150x4,6mm; AGP 150x3mm, kolektor, fluorescenční detektor 290/320nm, počítač vybavený chromatografickým softwarem firmy Data Apex CSW (verze 1.7)

4.1.2 Chemikálie

- standard ABZ, Sigma
- standard ABZSO, ABZSOO, dar prof. Lanusse, Argentina
- RPMI médium 1640 (s obsahem 20mM HEPES a L-glutaminem), kat.číslo R7388, Sigma
- NADPH, Sigma
- dimethylsulfoxid, Fluka
- hydrogenuhličitan sodný, Lachema Neratovice
- chlorid sodný, Lachema Neratovice
- chlorid draselný, Lachema Neratovice
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, Penta Chrudim
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, Penta Chrudim
- acetonitril, Sigma–Aldrich for HPLC
- octan amonný, Merck Říčany
- kyselina octová, Sigma
- isopropylalkohol, Sigma
- roztok A (NaHCO₃, Na₂CO₃, bicinchoninic acid v 0,1M NaOH)
- roztok B (4% CuSO₄· 6H₂O)
- roztok hovězího sérového albuminu (BSA) 1%, Sigma

4.1.3 Biologický materiál

Živé dospělé motolice *Dicrocoelium dendriticum* byly získány ze žlučovodů jater tří muflonů s prokázanou dikroceliózou. Motolice byly vymyty z jaterních řezů teplým fyziologickým roztokem a opakovaně promyty sterilním pufrům PBS pH 7,4 s přídavkem antibiotik.

Část motolic byla přenesena do plastové sterilní nádobky, zvážena a zamrazena ve hlubokomrazícím boxu na -80°C. Později se z těchto motolic získávaly subcelulární frakce pro *in vitro* pokusy.

Druhá část motolic byla promyta sterilním kultivačním médiem a ihned využita k experimentům *in vivo*.

4.2 Metody

4.2.1 Příprava pufrů a médií

4.2.1.1 Pufr PBS

Tento pufr byl připraven přidáním 8,0g chloridu sodného a 0,2g chloridu draselného do 1,0 litru 0,1M sodnodraselnofosfátového pufru (2,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,4g KH_2PO_4 v 1000ml roztoku). Po té bylo pH upraveno na 7,4 a k 500,0ml vzniklého roztoku se přidalo 5,0ml zásobního roztoku penicilinu a streptomycinu (koncentrace 30mg penicilinu a 5mg streptomycinu na 5ml redestilované vody).

4.2.1.2 Kultivační medium

Kultivační médium bylo připraveno smísením 500,0ml RPMI média (s obsahem 20mM HEPES a L-glutaminem) s 1,0g hydrogenuhličitanu sodného a s 5,0ml roztoku penicilinu a streptomycinu (koncentrace 30mg penicilinu a 5mg streptomycinu v 5ml redestilované vody).

4.2.1.3 Fosfátový pufr

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

4.2.1.4 Zásobní roztok NADPH

Roztok pro byl připraven rozpuštěním navážky NADPH 3,36mg ve 2,8ml redestilované vody. Koncentrace zásobního roztoku NADPH pak byla 1500 μM .

Při stanovení kinetických parametrů oxidace ABZ byl rovněž použit roztok NADPH o koncentraci 1500 μ M. Navážka 7,610mg NADPH byla rozpuštěna v 6,088ml redestilované vody.

4.2.1.5 Roztoky ABZ a ABZSO

4.2.1.5.1 Roztoky k experimentům *in vivo*

Při inkubacích *in vivo* byl nejprve připraven zásobní roztok ABZ. Navážka 5,30mg byla rozpuštěna v 1,00ml dimethylsulfoxidu (DMSO). Vznikl roztok o koncentraci 19,98mM. 10 μ l zásobního roztoku ABZ bylo smíseno s 9,99ml média (výsledný roztok měl koncentraci 19,98 μ M) a dalších 20 μ l zásobního roztoku s 9,98ml média (vznikl roztok o koncentraci 39,95 μ M).

Zásobní roztok ABZSO pro inkubaci *in vivo* byl připraven rozpuštěním 2,81mg v 1,00ml DMSO. Z tohoto roztoku o koncentraci 9,99mM bylo

1. odebráno 10 μ M a zředěno 9,99ml média (vznikl roztok o koncentraci 9,99 μ M)
2. odebráno 20 μ M a zředěno 9,98ml média (vznikl roztok o koncentraci 19,98 μ M)
3. odebráno 30 μ M a zředěno 9,97ml média (vznikl roztok o koncentraci 29,97 μ M).

4.2.1.5.2 Roztoky k experimentům *in vitro*

K inkubacím *in vitro* byl použit roztok ABZ o koncentraci 150 μ M. Pro jeho přípravu bylo nejprve rozpuštěna navážka ABZ 5,95mg v 1,55ml DMSO, vznikl tak roztok o koncentraci 15mM. 15 μ l tohoto roztoku pak bylo odebráno a smíseno s 1485 μ l redestilované vody.

Dále byl použit roztok ABZSO o koncentraci 150 μ M. Opět byl nejprve připraven roztok o koncentraci 15mM rozpuštěním navážky ABZSO 6,34mg v 1,56ml DMSO a následným zředěním 15 μ l tohoto roztoku vodou na 1,5ml.

4.2.1.5.3 Roztoky ke stanovení kinetických parametrů oxidace ABZ

Pro stanovení kinetických parametrů oxidace ABZ bylo potřeba 6 roztoků o koncentracích 4,5; 15; 45; 150; 450; 1500 μ M. Nejprve byl připraven zásobní roztok I o koncentraci 4,5mM. Navážka ABZ 1,53mg byla rozpuštěna v 1,280ml DMSO.

Rozpuštěním navážky 4,04mg ABZ v 1,015 μ M DMSO vznikl roztok II o koncentraci 15mM.

Smísením 5 μ l roztoku I s 5ml redestilované vody vznikl roztok 1 o koncentraci 4,495 μ M.

Roztok 2 o koncentraci 15 μ M byl získán smísením 5 μ l roztoku II s 5ml redestilované vody.

Roztok 3 o koncentraci 45 μ M byl připraven smísením 10 μ l roztoku I s 990 μ l redestilované vody.

Roztok 4 o koncentraci 150 μ M byl připraven smísením 10 μ l roztoku II s 990 μ l redestilované vody.

Roztok 5 o koncentraci 450 μ M byl připraven smísením 30 μ l roztoku II s 970 μ l redestilované vody.

Roztok 6 o koncentraci 1500 μ M vznikl smísením 100 μ l roztoku II s 500 μ l DMSO a 400 μ l redestilované vody.

4.2.1.6 Mobilní fáze

K přípravě mobilní fáze pro achirální HPLC analýzu byl použit 0,1M roztok octanu amonného připravený rozpuštěním 7,708g octanu amonného v 1000ml redestilované vody. Tento roztok byl následně upraven 99% kyselinou octovou na pH 4,7 a zfiltrován. 710ml tohoto roztoku bylo smíšeno s 290ml roztoku acetonitrilu a opět bylo upraveno pH na 4,7. Fáze byla nejprve vyzkoušena na standardu albendazolu a albendazolsulfoxidu, při vychýlení z retenčního času bylo přidáno 1 až 5ml acetonitrilu.

Pro přípravu mobilní fáze pro chirální HPLC analýzu byl použit roztok dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného 0,01M (navážka NaH₂PO₄·2H₂O 1,5616g, doplněno vodou do 1000ml) a roztok dodekahydrátu

hydrogenfosforečnanu sodného 0,01M (navážka $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,5848g, doplněno vodou do 1000ml). Tyto roztoky byly za stálého míchání a kontroly pH smíseny tak, aby výsledné pH bylo 6,9. Roztok byl zfiltrován. K jednomu litru vzniklého pufru byly přidány 2ml isopropylalkoholu.

4.2.2 Příprava subcelulárních frakcí

Zamražené motolice byly stejným dílem po 3g rozváženy do tří kádinek umístěných v ledové lázni. Ke každému dílu bylo přidáno 12ml 0,1M Na-fosfátového pufru a byl homogenizován 20s za snížené teploty ve skleněném homogenizátoru rotujícím pístem Sono puls.

Získaný homogenát byl dále po dobu 20s zpracováván na centrifuze Heraeus při 5000g. Supernatant byl slit a na téže centrifuze byl stočen 60 minut při 20000g. Supernatant z druhého točení byl po té centrifugován 1 hodinu 105000g v centrifuze Beckman. Po tomto (třetím) točení byl získaný supernatant slit do kádinky a rozpipetován po 1,1ml do 32 mikrokumavek. Tato první získaná frakce by při stáčení homogenizovaných jater odpovídala frakci cytosolických bílkovin, dále je nazývána frakce 1.

Peleta z druhého točení byla resuspendována ve 3ml pufru a stáčena 1 hodinu při 20000g na centrifuze Heraeus. Při analogickém postupu při zpracovávání jater v tomto kroku dochází k sedimentaci mitochondrií. Získaná peleta, označená jako frakce 2, byla resuspendována v 1,95ml glycerolového pufru a rozpipetována do plastových mikrokumavek po 1,1ml.

Peleta ze třetího točení byla zředěna 5ml fosfátového pufru, resuspendována a zpracována na centrifuze Beckman při 105000g 1hod. Peleta získaná z tohoto točení byla po smísení s 6ml 20% glycerolového pufru rozpipetována do plastových mikrokumavek po 0,33ml. Tato frakce odpovídá mikrosomům a dále je označována jako frakce 3.

4.2.3 BCA stanovení bílkoviny

Ke stanovení bílkovin ve vzorcích zpracovaného biologického materiálu byly použity naředěné roztoky jednotlivých frakcí a roztok C, který vznikl

smícháním roztoku A (NaHCO_3 , Na_2CO_3 , bicinchoninic acid v 0,1M NaOH) a roztoku B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Bílkovinná frakce byla rozdělena na dva díly a oba byly 10x naředěny destilovanou vodou. Z každého ředění od každé frakce bylo do jamek pipetováno čtyřikrát po 10 μl , k tomu přidáno 200 μl roztoku C. Celkem tedy 8 paralelních vzorků od každé frakce. Slepé vzorky obsahovaly místo bílkoviny 10 μl destilované vody.

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

Tab. 1: Rozpis pro přípravu vzorků k sestrojení kalibrační křivky

	Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Množství pipetovaného roztoku 1% BSA [μl]	Množství pipetované destilované vody [μl]
1	0,0	0,0	500,0
2	200,0	10,0	490,0
3	400,0	20,0	480,0
4	600,0	30,0	470,0
5	800,0	40,0	460,0
6	1000,0	50,0	450,0

Vzorky na destičce byly promíchány a inkubovány 30 min při 37°C. Na čtečce Biorad byla změřena absorbance při 562nm proti destilované vodě. Od zjištěných hodnot byly odečteny průměry slepých vzorků. Po sestrojení kalibrační křivky byly vypočteny koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích.

4.2.4 Experimenty *in vivo*

Do sterilních plastových mikrozkušavek s propíchnutým víčkem bylo rozpipetováno kultivační médium po 1ml. Pro testování metabolismu ABZ a ABZSO v intaktních motolicích bylo třeba motolice umístit po dvaceti kusech do těchto plastových mikrozkušavek s médiem. K tomu byla použita nejprve

lžička, ale tento způsob byl zdlouhavý a nepřesný. Při uchopování dikrocelií pinzetou byly sice odpočítány přesně, ale mohlo dojít k jejich poškození. Nejspolehlivějším a přitom šetrným postupem se ukázalo být přenesení motolic automatickou pipetou, ačkoli se tak přeneslo i malé množství média.

4.2.4.1 Inkubace s ABZ a ABZSO

Po 20 hodinách bylo médium z plastových mikrozkušavek odsáto pipetou. Do tří mikrozkušavek byl přidán 1ml média s koncentrací albendazolu 20 μ M a do dalších tří 1ml média o koncentraci albendazolu 40 μ M. Dále bylo vždy do pěti mikrozkušavek přidáno médium s obsahem albendazolsulfoxidu 10, 20 a 30 μ M a zapsán čas přidání těchto roztoků. Po uplynutí určené doby inkubace (inkubace s ABZ: 0, 24, 48hod; inkubace s ABZSO: 0, 2, 4, 8, 24hod) bylo odebráno 700 μ l média do čistých označených mikrozkušavek. Motolice byly třikrát propláchnuty pufrem a pipetou byl zbytek roztoku odsát co nejvíce do sucha. Mikrozkušavky se daly hloubkově zamrazit.

4.2.4.2 Extrakce

Do mikrozkušavek se 700 μ l media bylo přidáno 420 μ l acetonitrilu (ACN). Po 5 minutách na třepačce byly stáčeny 5min při 10000rpm na centrifuze Eppendorf 5415D. Z takto zpracovaných vzorků bylo odebráno po 1000 μ l do vialek pro HPLC analýzu.

Mikrozkušavky s obsahem motolic byly doplněny 200 μ l fosfátového pufru pH 7,4. Byly sonifikovány na zařízení Sono puls po dobu 10s. Po přidání 300 μ l ACN probíhala 5 minut sonifikace v ultrazvukové lázni. Dále byly mikrozkušavky protřepány (5min) a stočeny na centrifuze Eppendorf 5415D při 10000rpm/ 5min. Po té bylo odebráno 500 μ l vzorku do vialek, které byly následně analyzovány.

4.2.4.3 HPLC analýza vzorků

Cílem bylo zjistit koncentrace albendazolu, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu ve vzorcích získaných výše popsaným postupem. K HPLC

analýze byl využit již dříve zavedený postup (Velík, 2005). Měření probíhalo na koloně Discovery C/8150x4,6mm. Kolona byla uchovávána v methanolu, před začátkem měření byla promývána nejprve 10 minut methanolem, pak 30 minut vodou a nakonec mobilní fází. Po skončení měření byla promývána 30 minut vodou, pak methanolem a v něm uchována.

Rychlost průtoku kolonou byla nastavena na 1ml za minutu, tlak 13-17MPa, teplota 25°C, nástřik 50 μ l.

Byl použit fluorescenční detektor 290/320nm.

Vyhodnocení proběhlo podle kalibračních křivek Velíka. Retenční čas albendazolsulfoxidu byl 3 minuty, albendazolsulfonu 4 minuty, albendazolu 23,4 – 24,8 minut.

4.2.5 Experimenty *in vitro*

Pro experimenty *in vitro* byly použity předem připravené subcelulární frakce označené 1, 2, 3.

4.2.5.1 Inkubace s ABZ a ABZSO

4.2.5.1.1 Porovnání metabolismu ABZ a ABZSO v jednotlivých frakcích

Všechny tři frakce byly inkubovány s 50 μ M substráty albendazol a albendazolsulfoxid za přítomnosti redukčních ekvivalentů NADPH 500 μ M v prostředí fosfátového pufru pH 7,4. Byly provedeny vždy tři paralelní stanovení.

Inkubační směs obsahovala: 100 μ l biologického materiálu (frakce 1, 2 nebo 3), 100 μ l vodného roztoku NADPH o koncentraci 1500 μ M, 100 μ l roztoku ABZ nebo ABZSO 150 μ M.

Celkový objem inkubační směsi byl 300 μ l v každé mikrozkuhavce.

Byly provedeny i inkubace slepých vzorků. Bylo smíšeno 100 μ l biologického materiálu s 200 μ l pufru bez přítomnosti substrátu (od každé

frakce jedno stanovení). Dále byla připravena směs 100 μ l roztoku albendazolu nebo albendazol-S-oxidu (o koncentraci 150 μ M) se 100 μ l roztoku NADPH a 100 μ l pufru, tedy bez obsahu biologického materiálu (od obou substrátů tři paralelní stanovení).

Inkubace probíhala v otevřených plastových mikrozkušavkách 60 minut při teplotě 37°C. Čas začal být měřen po přidání biologického materiálu do směsi. Inkubace byla ukončena přidáním 500 μ l roztoku acetonitrilu.

4.2.5.1.2 Stanovení kinetických parametrů oxidace ABZ

Cílem experimentů bylo zjistit Michaelisovu konstantu a maximální rychlost enzymatické přeměny albendazolu. Bylo vybráno šest koncentrací substrátu, přičemž od každé koncentrace proběhly tři paralelní inkubace.

Do každé plastové mikrozkušavky bylo pipetováno 100 μ l roztoku NADPH o koncentraci 1500 μ M; dále 100 μ l roztoku ABZ o koncentraci 4,5; 15; 45; 150; 450 nebo 1500 μ M a nakonec 100 μ l frakce 2 nebo 3 (vzhledem k výsledkům z předchozích analýz nebyla provedena inkubace frakce 1). Výsledná koncentrace substrátu pak byla v jednotlivých inkubačních směsích 1,5; 5; 15; 50; 150 a 500 μ M.

Celkový objem inkubační směsi byl 300 μ l v každé mikrozkušavce.

Opět byly inkubovány i slepé vzorky. Při jejich přípravě byl biologický materiál nahrazen pufrům. Od každé koncentrace substrátu byl inkubován jeden slepý vzorek.

Inkubace byla ukončena přidáním 180 μ l roztoku acetonitrilu.

4.2.5.2 Příprava vzorku pro achirální HPLC stanovení

Plastové mikrozkušavky byly 3 minuty protřepávány na třepačce na stupni 5 a stáčeny při 10000 otáčkách 5 minut na centrifuze Eppendorf 5415D, aby došlo k sedimentaci frakcí. Ze svrchní vrstvy každé mikrozkušavky bylo odebráno 650 μ l vzorku do popsaných vialek pro HPLC stanovení.

4.2.5.3 HPLC analýza vzorků

Měření proběhlo metodou shodnou s postupem popsaným v kapitole *HPLC analýza vzorků* v oddíle *Experimenty in vivo*.

4.2.5.4 Příprava vzorku pro chirální HPLC stanovení

Při achirálním stanovení bylo mezi 3 a 4 minutou kolektorem z každého vzorku odebráno 50 μ l do připravených vialek. Na koncentrátoru byly tyto vzorky odpařeny do sucha, následovně rozpuštěny v 300 μ l mobilní fáze (viz níže). Vialka pak byla vložena na několik vteřin do ultrazvuku a promíchána. Pipetou byl celý objem přenesen do insertku, který byl vložen zpět do vialky.

4.2.5.5 Chirální HPLC analýza

Ke stanovení dle Velíka byla použita kolona AGP 150x3mm. Byla uchovávána v 15% isopropylalkoholu, kterým byla před použitím promývána. Následně byla promyta vodou, mobilní fází a po měření stejně v opačném pořadí.

Rychlost průtoku kolonou byla nastavena na 0,5ml/min, teplota na 25°C. Detektor byl použit fluorescenční 290/320nm.

Retenční časy byly pro levotočivý stereoizomer albendazol-S-oxidu 5,4 minuty, pro pravotočivý stereoisomer 13,4 minuty.

5 Výsledky

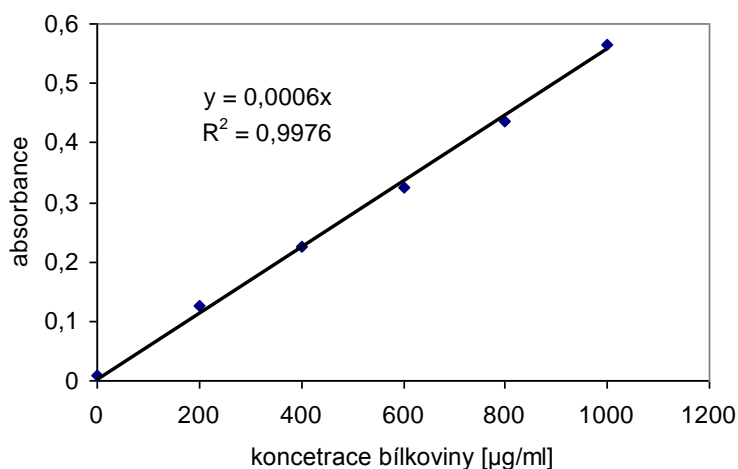
5.1 Stanovení bílkoviny

Kalibrační křivka byla sestrojena za využití roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbance (po odečtení průměru absorbancí slepých vzorků) odpovídající jednotlivým koncentracím bílkoviny BSA.

Tab. 2: Hodnoty absorbance pro jednotlivé koncentrace

koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	absorbance
0	0,008
200	0,126
400	0,226
600	0,326
800	0,436
1000	0,565

5.1.1.1 Kalibrační křivka



Obr.4: Kalibrační křivka

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

5.1.1.2 Slepé vzorky

Tab. 3: Hodnoty absorpance slepých vzorků

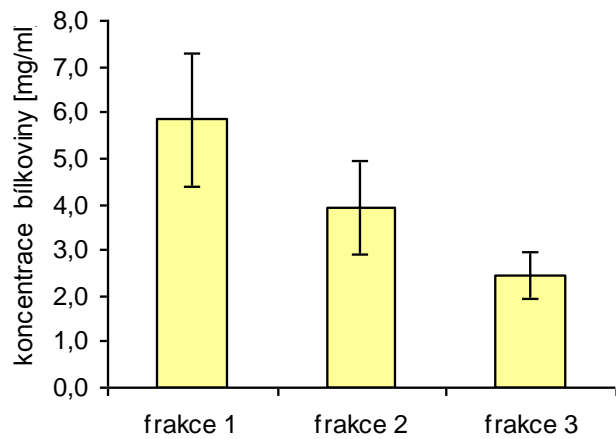
vzorek	absorbance
1	0,120
2	0,113
3	0,151
4	0,138
průměr	0,131

5.1.1.3 Frakce 1, 2, 3

V tabulce a grafu jsou uvedeny výsledné hodnoty koncentrace proteinů.

Tab. 4: Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích

	průměrná absorbance	koncentrace bílkoviny [mg/ml]
frakce 1	0,35 ± 0,09	5,84 ± 1,44
frakce 2	0,24 ± 0,06	3,93 ± 1,01
frakce 3	0,15 ± 0,03	2,43 ± 0,52



Obr. 5: Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích

Nejnižší koncentrace proteinů byla zjištěna ve frakci 3, naopak nejvyšší koncentraci proteinů měla frakce 1.

5.2 Metabolismus ABZ a ABZSO motolicí kopinatou *in vitro*

5.2.1 Metabolismus albendazolu 50 μM

Jednotlivé frakce homogenátu motolic byly inkubovány se substrátem (albendazol 50 μM) a koenzymem NADPH. Po skončení inkubace byly v extraktu inkubátů změřeny koncentrace albendazolu (ABZ) a jeho metabolitů – albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO). V tabulkách jsou uvedeny průměry koncentrací ze tří paralelních stanovení, z nich vypočtená specifická aktivita a jejich směrodatné odchylky. Vzorky, kde daný metabolit nebyl detekován, jsou označeny ND.

5.2.1.1 Frakce 1

Tab. 5: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 1

	koncentrace [μM]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	39,11 \pm 2,07	
ABZSO	ND	ND
ABZSOO	ND	ND

5.2.1.2 Frakce 2

Tab. 6: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 2

	koncentrace [μM]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	25,06 \pm 1,83	
ABZSO	0,81 \pm 0,33	3,43 \pm 1,40
ABZSOO	ND	ND

5.2.1.3 Frakce 3

Tab. 7: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 3

	koncentrace [μM]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	25,11 \pm 1,03	
ABZSO	0,12 \pm 0,02	0,85 \pm 0,15
ABZSOO	ND	ND

5.2.1.4 Slepý vzorek ABZ

Tabulka uvádí koncentrace albendazolu a jeho metabolitů po 60 minutách inkubace albendazolu 50 μM ve fosfátovém pufru bez frakcí. Albendazolsulfoxid nebyl ve vzorku zjištěn.

Tab. 8: Koncentrace ABZ a jeho metabolitů v SL ABZ 50 μM

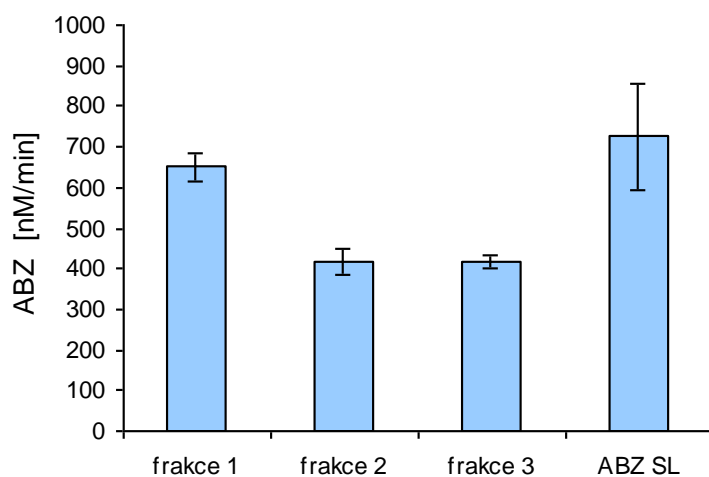
	koncentrace [μM]
ABZ	43,60 \pm 7,85
ABZSO	ND
ABZSOO	0,02 \pm 0,01

5.2.1.5 Frakce 1, 2, 3 bez substrátů

Po inkubaci jednotlivých frakcí bez substrátů 60 minut při teplotě 37°C nebyl detekován albendazol ani jeho metabolity.

5.2.1.6 Porovnání koncentrace nezreagovaného ABZ u jednotlivých frakcí

V grafu můžeme porovnat koncentraci zbylého albendazolu po šedesátiminutové inkubaci s 50 μ M ABZ v jednotlivých frakcích a ve slepém vzorku.

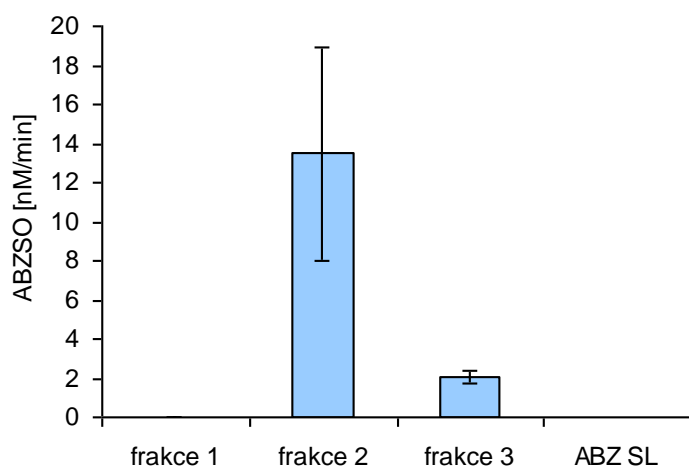


Obr.6: Porovnání koncentrace ABZ v jednotlivých frakcích a SL

Koncentrace ABZ je nejvyšší u slepého vzorku, nejnižší je u frakcí 2 a 3.

5.2.1.7 Porovnání koncentrace vzniklého albendazolsulfoxidu u jednotlivých frakcí

Zde vidíme vznik albendazolsulfoxidu po inkubaci 60 minut s ABZ 50 μ M.



Obr. 7: Porovnání koncentrace ABZSO v jednotlivých frakcích a SL

Ve frakci 1 a ve slepém vzorku nebyl metabolit detekován, ve frakci 2 je jeho koncentrace vyšší než ve frakci 3. Ve vzorcích s frakcemi nebyl detekován žádný albendazolsulfon.

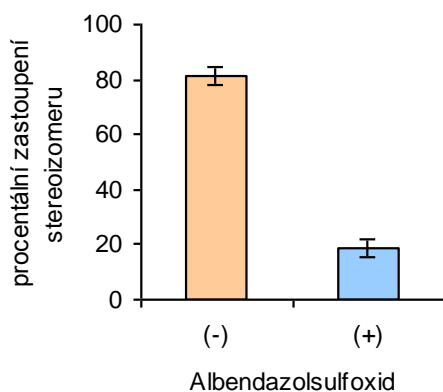
5.2.2 Stanovení stereospecifity sulfoxidace ABZ

Po inkubaci s albendazolem 50 μ M byl ve vzorku stanoven poměr mezi levotočivým (-) a pravotočivým (+) stereoizomerem albendazolsulfoxidu vzniklým při inkubaci. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty jednotlivých měření se směrodatnou odchylkou. Procentuální zastoupení obou stereoizomerů ve vzorcích je zaneseno v grafech.

5.2.2.1 Frakce 2

Tab. 9: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 2

	ABZSO	
	(-)	(+)
průměr %	81,1 \pm 3,2	18,9 \pm 3,2



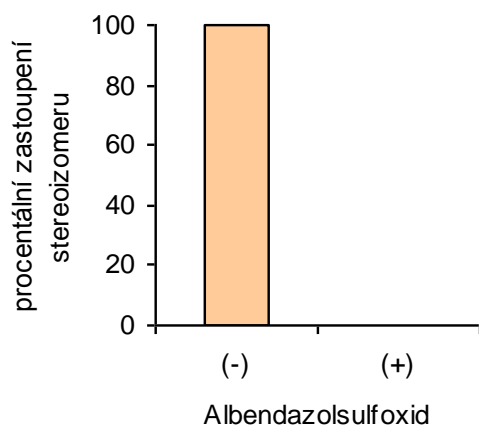
Obr. 8: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 2

Na grafickém znázornění vidíme poměr mezi levotočivým a pravotočivým izomerem po inkubaci albendazolu s frakcí 2. Vznikal převážně levotočivý stereoizomer.

5.2.2.2 Frakce 3

Tab. 9: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 3

	ABZSO	
	(-)	(+)
průměr %	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0



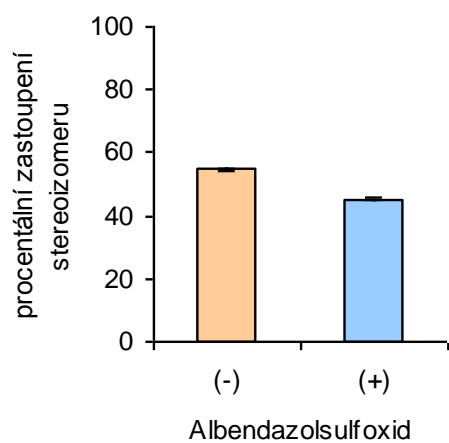
Obr. 9: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 3

Po inkubaci albendazolu s frakcí 3 vznikal pouze levotočivý stereoizomer.

5.2.2.3 ABZSO SL

Tab. 10: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve slepém vzorku

	ABZSO	
	(-)	(+)
průměr %	54,7 ± 0,4	45,3 ± 0,4



Obr. 10: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve slepém vzorku

Po inkubaci albendazolu bez frakcí je poměr mezi levotočivým a pravotočivým izomerem téměř vyrovnaný.

5.2.3 Metabolismus albendazolsulfoxidu

Byla provedena inkubace jednotlivých frakcí homogenátu motolic se substrátem (albendazol-S-oxid 50 μ M). V tabulkách jsou uvedeny průměry koncentrací a specifických aktivit ze tří paralelních stanovení

5.2.3.1 Frakce 1

Tab. 11: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 1

	koncentrace [μ M]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	0,38 \pm 0,04	1,09 \pm 0,12
ABZSO	27,57 \pm 0,20	
ABZSOO	0,18 \pm 0,00	0,52 \pm 0,00

5.2.3.2 Frakce 2

Tab. 12: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 2

	koncentrace [μ M]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	1,47 \pm 0,46	6,22 \pm 1,96
ABZSO	28,04 \pm 0,84	
ABZSOO	0,18 \pm 0,00	0,75 \pm 0,02

5.2.3.3 Frakce 3

Tab. 13: Koncentrace a specifické aktivity ve frakci 3

	koncentrace [μ M]	specifická aktivita [nM/(min.mg)]
ABZ	0,48 \pm 0,17	3,30 \pm 1,18
ABZSO	27,97 \pm 0,39	
ABZSOO	0,17 \pm 0,00	1,15 \pm 0,03

5.2.3.4 Slepý vzorek ABZSO

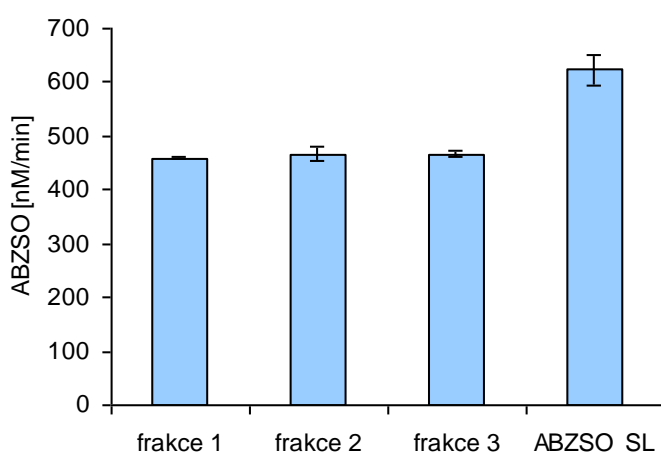
Tabulky uvádějí koncentrace albendazolu a jeho metabolitů po 60 minutové inkubaci albendazolsulfoxidu 50 μ M ve fosfátovém pufru bez frakcí.

Tab. 14: Koncentrace ABZ a jeho metabolitů v SL ABZSO 50 μ M

	koncentrace [μM]
ABZ	0,60 \pm 0,12
ABZSO	37,39 \pm 1,76
ABZSOO	0,32 \pm 0,01

5.2.3.5 Porovnání koncentrace nezreagovaného ABZSO u jednotlivých frakcí

Graf znázorňuje koncentraci ABZSO při inkubaci ABZSO s frakcemi a bez nich – ve slepém vzorku.

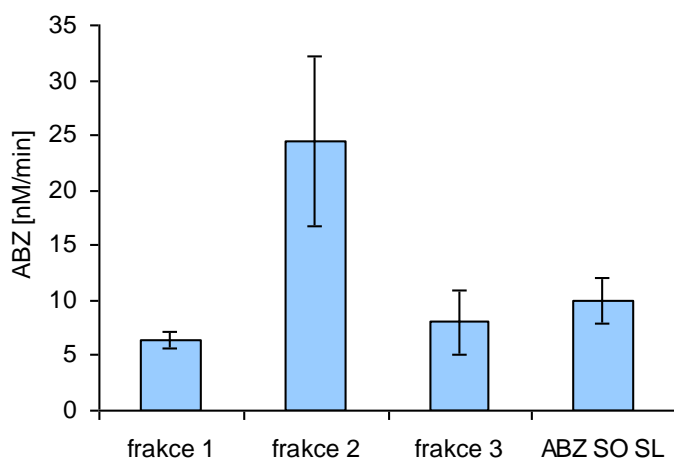


Obr. 11: Porovnání koncentrace ABZSO v jednotlivých frakcích a SL

Nejvyšší koncentrace ABZSO byla zjištěna ve slepém vzorku, koncentrace ABZSO ve frakcích je přibližně na stejné úrovni.

5.2.3.6 Porovnání koncentrací vzniklého albendazolu u jednotlivých frakcí:

V grafu jsou zaneseny změřené koncentrace albendazolu po inkubaci frakcí a slepého vzorku s albendazolsulfoxidem.

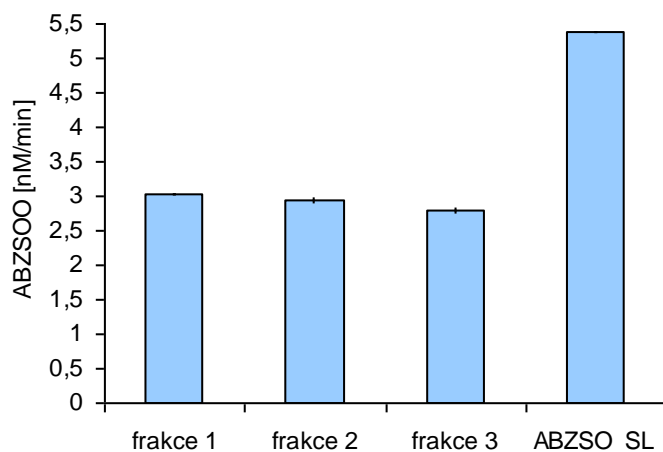


Obr. 12: Porovnání koncentrace ABZ v jednotlivých frakcích a SL

Nejvíce albendazolu vznikalo ve frakci 2, naopak nejméně ve frakci 1.

5.2.3.7 Porovnání koncentrace albendazolsulfonu u jednotlivých frakcí:

Graf znázorňuje rozdíly v koncentraci ABZSOO ve vzorcích s frakcemi a ve slepém vzorku.



Obr. 13: Porovnání koncentrace ABZSOO v jednotlivých frakcích a SL

Koncentrace albendazolsulfonu se od frakce 1 k frakci 3 mírně snižuje, největší množství ABZSOO bylo zjištěno ve slepém vzorku.

5.2.4 Sledování metabolismu ABZ v závislosti na koncentraci substrátu

Vzhledem k výsledkům z předchozí analýzy *in vitro* byla provedena inkubace frakcí 2 a 3 pouze se substrátem ABZ, a to v koncentracích 1,5; 5; 15; 50; 150; 500 μ M. Ve vzorcích byly měřeny koncentrace ABZ a ABZSO. Jsou uvedeny průměry ze tří paralelních stanovení, vypočtené specifické aktivity a jejich směrodatné odchylky.

5.2.4.1 Frakce 2

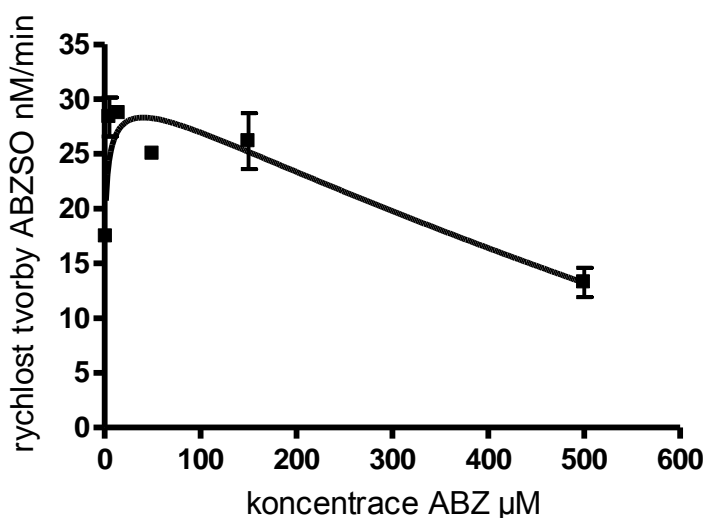
Tab. 15: Koncentrace ABZSO a specifická aktivita ve frakci 2

Substrát	konc. ABZSO [μ M]	spec. aktivita [nM/(min.mg)]
inkubace s ABZ 1,5μM	1,05 \pm 0,03	4,44 \pm 0,13
ABZ 5μM	1,70 \pm 0,18	7,22 \pm 0,78
ABZ 15μM	1,72 \pm 0,02	7,31 \pm 0,10
ABZ 50μM	1,50 \pm 0,02	6,37 \pm 0,09
ABZ 150μM	1,57 \pm 0,27	6,66 \pm 1,13
ABZ 500μM	0,74 \pm 0,05	3,12 \pm 0,19

Tab. 16: Koncentrace ABZ ve frakci 2

Substrát	konc. ABZ [μ M]
inkubace s ABZ 1,5μM	0,79 \pm 0,03
ABZ 5μM	1,59 \pm 0,20
ABZ 15μM	10,70 \pm 0,06
ABZ 50μM	48,41 \pm 0,43
ABZ 150μM	148,71 \pm 3,95
ABZ 500μM	543,28 \pm 5,97

5.2.4.2 Graf závislosti rychlosti tvorby metabolitu na koncentraci substrátu



Obr. 14: Závislost rychlosti vzniku ABZSO na koncentraci ABZ ve frakci 2

Zde je graficky znázorněna závislost rychlosti vzniku albendazolsulfoxidu na koncentraci albendazolu. Pomocí programu GraphPad Prism byla pro tuto přeměnu vypočtena Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlost V_{\max} :

$$K_m = 0,2650\mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 23,89\text{nM}/\text{min}$$

5.2.4.3 Frakce 3

Tabulky uvádí průměry ze tří paralelních stanovení ve frakci 3: koncentrace albendazolu a albendazolsulfoxidu, vypočtené specifické aktivity a směrodatné odchylky.

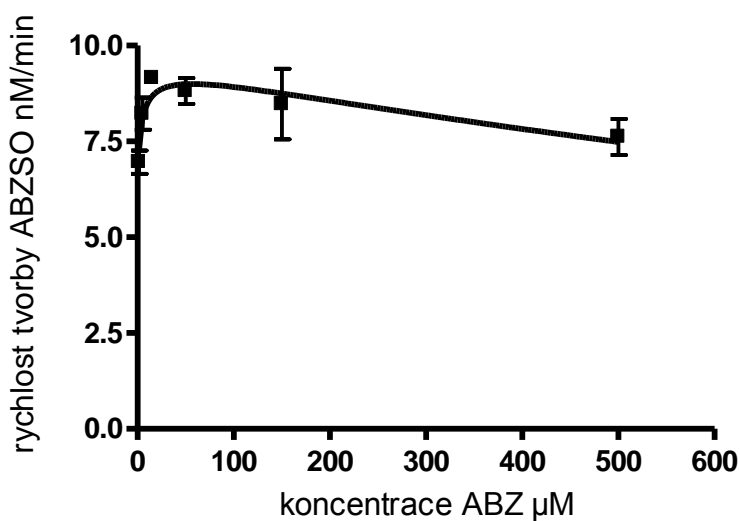
Tab. 17: Koncentrace ABZSO a specifická aktivita ve frakci 3

Substrát	konc. ABZSO [μM]	spec. aktivita [nM/(min.mg)]
inkubace s ABZ 1,5μM	0,42 \pm 0,03	2,87 \pm 0,22
ABZ 5μM	0,49 \pm 0,04	3,39 \pm 0,30
ABZ 15μM	0,55 \pm 0,01	3,77 \pm 0,08
ABZ 50μM	0,53 \pm 0,03	3,63 \pm 0,24
ABZ 150μM	0,51 \pm 0,10	3,49 \pm 0,66
ABZ 500μM	0,46 \pm 0,05	3,14 \pm 0,34

Tab. 18: Koncentrace ABZ ve frakci 3

Substrát	konc. ABZ [μM]
inkubace s ABZ 1,5μM	0,99 \pm 0,03
ABZ 5μM	2,19 \pm 0,17
ABZ 15μM	11,24 \pm 0,17
ABZ 50μM	50,09 \pm 0,86
ABZ 150μM	148,21 \pm 8,52
ABZ 500μM	523,27 \pm 9,76

5.2.4.4 Graf závislosti rychlosti tvorby metabolitu na koncentraci substrátu



Obr. 15: Závislost rychlosti vzniku ABZSO na koncentraci ABZ ve frakci 3

Graf znázorňuje závislost rychlosti vzniku albendazolsulfoxidu na koncentraci albendazolu ve frakci 3. Pro tuto přeměnu byla vypočtena Michaelisova konstanta a maximální rychlost:

$$K_m = 0,3043\mu\text{M}$$

$$V_{\text{max}} = 8,573\text{nM}/\text{min}$$

Michaelisova konstanta je u frakce 3 vyšší než u frakce 2, maximální rychlost je vyšší u frakce 2.

5.2.4.5 Slepé vzorky - inkubace ABZ bez frakcí

Při inkubaci albendazolu ve fosfátovém pufru bez frakcí nebyly ABZSO a ABZSOO ve vzorcích zjištěny. Tabulka uvádí změřené koncentrace albendazolu.

Tab. 19: Koncentrace ABZ ve SL ABZ

Substrát	koncentrace ABZ [μM]
ABZ 1,5μM	1,09
ABZ 5μM	1,75
ABZ 15μM	11,25
ABZ 50μM	47,69
ABZ 150μM	136,21
ABZ 500μM	518,07

5.2.5 Stanovení stereospecifity sulfoxidace ABZ

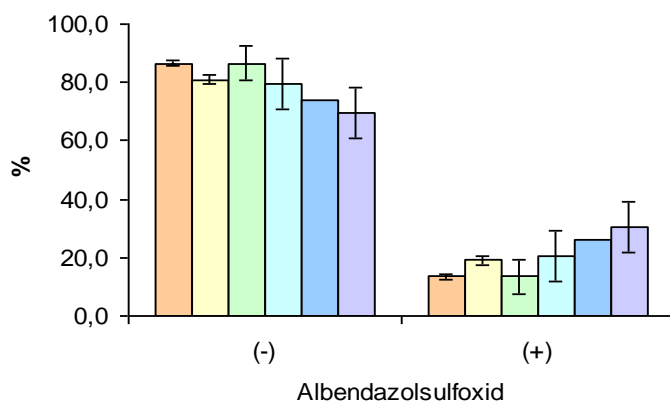
Po inkubaci frakce 2 a 3 s albendazolem rostoucí koncentrace byly odebrány vzorky pro stanovení poměrů mezi levotočivým (-) a pravotočivým (+) stereoizomerem albendazolsulfoxidu vzniklým při inkubaci.

5.2.5.1 Frakce 2

V tabulce jsou uvedeny výsledky při jednotlivých měřeních a z nich vypočtené průměrné hodnoty. Průměrné procentuální zastoupení obou stereoizomerů ve vzorcích je zaneseno i v grafech.

Tab. 20: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 2

frakce 2	ABZSO (%)	
	(-)	(+)
Inkubace s ABZ 1,5μM	86,5 \pm 0,8	13,5 \pm 0,8
ABZ 5μM	80,9 \pm 1,6	19,1 \pm 1,6
ABZ 15μM	86,6 \pm 5,8	13,4 \pm 5,8
ABZ 50μM	79,5 \pm 8,8	20,6 \pm 8,8
ABZ 150μM	73,7 \pm 0,0	26,3 \pm 0,0
ABZ 500μM	69,4 \pm 8,6	30,6 \pm 8,6



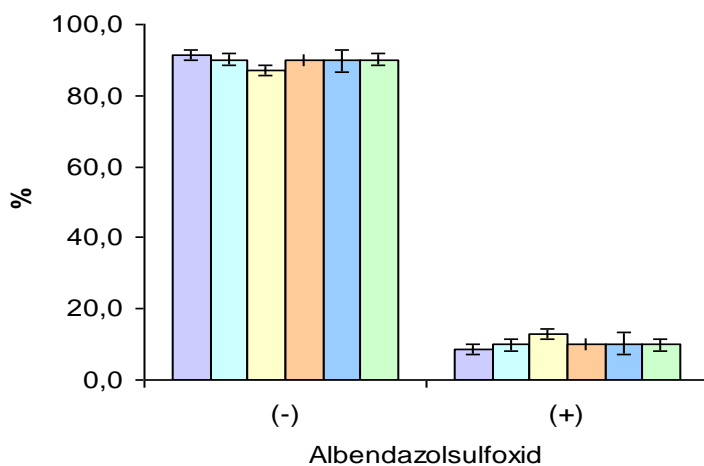
Obr. 16: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 2

Přesné zjištění zastoupení stereoizomerů ve frakci 2 nebylo možné, protože u některých vzorků nedošlo k dostatečnému oddělení píků. Z vyhodnotitelných záznamů bylo vypočteno celkové průměrné zastoupení levotočivého stereoizomeru 79,4% .

5.2.5.2 Frakce 3

Tab. 21: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 3

frakce 3	ABZSO (%)	
	(-)	(+)
Inkubace s ABZ 1,5μM	91,4 \pm 1,6	8,6 \pm 1,6
ABZ 5μM	90,0 \pm 1,7	10,0 \pm 1,7
ABZ 15μM	87,0 \pm 1,3	13,0 \pm 1,3
ABZ 50μM	90,0 \pm 1,9	10,0 \pm 1,9
ABZ 150μM	89,8 \pm 3,0	10,2 \pm 3,0
ABZ 500μM	90,1 \pm 1,6	9,9 \pm 1,6



Obr. 17: Procentuální zastoupení stereoizomerů ABZSO ve frakci 3

Při inkubaci frakce 3 s albendazolem vznikl nezávisle na koncentraci jako hlavní metabolit levotočivý stereoizomer albendazolsulfoxidu. Ve srovnání s pravotočivým stereoizomerem tvoří 89,7% celkového albendazolsulfoxidu.

5.3 Metabolismus ABZ a ABZSO motolicí kopinatou *in vivo*

5.3.1 Metabolismus albendazolu

Ve fosfátovém médiu bylo inkubováno 20 motolic se substrátem (albendazol 20 μ M a 40 μ M). Po skončení inkubace bylo změřeny koncentrace albendazolu, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu - v odebraném médiu v časech 0, 24 a 48hod a v homogenizovaných motolicích v časech 24 a 48hod.

5.3.1.1 Médium

Byly změřeny koncentrace substrátu a jeho metabolitů v médiu při inkubaci živých motolic ve fosfátovém pufru se substrátem (albendazol 20 a 40 μ M). Následující tabulky uvádí naměřené koncentrace albendazolu, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu v časech 0, 24 a 48 hodin. Ve vzorcích označených ND nebyl daný metabolit detekován.

5.3.1.1.1 Inkubace s albendazolem 20 μ M

Tab. 22: Koncentrace v médiu při inkubaci s ABZ 20 μ M

Doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
0 hod	10,16	ND	ND
24 hod	2,51	0,08	ND
48 hod	3,17	0,23	0,01

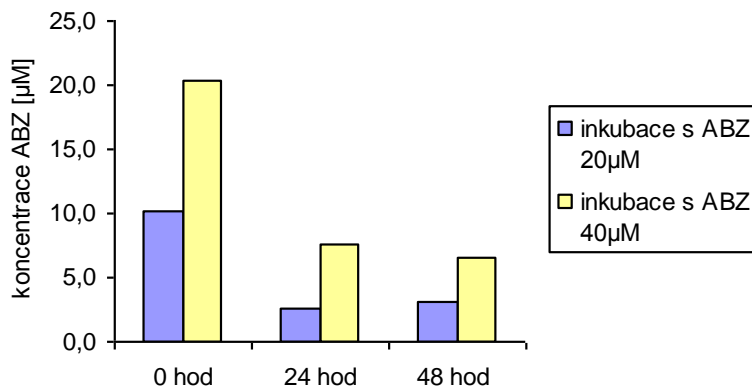
5.3.1.1.2 Inkubace s albendazolem 40 μ M

Tab. 23: Koncentrace v médiu při inkubaci s ABZ 40 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
0 hod	20,36	ND	ND
24 hod	7,58	0,15	ND
48 hod	6,56	0,19	ND

5.3.1.1.3 Porovnání koncentrace nezreagovaného ABZ v jednotlivých časech

V grafu vidíme změny koncentrace albendazolu v médiu při inkubaci s 20 a 40 μ M albendazolem.

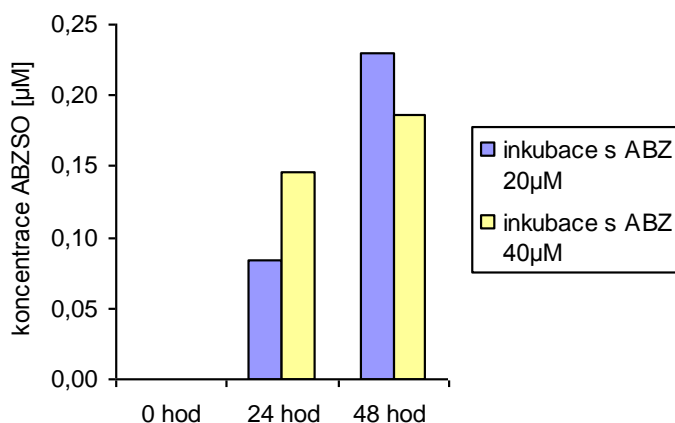


Obr. 18: Závislost koncentrace ABZ na době inkubace

Na začátku inkubace byla koncentrace nezreagovaného ABZ v obou případech nejvyšší, po 24hod došlo k výraznému snížení.

5.3.1.1.4 Porovnání koncentrace vzniklého ABZSO v jednotlivých časech

V tomto grafu pozorujeme nárůst koncentrace albendazolsulfoxidu v médiu při inkubaci s 20 a 40 μ M albendazolem.



Obr. 19: Závislost koncentrace ABZSO na době inkubace

V čase 0 nebyl ABZSO detekován, po 24 hod již byl zaznamenán a jeho koncentrace se dále zvyšovala.

5.3.1.2 Motolice

Byly měřeny koncentrace substrátu a jeho metabolitů v homogenátu motolic po inkubaci živých motolic ve fosfátovém pufru se substrátem (albendazol 20 a 40 μ M). Tabulky uvádí naměřené koncentrace albendazolu, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu v časech 24 a 48 hodin. Koncentrace ABZ a ABZSO byly při všech měřeních nulové.

5.3.1.2.1 Inkubace s albendazolem 20 μ M

Tab. 24: Koncentrace v motolicích při inkubaci s ABZ 20 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
24 hod	3,06	ND	ND
48 hod	2,81	ND	ND

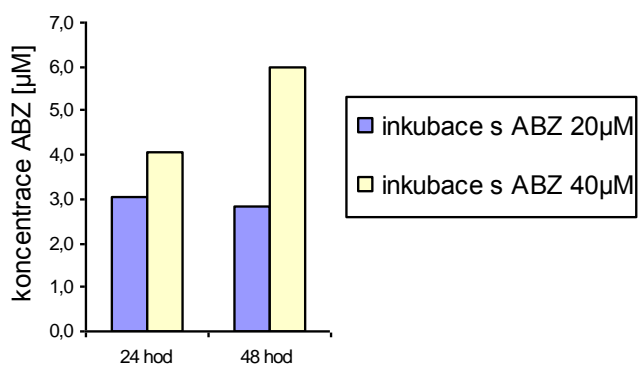
5.3.1.2.2 Inkubace s albendazolem 40 μ M

Tab. 25: Koncentrace v motolicích při inkubaci s ABZ 40 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
24 hod	4,08	ND	ND
48 hod	5,99	ND	ND

5.3.1.2.3 Graf závislosti koncentrace ABZ na době inkubace

V grafu jsou zachyceny změny koncentrace albendazolu v časech 24 a 48 hod.



Obr. 20: Závislost koncentrace ABZ na době inkubace

Koncentrace ABZ se po inkubaci s ABZ 20 μ M mírně snižovala, po inkubaci s ABZ 40 μ M se mezi 24 a 48 hod. výrazně zvýšila.

5.3.2 Metabolismus albendazolsulfoxidu

Dvacet motolic ve fosfátovém médiu bylo inkubováno se substrátem (albendazolsulfoxid 10, 20 a 30 μ M). V časech 0, 2, 4, 8 a 24hod byla změřena koncentrace albendazolu, albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu v médiu a v homogenátu motolic.

5.3.2.1 Médium

Byly změřeny koncentrace substrátu a jeho metabolitů v médiu při inkubaci s ABZSO koncentrace 10, 20 a 30 μ M. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách.

5.3.2.1.1 Inkubace s albendazolsulfoxidem 10 μ M

Tab. 26: Koncentrace v médiu při inkubaci s ABZSO 10 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
0 hod	0,12	9,33	0,06
2 hod	ND	5,02	0,04
4 hod	ND	4,85	0,04
8 hod	ND	4,55	0,03
24 hod	ND	4,63	0,03

5.3.2.1.2 Inkubace s albendazolsulfoxidem 20 μ M

Tab. 27: Koncentrace v médiu při inkubaci s ABZSO 20 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
0 hod	0,21	19,25	0,13
2 hod	0,05	9,61	0,06
4 hod	0,02	9,67	0,06
8 hod	0,02	9,06	0,06
24 hod	0,01	8,77	0,06

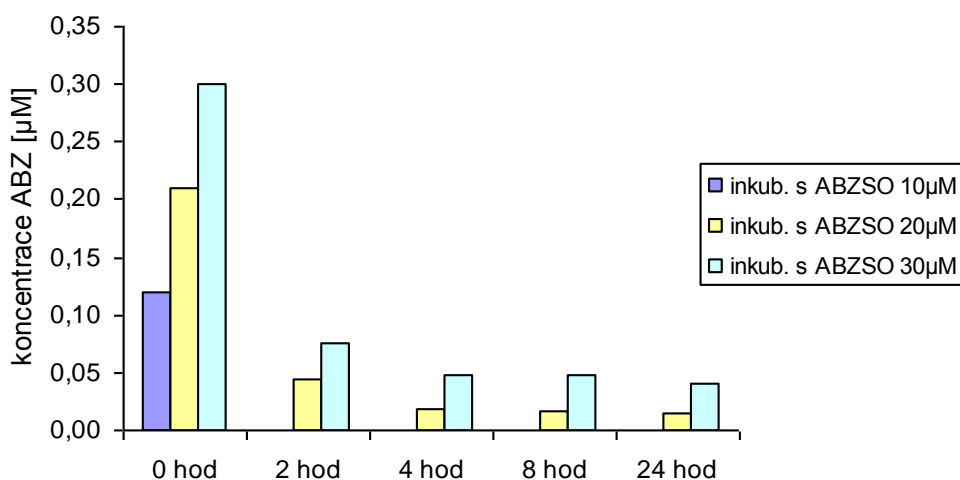
5.3.2.1.3 Inkubace s albendazolsulfoxidem 30 μ M

Tab. 28: Koncentrace v médiu při inkubaci s ABZSO 30 μ M

doba inkubace	koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
0 hod	0,30	28,71	0,20
2 hod	0,08	14,55	0,10
4 hod	0,05	14,83	0,10
8 hod	0,05	13,95	0,09
24 hod	0,04	13,99	0,09

5.3.2.1.4 Graf závislosti koncentrace ABZ na době inkubace

V grafu vidíme vývoj koncentrace albendazolu v médiu při inkubaci s 10, 20 a 30 μ M albendazolsulfoxidem.

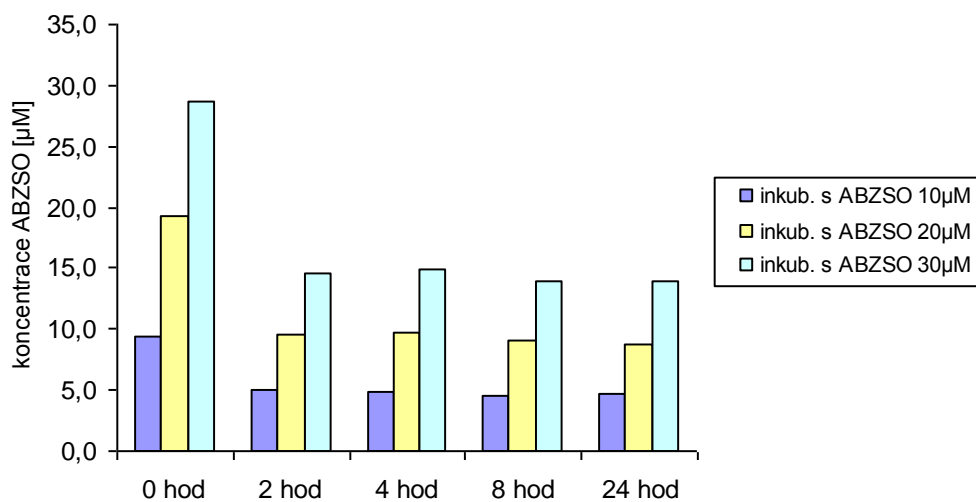


Obr. 21: Závislost koncentrace ABZ v médiu na době inkubace

Při všech inkubacích došlo k nejprudšímu poklesu koncentrace ABZ v médiu mezi časem 0 a 2hod. Po inkubaci s 10 μ M ABZSO byl ABZ detekován pouze v čase 0.

5.3.2.1.5 Porovnání koncentrace nezreagovaného ABZSO v jednotlivých časech

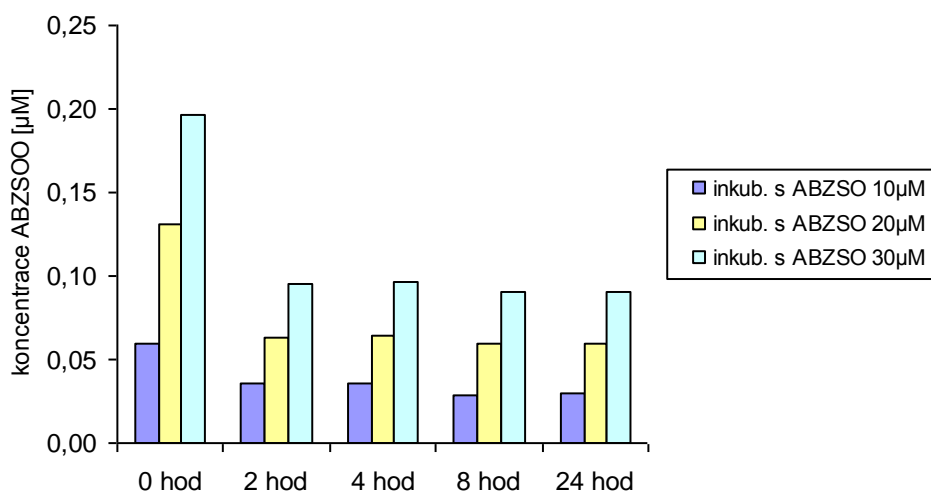
V grafu jsou zachyceny změny koncentrace albendazolsulfoxidu v médiu v čase.



Obr. 22: Závislost koncentrace ABZSO v médiu na době inkubace

Nejvyšší koncentrace ABZSO byla zjištěna na počátku inkubace, nejvýznamnější pokles koncentrace ABZSO byl zjištěn mezi časem 0 a 2hod.

5.3.2.1.6 Porovnání koncentrace ABZSOO v jednotlivých časech



Obr. 23: Závislost koncentrace ABZSOO v médiu na době inkubace

Nejvyšší koncentrace ABZSOO byla zjištěna na počátku inkubace, následovalo její snížení. Koncentrace se relativně ustálila po 2hod.

5.3.2.2 Motolice

Byly změřeny koncentrace substrátu a jeho metabolitů v homogenátu motolic po inkubaci živých motolic ve fosfátovém pufru s ABZSO 10, 20 a 30 μ M. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách.

5.3.2.2.1 Inkubace s albendazolsulfoxidem 10 μ M

Tab. 29: Koncentrace v motolicích při inkubaci s ABZSO 10 μ M

doba inkubace	Koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
2 hod	0,06	1,56	0,01
4 hod	0,05	1,07	0,01
8 hod	0,05	1,55	0,01
24 hod	0,05	1,05	0,01

5.3.2.2.2 Inkubace s albendazolsulfoxidem 20 μ M

Tab. 30: Koncentrace v motolicích při inkubaci s ABZSO 20 μ M

doba inkubace	Koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
2 hod	0,12	1,83	0,02
4 hod	0,13	2,63	0,03
8 hod	0,14	4,61	0,03
24 hod	0,13	2,16	0,03

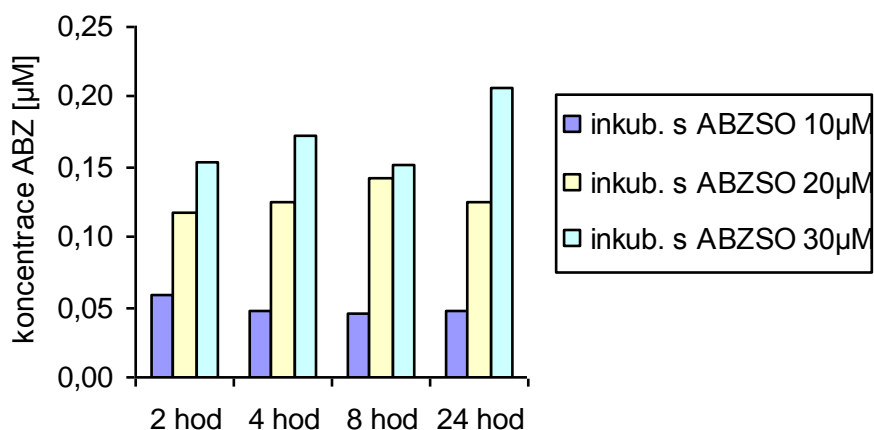
5.3.2.2.3 Inkubace s albendazolsulfoxidem 30 μ M

Tab. 31: Koncentrace v motolicích při inkubaci s ABZSO 30 μ M

doba inkubace	Koncentrace [μ M]		
	ABZ	ABZSO	ABZSOO
2 hod	0,15	2,92	0,03
4 hod	0,17	2,27	0,03
8 hod	0,15	1,95	0,02
24 hod	0,21	2,91	0,04

5.3.2.2.4 Porovnání koncentrace ABZ v jednotlivých časech

V grafu jsou zaneseny údaje o koncentraci albendazolu v motolicích po inkubaci s albendazolsulfoxidem.

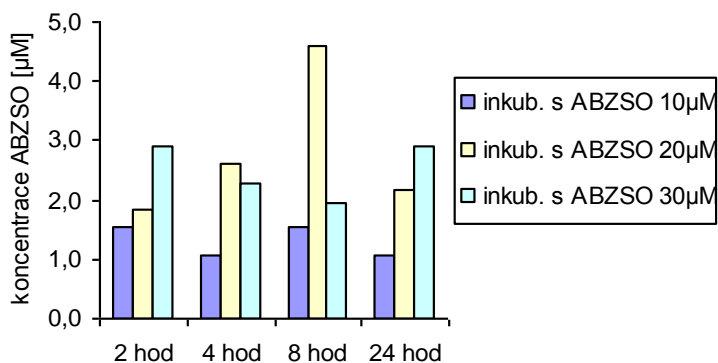


Obr. 24: Závislost koncentrace ABZ v motolicích na době inkubace

Koncentrace ABZ v homogenátu motolic byly nízké, nejvyšší byla zjištěna po 24hod inkubace s 30 μ M ABZSO.

5.3.2.2.5 Porovnání koncentrace nezreagovaného ABZSO v jednotlivých časech

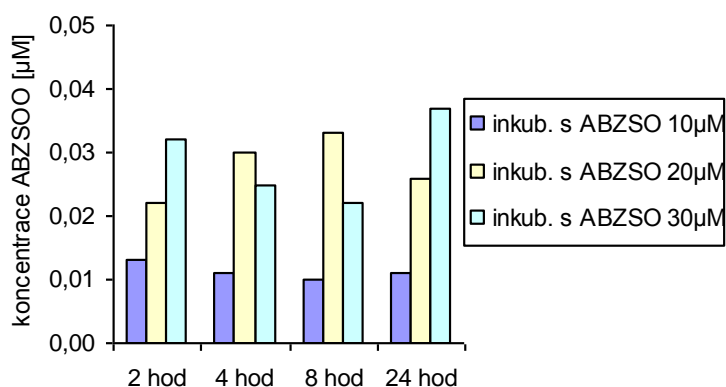
Zde vidíme hodnoty koncentrace albendazolsulfoxidu v motolicích po inkubaci s albendazolsulfoxidem.



Obr. 25: Závislost koncentrace ABZSO v motolicích na době inkubace

Koncentrace ABZSO v homogenátu motolic byla nejvyšší po 8hod inkubace s ABZSO 20μM, při inkubaci s ABZSO 30μM však byla v tomto čase koncentrace ABZSO nejnižší.

5.3.2.2.6 Porovnání koncentrace ABZSOO v jednotlivých časech



Obr. 26: Závislost koncentrace ABZSOO v motolicích na době inkubace

Koncentrace ABZSOO byly opět nízké. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána po 24hod inkubace s ABZSO 30μM.

6 Diskuze

Biotransformace antihelmintika albendazolu (ABZ) a jeho aktivního metabolitu albendazolsulfoxidu (ABZSO) motolicí kopinatou byla studována *in vitro* (v subcelulárních frakcích homogenátu motolic) a *in vivo* (v živých motolicích kultivovaných v nutričním mediu).

Pro studie *in vitro* byly z motolic připraveny subcelulární frakce homogenátu. Tyto frakce, označené 1, 2 a 3, odpovídají frakci cytosolické, mitochondriální a mikrosomální při analogickém zpracování homogenátu živočišných tkání. Při experimentech *in vitro* byly získané frakce homogenátu motolic nejprve inkubovány se substráty (ABZ nebo ABZSO) v saturační koncentraci (50 μ M). Cílem experimentu bylo zjistit, zda dochází k biotransformaci substrátu a jak se na tomto procesu podílí jednotlivé frakce. Dalším úkolem bylo určit míru stereospecifity sulfoxidace ABZ.

Cílem sledování biotransformace ABZ ve frakcích 2 a 3 v závislosti na koncentraci substrátu bylo stanovení kinetických parametrů oxidace ABZ – Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti.

Při inkubaci s ABZ byly zjištěny významné rozdíly ve vzniku metabolitů ABZ u jednotlivých frakcí. Ve frakci 1 nebyl detekován ani ABZSO, ani ABZSOO. Substrát pravděpodobně touto frakcí není metabolizován. Koncentrace nezmetabolizovaného ABZ je v porovnání s koncentrací u dalších frakcí nejvyšší i přesto, že v této frakci se nalézá nejvyšší množství proteinů.

Ve frakci 2 vzniklo z ABZ šestinásobně větší množství ABZSO než ve frakci 3. Specifická aktivita enzymů je zde také nejvyšší. Tato frakce rovněž vykazovala nejvyšší míru stereospecifity sulfoxidace ABZ; prakticky vznikal pouze levotočivý stereoizomer.

Ve slepém vzorku (bez proteinu) nedošlo k metabolizaci substrátu, koncentrace ABZ i ABZSO byly nulové.

Analýza metabolismu ABZSO byla zaměřena na možnost inaktivace účinného metabolitu ABZSO jeho biotransformací. V porovnání se slepým vzorkem došlo u všech frakcí k přibližně stejnému snížení koncentrace

ABZSO. Rovněž množství detekovaného ABZ bylo srovnatelné ve všech vzorcích včetně slepých vzorků. Analýza prokázala znečištění substrátu ABZSO albendazolem. ABZSO pravděpodobně není enzymaticky redukován na ABZ.

Ve slepých vzorcích byl při inkubaci s ABZSO nalezen také ABZSOO. Jeho koncentrace byla dokonce vyšší než ve vzorcích inkubovaných s frakcemi. Jak se posléze ukázalo, substrát ABZSO byl znečištěn i tímto metabolitem. Při inkubacích tedy v tomto případě ABZSOO vystupoval jako další substrát, ke snížení jeho koncentrace došlo při inkubacích všech tří frakcí. ABZSOO je tedy pravděpodobně motolicemi biotransformován, vzniklý metabolit však zůstává neznámý. Díky velkému znečištění substrátu nelze také jednoznačně rozhodnout, zda je v menší míře či zda vůbec není ABZSO metabolizován. Pokud k takovému procesu dochází, jistě se nejedná o kvantitativně významnou cestu inaktivace účinné látky (ABZSO).

Při sledování závislosti metabolismu ABZ na koncentraci substrátu rychlost přeměny ABZ na ABZSO nejprve s koncentrací prudce rostla, po dosažení určité hraniční koncentrace substrátu se rychlost začala zvolna snižovat. U frakce 2 byl tento pokles výraznější. Jev si lze vyložit jako inhibici enzymů způsobenou nadměrnou koncentrací ABZ. Nelze ale vyloučit ani možnost krystalizace substrátu v médiu při vyšších koncentracích.

Michaelisova konstanta pro frakci 2 je nižší než pro frakci 3. Maximální rychlost biotransformace ABZ na ABZSO je pro enzymy frakce 2 téměř třikrát vyšší než pro enzymy frakce 3. Z toho vyplývá, že enzymy frakce 2 mají oproti enzymům frakce 3 vyšší jak afinitu k ABZ, tak i katalytickou aktivitu sulfoxidace.

Při analýze zastoupení stereoizomerů ABZSO, vzniklého při inkubaci ABZ s frakcí 2 a 3, nebylo u některých vzorků možné vyhodnotit jednotlivé píky, protože došlo k jejich částečnému překrytí dalšími píky neidentifikovaných nečistot či metabolitů. Nepodařilo se zjistit, proč se tento problém objevoval pouze u vzorků frakce 2 a to zcela náhodně. Nicméně vždy bylo možné vyhodnotit alespoň jedno z paralelních stanovení. U obou

analyzovaných frakcí byla potvrzena vysoká míra stereospecifity enzymů. Jako hlavní produkt vznikal levotočivý ABZSO, u frakce 2 ze 79,4%, u frakce 3 z 89,7%. Toto procento se mírně odchyluje od údajů předešlé analýzy, kdy u frakce 2 bylo stanoveno zastoupení (-)-ABZSO na 81,1%, u frakce 3 na 100%. Potvrdilo se však, že nejvyšší míru stereospecifity vykazují enzymy frakce 3.

Poměr levotočivého a pravotočivého izomeru se v závislosti na koncentraci substrátu neměnil. Z tohoto výsledku lze odhadovat, že na sulfoxidaci ABZ se v každé frakci podílí převážně jeden enzymový systém.

V analýze *in vivo* jsme kultivovali živé motolice v médiu s obsahem albendazolu 20 a 40 μ M a v médiu s albendazolsufloxidem 10; 20; a 30 μ M. Naším cílem bylo stanovit koncentrace ABZ, ABZSO a ABZSOO v médiu (v čase 0, 24, 48hod.) i v homogenizátu motolicích (24 a 48hod.). Naměřené hodnoty vypovídají o biotransformaci substrátů dikrocéliemi a závislosti biotransformačních procesů na čase a koncentraci substrátů. Zjištěné údaje by nám také mohly objasnit transport parentních látek i metabolitů a případnou souvislost těchto jevů s rozvojem rezistence.

Při inkubaci s ABZ se v médiu koncentrace ABZ postupně snižovala. Z média byl ABZ transportován do dikrocelií. Při inkubaci s 40 μ M ABZ koncentrace substrátu v motolici s rostoucí dobou inkubace narůstá, což je z hlediska léčby dikrocelií žádoucí jev.

I v experimentech s motolicemi *in vivo* byla prokázána biotransformace ABZ na ABZSO. Tento metabolit byl detekován v médiu, ve kterém byly motolice a substrát ABZ. Koncentrace ABZSO v médiu se po inkubaci ABZ s motolicemi zvyšovala s rostoucí dobou inkubace i s rostoucí koncentrací substrátu.

V homogenizátu motolic však koncentrace ABZSO byla při obou inkubacích změřena jako nulová. Vzhledem k tomu, že při analýze *in vitro* bylo prokázáno, že *D. dendriticum* metabolizuje ABZ na ABZSO, a vzhledem k nenulovým koncentracím ABZSO v médiu, je pravděpodobné, že dochází k rychlé eliminaci ABZSO z organismu dikrocelie.

Albendazolsulfon byl detekován ve velmi nízké koncentraci pouze v médiu po 48-hodinové inkubaci motolic s albendazolem. ABZSOO byl také zaznamenán ve slepém vzorku analýzy *in vitro*, zde však mohl vznikat až v průběhu inkubace chemickou oxidací albendazolsulfoxidu. Nelze tedy vyloučit, že se i v inkubátech ABZ s motolicemi jedná o neenzymatickou přeměnu.

Při inkubaci živých motolic v kultivačním médiu s ABZSO bylo v médiu již na počátku inkubace (čas 0) zjištěno určité množství ABZ ve všech třech inkubačních směsích. Příčinou bylo znečištění substrátu (ABZSO).

Při nejnižší koncentraci ABZSO byl ABZ v médiu detekován pouze v čase nula, pak došlo k jeho transportu do motolic a pravděpodobně i k jeho částečné biotransformaci. V dikroceliích se počáteční vyšší stav ABZ mírně snížil a ustálil.

Při inkubaci s vyššími koncentracemi ABZSO se koncentrace albendazolu postupně snižovala. Pokles koncentrace ABZ v médiu byl prudší v inkubaci s nejvyšší koncentrací substrátu. To mohlo být způsobeno odezvou transportních systémů na vyšší koncentraci jejich substrátu.

V motolicích koncentrace ABZ kolísala, výkyvy nejeví známky časové závislosti.

Koncentrace ABZSO v médiu byla u všech inkubací nejvyšší v čase nula. Při inkubaci zřejmě došlo k průniku substrátu do organismu parazita a tedy poklesu jeho koncentrace v médiu. S ubíhajícím časem se koncentrace ustálila nebo klesala jen velmi mírně. Pravděpodobně zároveň probíhal i transport opačným směrem. Rovnováha se ustálila přibližně na poloviční hodnotě původní koncentrace substrátu.

Koncentrace substrátu v motolicích byla vždy nižší než v médiu. Výsledná koncentrace v dikroceliích je určena několika procesy. Prvním je transport do organismu parazita. Motolice pravděpodobně přijímá substrát s médiem při příjmu živin a zároveň difúzí/transportem přes tegument. Současně probíhá transport opačným směrem. Dalším faktorem je metabolismus ABZSO, který může být přeměňován na ABZSOO, ABZ nebo

další nedetekované metabolity. A nakonec biotransformace ABZ, který se v médiu vyskytuje jako nečistota a je motolicí přijímán a zpracováván.

Ze získaných údajů nebylo možné vyvodit časovou závislost. Koncentrace ABZSO v médiu byla však vždy několikanásobně vyšší než v motolicích, což může být vysvětleno aktivní eliminací ABZSO a jeho metabolickým odbouráním. Tento jev může mít úlohu v rozvoji rezistence na ABZ.

Koncentrace ABZSOO v médiu klesla z původní koncentrace asi na jednu polovinu, pravděpodobně docházelo k difúzi do organismu parazita. V motolicích koncentrace ABZSOO přibližně kopírovala koncentraci ABZSO, což může být dáno tím, že se na biotransformaci obou sloučenin podílí obdobné enzymy.

7 Závěr

Diplomová práce prokázala, že *Dicrocoelium dendriticum* biotransformuje albendazol na albendazolsulfoxid. Největší měrou se na této biotransformaci podílí enzymy frakce 2 odpovídající mitochondriím, naopak nulová aktivita enzymů byla zjištěna ve frakci 1 odpovídající cytosolu.

Sulfoxidace albendazolu probíhala stereoselektivně, vznikal převážně levotočivý stereoizomer. Nejvyšší míru stereospecifity vykazují enzymy frakce 3 („mikrosomy“).

Byly stanoveny kinetické parametry sulfoxidace albendazolu. Maximální rychlost sulfoxidace byla téměř třikrát vyšší u frakce 2 ($V_{\max} = 23,89\text{nM/min}$) než u frakce 3 ($V_{\max} = 8,57\text{nM/min}$), Michaelisova konstanta byla nižší ve frakci 2 ($K_m = 0,265\mu\text{M}$) než ve frakci 3. ($K_m = 0,304\mu\text{M}$).

Z experimentů *in vivo* lze usuzovat na přítomnost transportních systémů, které regulují koncentraci ABZSO v organismu motolice.

V budoucnu je třeba optimalizovat analytickou metodu a provést další studie *in vivo*, které by více objasnily časovou a koncentrační závislost biotransformace ABZ a jeho metabolitů.

8 Seznam použitých zkratek

ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazolsufoxid
ABZSOO	Albendazolsulfon
ACN	Acetonitril
BCA	bicinchoninic acid
BSA	hovězí sérový albumin
BZ	benzimidazolová antihelmintika
CYP450	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
FMO	flavinmonooxygenázový systém
GST	glutathion-S-transferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
ND	nebylo detekováno
TGR	thioredoxin glutathion reductasa

9 Literatura

- Alvarez L. I., Imperiale F. A., Sánchez S. F., Murno G. A., Lanusse C. E.: Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep, *Veterinary Parasitology* 94, 75-89, 2000
- Barrett J.: Helminth detoxification mechanisms, *Journal of helminthology* 71, 85-89, 1997
- Buchar J., Ducháč V., Hůrka K., Lellák J.: Klíč k určování bezobratlých, *Scientia, Praha*, 52-53, 1995
- Čorba J., Várady M., Konigová A.: Antihelmintická rezistencia, Aktuálny stav na Slovensku, *Slovenský veterinársky časopis*, 26, 145-150, 2001
- Dogel V. A.: Zoologie bezobratlých, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 130-152, 1947
- Drudge J. H., Szanto J., Wyant Z. N., Elam G. W.: Field studies on parasite control of sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine, *American Journal of Veterinary Research*, 25, 1512-1518, 1964
- Duchoň J. a kol.: Lékařská chemie a biochemie, Avicenum, Praha, 1995
- http://us.gsk.com/products/assets/us_albenza.pdf
- http://www.atlas.or.kr/atlas/alphabet_view.php?my_codeName=Dicrocoelium%20dendriticum, 2003
- Hunt K. R., Taylor M. A.: Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes, *Veterinary Record*, 125, 153-154, 1989
- Jefferies J. R., Campbell A. M., van Rossum A. J., Barrett J., Brophy P. M.: Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products, *Proteomics* 1, 1128-1132, 2001

- Katzung B. G. et al.: Základní a klinická farmakologie, H&H, 48-57, 1994
- Kohler P.: The biochemical basis of antihelmintic action and resistance, Int. J. Parasitol, 31, 336-345, 2001
- Kvasničková E.: Xenobiochemie, Praha, Karolinum, 14-23, 1995
- Lacey E., Gill J. H.: Biochemistry of benzimidazole resistance, Acta Trop., 56, 245-62, 1994
- Mansuy D.: The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450, Comp. Biochem. Physiol. Part C, 121, 5-14, 1998
- Otranto D., Traversa D.: A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment, Veterinary Parasitology, 107, 317-335, 2002
- Prichard R.: Anthelmintic resistance, Vet. Parasitol., 54, 259-68, 1994
- Redondo P. A., Álvarez A. I., Garcia J. L., Larrodé O. M., Merino G. Prieto J. G.: Presystemic metabolism of albendazole: experimental evidence of an efflux process of albendazole sulphoxide to intestinal lumen, Drug. Metab. Dispos., 27, 736-740, 1999
- Robinson M. W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E. M., Fairweather I.: The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*, Parasitol. Res., 92, 205-210, 2003
- Robinson M. W., Trudgett A., Hoey E. M., Fairweather I.: Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: β -tubulin and response to in vitro treatment with triclabendazole, Parasitology, 124, 325-38, 2002
- Rossjohn J., Feil S. C., Wilce M. C. J., Sexton J. L., Spithill T. W., Parker M. W.: Crystallization, structural determination and analysis of novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase, J. Mol. Biol. 273, 857-872, 1997
- Salazar-Calderón M., Martín-Alonso J. M., Ruiz de Egiño A. D., Parra F.: Heterologous expression and functional characterization of thioredoxin from *Fasciola hepatica*, Parasitol. Res. 87, 390-395, 2001

- Salinas G., Selkirk M. E., Chalar C., Maizels R. M., Fernández C.: Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths, Trends in parasitology, Vol. 20, No. 7, 340-346, 2004
- Sangster N. C., Gill J.: Pharmacology of anthelmintic resistance, Parasitology today, Vol. 15, No. 4, 141-145, 1999
- Sangster N. C.: Anthelmintic resistance: past, present and future, International Journal for Parasitology 29, 115-124, 1999
- Solana H. D., Rodriguez J. A., Lanusse C. E.: Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites, Parasitol. Res. 87, 275-280, 2001
- Testa B.: The metabolism of drugs and other xenobiotics, Academic press, London, 1995
- Velík J., Baliharová V., Skálová L., Szotáková B., Wsól V., Lamka J.: Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle sheep and pig and some related wild breeds, J. vet. Pharmacol. Therap. 28, 2005, 377-384
- Velík J., Baliharová V., Skálová L., Szotáková B., Wsól V., Lamka J.: Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes, J. vet Pharmacol. Therap. 26, 297-302, 2003
- Velík J., Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Šavlík M., Wsól V., Šnejdrová E., Skálová L.: Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon (*Ovis musimon*), Research in Veterinary Science 78, 255-263, 2005
- Waller P.J.: The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock, Acta Tropica, 56, 233-243, 1994
- Williams J.C.: Anthelmintic treatment strategies: current status and future, Vet. Parasitol., 72, 461-70, 1997