

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

METABOLISMUS A ÚČINKY NOVÝCH
ANTHELMINTIK U HELMINTŮ A JEJICH HOSTITELŮ

Disertační práce

Mgr. Lucie STUHLÍKOVÁ

Vedoucí disertační práce:
Odborný konzultant:

Hradec Králové, 2015

prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
MVDr. Lenka Lecová, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením svého školitele a konzultantek). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 20. května 2015

Mgr. Lucie Stuchlíková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., za její trpělivost, toleranci, cenné rady a především vždy přátelský a optimistický přístup po celou dobu mého doktorského studia.

Děkuji svým spolupracovníkům Ing. Petře Matouškové, Ph.D., MVDr. Lence Lecové, Ph.D., PharmDr. Haně Bártíkové, Ph.D., Doc. PharmDr. Ivě Boušové Ph.D., Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za každodenní pomoc a odborné a přátelské rady.

Děkuji prof. Ing. Michalu Holčápkovi, Ph.D. a Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. z Katedry analytické chemie, Univerzity Pardubice za pomoc při analýze vzorků, a hlavně za jejich trpělivost se mnou spolupracovat.

Děkuji Dr. Urska Vrhovsek z Centro Ricerca e Innovazione-Fondazione Edmund Mach v Itálii za vřelé přijetí do její pracovní skupiny a podělení se o cenné zkušenosti.

Děkuji pracovnímu kolektivu Katedry Biochemických věd, zejména kolegům z naší kanceláře za přátelskou atmosféru a ochotu mi pomoci s čímkoliv.

Děkuji své rodině, partnerovi a přátelům za podporu po celou dobu studia.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy, grant č. 673 612/B-CH/2012, Grantové agentuře České Republiky, grant č. P502/10/0217 a grantu č. SVV 260 065.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát

Mgr. Lucie STUHLÍKOVÁ

Školitel

prof. RNDr. Lenka SKÁLOVÁ, Ph.D.

Název disertační práce

METABOLISMUS A ÚČINKY NOVÝCH ANTHELMINTIK U HELMINTŮ A JEJICH
HOSTITELŮ

Onemocnění způsobené helminty, tzv. helmintózy, jsou jedním z největších problémů ve veterinární i humánní medicíně. Tyto nákazy se léčí anthelmintiky, avšak jejich účinnost není často dostatečná kvůli rezistenci helmintů vůči běžným anthelmintikům. Celosvětové rozšíření resistance helmintů vedlo k vývoji nových léčiv, která mají odlišný mechanismus účinku než léčiva dosud používaná. Monepantel (MOP) patří do nové třídy anthelmintik, známé jako amino-acetonitrilové deriváty (AAD) s účinkem na nikotin-acetylcholinové receptory. MOP byl schválen ve veterinární praxi v České republice v roce 2011 pro terapii gastrointestinálních onemocnění, která jsou způsobená hlísticemi. Komerčně je vyráběn pod názvem Zolvix® od firmy Novartis AG.

Cílem předložené disertační práce bylo studovat metabolismus a účinky MOP a jeho derivátů za účelem přispět ke globálnímu výzkumu na tomto poli. V experimentech byly jako zástupci hlístic použity Vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*, citlivý kmen ISE a rezistentní kmen WR) a jejich hostitelé ovce (*Ovis spp*). V rámci studie byly identifikovány metabolity MOP *in vitro* v ovčích hepatocytech, *in vivo* v moči a trusu ovcí, a *ex vivo* v dospělých *H. contortus*. Dále byly identifikovány metabolity I. a II. fáze biotransformace dalších zástupců AAD *in vitro* v ovčích hepatocytech. Metabolické dráhy MOP a jeho derivátů byly vzájemně porovnány jak mezi sebou, tak i v různých testovaných systémech. V druhé části disertační práce byl studován modulační vliv MOP na aktivitu a expresi cytochromů P450, hlavních biotransformačních enzymů, a byl zjištěn významný indukční účinek MOP na

CYP3A24. V neposlední řadě byl také testován účinek MOP a jeho derivátů na nižší vývojová stádia *H. contortus*. Současné informace o MOP dostupné z literárních zdrojů i získané našimi experimenty byly zpracovány do přehledného odborného článku (review).

Výsledky disertační práce rozšířily poznatky o nové třídě anthelmintických léčiv. Poznání metabolických drah, odhalení indukčního účinku i doplnění informací o anthelmintické účinnosti MOP a jeho derivátů je velmi důležité pro bezpečnou terapii i posouzení rizika vývoje lékové resistance helmintů a může tak vést ke zlepšení a zefektivnění anthelmintické léčby.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate

Mgr. Lucie STUHLÍKOVÁ

Supervisor

prof. RNDr. Lenka SKÁLOVÁ, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis

METABOLISM AND EFFECTS OF NEW ANTHELMINTIC DRUG IN
HELMINTHS AND ITS HOSTS

Diseases caused by helminths, called helminthoses, are one of the most serious problems in veterinary and human medicine. These diseases are treated by anthelmintics but their effectiveness is often not sufficient due to resistance of helminths against common anthelmintics. The global anthelmintic resistance encouraged the developing of new drugs with a different mode of action. Monepantel (MOP) belongs to a new class of anthelmintic drugs known as amino-acetonitrile derivatives (AADs) that act on the nicotinic acetylcholine receptors. In 2011, MOP was approved for the treatment of gastrointestinal diseases caused by nematodes in the veterinary practice in the Czech Republic. It is produced commercially under the trade name Zolvix® (Novartis AG).

The aim of this doctoral thesis was to study metabolism and effects of MOP and other AADs in order to contribute to the global research in this field. For this purpose, adults nematodes *Haemonchus contortus* (the sensitive strain ISE and the resistant strain WR) and its hosts *Ovis* spp. were used. In this study, metabolites of MOP formed *in vitro* (in ovine hepatocytes), *in vivo* (in urine and faeces from sheep) and *ex vivo* (in living nematodes) were identified. Furthermore, metabolism of the other AADs were also studied *in vitro* in ovine hepatocytes. Metabolic pathways of the MOP and its derivatives were compared with each other and in different model systems. In the second part of the doctoral thesis, the modulatory effect of MOP on the activity and expression of cytochromes P450 (CYP), main biotransformation enzymes, was studied in target species- sheep. Significant inducing effect of MOP on

the CYP3A24 was detected. Last but not least, the efficacy of MOP and its derivatives against lower developmental stages of *H. contortus* was tested. Current information about MOP, available from literary sources and obtained also from our experiments, were processed to the review article.

The obtained results of this doctoral thesis extend the knowledge about AADs, new class of anthelmintic drugs. The information about metabolic pathways, CYP induction and efficacy of MOP and its derivatives is very important for the safety of therapy and evaluation of risks of drug-resistance development in helminths. It may lead to improvement and streamlining of helminthosis treatment.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Helmintózy	11
2.2 <i>Haemonchus contortus</i>	13
2.3 Imunitní odpověď na parazita a jeho ochrana	13
2.4 Terapie helmintóz	14
2.5 Helmintoresistence	19
2.5.1 Příčiny a prevence	20
2.5.2 Diagnostické metody	22
2.6 Biotransformace xenobiotik	23
2.6.1 Reakce I. fáze biotransformace	24
2.6.2 Reakce II. fáze biotransformace	26
2.6.3 Transportéry	28
2.7 Biotransformace xenobiotik u parazita	28
2.8 Využití LC/MS pro detekci a identifikaci metabolitů	29
2.9 Využití qPCR pro stanovení exprese genu	31
3 CÍLE PRÁCE	33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4.1 Metabolismus monepantelu <i>in vitro</i> v ovčích hepatocytech	34
4.2 Metabolismus monepantelu u parazita a jeho hostitele	36
4.3 Účinek monepantelu na vývojová stádia <i>Haemonchus contortus</i>	38
4.4 Srovnávací studie AADs s monepantelem	39
4.5 Vliv monepantelu na aktivitu a expresi biotransformačních enzymů	42
4.6 Souhrnná studie o metabolismu a účinku monepantelu	45
5 ZÁVĚRY	46
6 SEZNAM LITERATURY	47
7 SEZNAM ZKRATEK	57
8 PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH zahrnutých v disertační práci	59
9 PŘÍLOHY	61

9.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce	61
9.1.1 Publikace I	62
9.1.2 Publikace II	71
9.1.3 Publikace III	80
9.1.4 Publikace IV	86
9.1.5 Publikace V	94
9.1.6 Publikace VI	100
9.2 Ostatní publikace v recenzovaných časopisech	114
9.3 Prezentace na konferencích	115

1 ÚVOD

Jeden z problémů v zemědělství a v humánní medicíně je boj proti parazitujícím červům, původcům tzv. helmintóz. Jediným dostupným prostředkem proti helmintózám je farmakoterapie a farmakoprophylaxe prováděná s využitím vhodných anthelmintik, na které se však často po dlouhodobém užívání podobných léčiv vyvíjí resistance (Gobert a Jones, 2008; Papadopolous *et al.*, 2008). Ta je celosvětově velmi závažným problémem a způsobuje rozsáhlé ekonomické ztráty. Situaci všeobecně komplikuje malý počet vhodných léčiv a omezená znalost schopnosti parazita biotransformovat používaná anthelmintika.

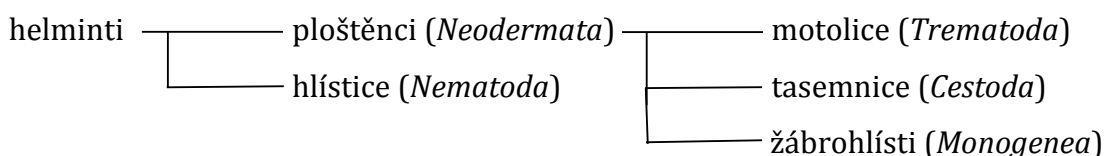
Pro terapii helmintóz se v současnosti využívá několik anthelmintik rozdělených do následujících skupin: benzimidazoly (např. flubendazol, albendazol, fenbendazol), imidazothiazoly (např. levamizol), makrocyclické laktony (např. ivermectin), anthelmintika ze skupiny pyrazinoisochinolinů (např. prazikvotel) a další. Novou třídou anthelmintik jsou amino-acetonitrilové deriváty (AAD). AAD sloučeniny splňují požadavky při terapii helmintóz u hospodářských zvířat: mají nízkou toxicitu, příznivé farmakokinetické vlastnosti a široké spektrum účinku proti působení helmintů u ovcí a skotu (Kaminsky *et al.*, 2008). V této době je jediným schváleným léčivem ze třídy AAD monepantel (MOP). Ačkoli je MOP používán ve veterinární praxi od roku 2010, informace o jeho metabolismu a účincích nebyly dostatečné. Proto jsme se rozhodli metabolismus MOP a dalších AAD studovat a chybějící informace doplnit.

Získání nových poznatků o metabolismu nových anthelmintik u parazitujících červů a u zdravých hostitelů přispěje k objasnění obranných systémů parazitů a mechanismů vývoje helmintoresistence. Mapování a pochopení těchto procesů by mohlo vést k vývoji nových agens zabraňujících adaptaci parazitů na působení anthelmintika a přineslo by zefektivnění a zvýšení účinnosti terapie helmintóz.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Helmintózy

Mezi nejrozšířenější chronická onemocnění hospodářských zvířat patří infekce vyvolané parazitickými červy, tzv. helmintózy. Ty jsou způsobené organismy, které zahrnují dvě hlavní skupiny (kmeny) mnohobuněčných červů: ploštěnci (*Neodermata*) a hlístice (*Nematoda*). *Neodermata* slučují většinu parazitických skupin ploštěnců, mezi které patří motolice (*Trematoda*), tasemnice (*Cestoda*) a žábrohľísti (*Monogenea*). Mezi nejtypičtější znaky tohoto kmene patří změna povrchu při přeměně první larvy na následující stadium, kdy se cyliární buňky nahrazují tegumentem (aciliární povrchové syntetikum). Tento tegument, nazývaný také neodermis, je metabolicky velmi aktivní a slouží k trávení a přenosu živin a k ochraně parazita před vnějším prostředím (Volf a Horák, 2007).



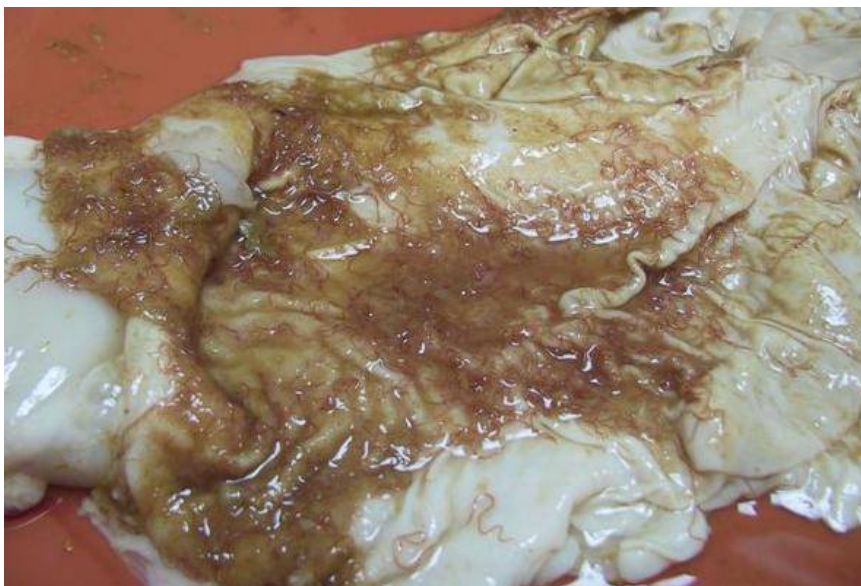
Mezi nejzávažnější trematodózy vyskytující se u hospodářských zvířat patří infekce způsobené parazitem *Fasciola hepatica* (Motolice jaterní), *Fascioloides magna* (Motolice velká) a *Dicrocoelium dendriticum* (Motolice kopinatá). Prvním hostitelem jsou měkkýši, většinou plži a méně často mlži. Motolice parazitují téměř ve všech orgánových soustavách, především v játrech. Tyto druhy parazitů působí velké ekonomické ztráty a hospodářské škody v chovech domácích přežvýkavců (zejména ovcí, kde snižují přírůstky a produkci mléka) (Volf a Horák, 2007).

Další skupinou jsou tasemnice (*Cestoda*), které mají životní cykly s několika mezihostiteli a místem lokalizace dospělců je trávící soustava obratlovců. Infekce je vždy perorální a při přenosu na jednotlivé typy hostitelů tedy využívají potravní řetězec. Mezi kosmopolitně nejrozšířenější tasemnice, které jsou přenášeny na pastvinách, patří *Taenia solium* (Tasemnice dlouhočlenná), *Taenia saginata* (Tasemnice bezbranná) a *Echinococcus granulosus* (Měchožil zhoubný).

Žábrohľísti (*Monogenea*) je rozšířená skupina helmintů parazitující především na rybách, kde mohou být nebezpečnými patogeny (Volf a Horák, 2007).

Druhým hlavním kmenem helmintů jsou hlístice (*Nematoda*), které se vyznačují stavbou těla přizpůsobenou parazitování, zejména kutikulárními zuby. Dospělci hlístic parazitují v obratlovcích a jsou lokalizováni nejčastěji v trávicím traktu (Volf a Horák, 2007). Významní gastrointestinální paraziti domácích i divokých přežvýkavců patří do čeledi *Trichostrongylidae* a zejména do rodů *Ostergia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Nematodirus* a dalších (Saddiqi *et al.*, 2011).

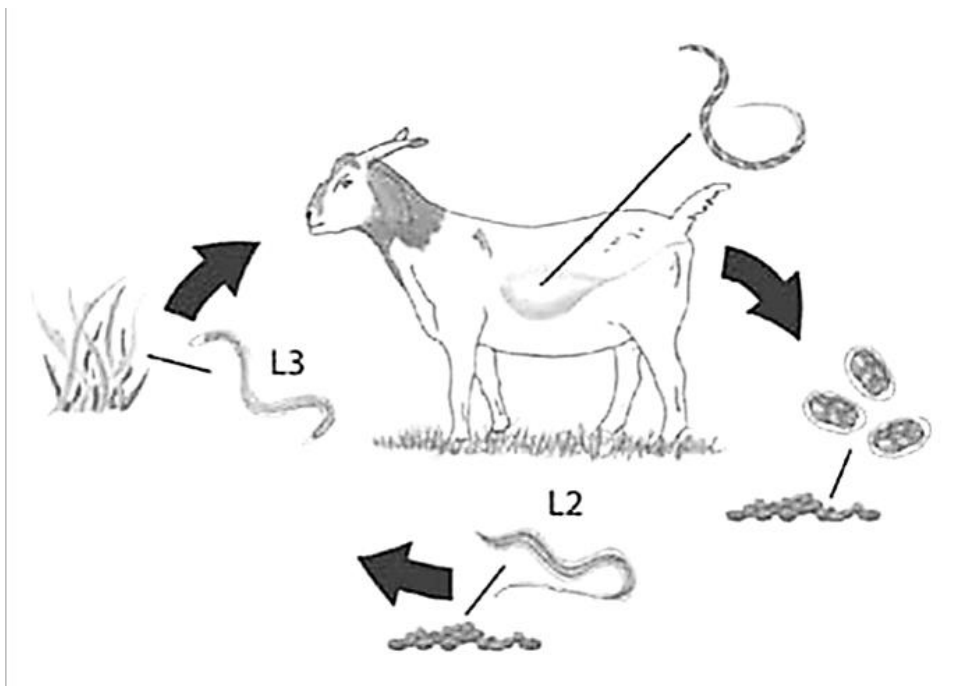
Vysoce patogenní a hospodářsky významné onemocnění, haemonchóza, může být způsobovaná *Haemonchus contortus*, *H. similis*, *H. longistipes* a *H. placei* (Mortensen *et al.*, 2013). Všechny druhy parazitují ve slézu (Obr. 1), způsobují anémii a mohou způsobit smrt u silně infikovaných zvířat (Githigia *et al.*, 2001). Ačkoli jsou tyto infekce častější u ovcí a koz, mohou se vyskytovat i u dalších druhů sudokopytníků, jako jsou dobytek, jeleni, antilopy, bizoni, velbloudi nebo žirafy. Rod *Haemonchus* pochází z Afriky s bazální diverzifikací v antilopách následovaný vývojem v dalších hostitelských druzích sudokopytníků (Hoberg *et al.*, 2004). Domestikování zvířat následované jejich transportem vedlo k rozšíření infekce po celém světě. Následkem toho se stávají z původně tropických a subtropických parazitů organismy žijící v mírných klimatických podmínkách v Evropě (Jackson and Coop, 2000; Hoste *et al.*, 2002). Výskyt a intenzita infekce je výrazně ovlivněna věkem zvířat, rozlohou pastvin, výživou a celkovým zdravotním stavem.



Obr. 1 Napadený ovčí sléz helminty *Haemonchus contortus* (foceno Prof. RNDr. Jiřím Lamkou, CSc. na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Česká republika).

2.2 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus je Vlasovka slézová (10-30 mm) parazitující ve stěně žaludku přežvýkavců. Vývoj této hlístice je přímý, tedy bez mezihostitele. Z vajíček se za příznivých podmínek vyvíjí larvy L1, které se líhnou v průběhu 14 až 17 hodin. Larvy se dvakrát svlékají a stadia L3 dosahují mezi 6. a 8. dnem. Životní cyklus *Haemonchus contortus* u malého přežvýkavce je znázorněný na Obr. 2. K nakažení dochází perorálně infekčními larvami L3. Ty pronikají do stěny žaludku, kde dospívají do 4. larválního stádia. Patogenní jsou larvy 4. stádia a dospělí červi, kteří sají krev. Pohlavně zralé nematody se na sliznici volně pohybují a přichycují se pouze při sání krve za pomoci kyjovitého zubu, který je umístěn v ústní kapsuli. Onemocnění se projevuje lézemi ve slézu, ztrátou erytrocytů, poruchami kostní dřeně a ztrátou hmotnosti. Mezi klinické projevy patří nechutenství, průjem nebo zácpa a celková slabost (Jurášek a Dubinský, 1993). Diagnostika onemocnění je prováděna koprologicky počítáním vajíček v trusu nebo identifikací larev L3 podle vytvořené kutikuly a podle délky chvostového konce larev (Letková *et al.*, 2010).



Obr. 2 Životní cyklus *Haemonchus contortus* u malého přežvýkavce (Fernandez, 2011).

2.3 Imunitní odpověď na parazita a jeho ochrana

Při migraci a přežívání helminta v cílových tkáních je potřeba eliminovat zejména útoky hostitelského imunitního systému. Na úrovni morfologických struktur helminta patří mezi nejstarší známé možnosti molekulární maskování a mimikry.

Maskování představuje proces zabudování hostitelských molekul do povrchových struktur helminta tak, aby byl tento parazit považován imunitním systémem za přirozenou součást hostitele. Jsou to např. Fc konce imunoglobulinů, cholesterol nebo α 2-makroglobulin. Někteří z parazitů mohou vybavit své povrchy regulačními bílkovinami, které inhibují aktivaci komplementového systému a brání sestavení membranolýtického komplexu MAC. Helminti mohou také na povrch transportovat různé enzymy, které napomáhají v odstraňování imunitně atraktivních antigenů i navázaných protilátek. U gastrointestinálních nematod (GIN) jsou do prostředí mezi parazitem a povrchem hostitele secernovány rozmanité biologicky aktivní látky - proteolytické enzymy. Ochranu parazitům před proteolytickými obrannými mechanismy ze strany hostitele poskytují inhibitory proteolytických enzymů. Parazitární helminté jsou také schopni odvrhovat části svých povrchových struktur, jsou-li vystaveni imunitní odpovědi. Po vazbě některé ze solubilních složek imunitního systému jsou ještě před jejich funkčním působením povrchové komplexy odhozeny, a tak je zabráněno působení daného faktoru (Krejsek a Kopecký, 2004; Volf a Horák, 2007; Sutherland a Scott, 2010).

GIN indukují v hostiteli tvorbu specifických protilátek v třídě IgE, které jsou odpovědné za imunopatologickou reaktivitu I. typu (Kooyman *et al.*, 1997). Ve sliznicích jsou akumulovány žírné buňky s navázanými IgE protilátkami, které jsou po interakci s parazitárními antigeny degranulovány. V tkáních a periferní krvi je obvykle výrazná eozinofilie (Rainbird *et al.*, 1998; Balic *et al.*, 2006). Látky uvolňující se z eozinofilů v důsledku degranulace, která je indukovaná parazity, působí cytotoxicky na GIN, ale jsou také příčinou poškození tkání hostitele. Popsaná imunitní odpověď na infekci GIN odpovídá zvýšené aktivitě subsetů TH2 T lymfocytů (Jankovic *et al.*, 2001).

2.4 Terapie helmintóz

K terapii parazitárních infekcí se v současnosti používá řada anthelmintik, která můžeme rozdělit do několika skupin podle mechanismu účinku, chemické struktury (Tabulka 1) nebo podle druhu helminta, na kterého působí. V následujícím výčtu se budeme zabývat pouze léčivy působícími proti GIN.

Aby léčivo bylo účinné, musí proniknout skrz tvrdou vnější kutikulu parazita, nebo získat přístup do jeho zažívacího traktu v dostatečné koncentraci, což může být velice obtížné.

Benzimidazolová anthelmintika jsou nejrozsáhlejší skupinou antinematod odvozenou od jediné chemické struktury. Působí i na *Cestoda* a *Trematoda*. Existuje jich celá řada, ale mezi nejznámější patří albendazol (ABZ) a thiabendazol (THB). Brown *et al.* (1961) poprvé demonstroval účinek THB proti řadě GIN. Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových subjednotek při tvorbě mikrotubulů s následnou inhibicí tvorby adenosintrifosfátu a tedy nedostatkem energie, což vede k hynutí dospělých parazitů i jejich vývojových stádií. Benzimidazoly mají mnohonásobně větší afinitu k parazitárnímu typu β -tubulinu než k savčímu, a proto nedochází k vedlejším účinkům na ošetřovaném zvířeti (Kohler, 2001; Lamka a Ducháček, 2006).

Imidazothiazoly společně s tetrahydropyrimidiny patří do jedné rodiny anthelmintik se stejným mechanismem účinku. Fungují jako agonisté nikotin-acetylcholinových receptorů ve svalech červů. Zvyšují vodivost membrány a způsobují její depolarizaci tím, že otevírají neselektivní iontové kanály pro draselné i sodíkové ionty. Dochází ke kontrakci svaloviny a následně ke spastické paralýze. Do této skupiny anthelmintik patří např. levamizol, morantel a pyrantel, které mají pouze antinematodní účinky (Martin, 1997; Lamka a Ducháček, 2006). Prvotním členem byl tetramizol, aminothiazolový derivát, u kterého byla pozorována anthelmintická aktivita proti třem různým druhům parazitů u kuřat (Thienpont *et al.*, 1966). Tetramizol je racemická směs. Po chirální separaci se zjistilo, že významný protiparazitární účinek má L-isomer, který je v současnosti komerčně vyráběn jako levamizol (Sutherland a Scott, 2010).

Makrocyclické laktony se dělí na avermektiny a milbemyciny. Skupina avermektinů, která byla poprvé popsána v roce 1979, je fermentačním produktem aktinomycety rodu *Streptomyces avermitilis* a nejvýznamnějším anthelmintikem této skupiny je ivermektin. Do skupiny milbemycinů patří moxidektin. Ten je odvozený od nemadektinu, který je fermentačním produktem *Streptomyces cyanogriseus noncyanogenus* (Shoop *et al.*, 1995; Sutherland a Scott, 2010). Mají antinematodní účinek a na parazita působí stejným mechanismem. Ten byl zpočátku spojován s ovlivněním GABA (kyselina γ -aminomáslená) neurotransmise na

nervových vlákních parazitů, avšak poslední studie přiřadily významnější roli glutamátu na receptorech ovládajících chloridové kanály (Prichard, 2001).

Mezi další používaná antinematoda ve veterinární praxi patří emodepsid, derkvantel nebo klosantel. Všechna léčiva působí proti GIN, ale s jiným mechanismem účinku. Jedná se o látky zasahující do metabolismu parazita nebo mající účinek na jeho nervový systém (Sutherland a Scott, 2010).

Mnohačetné lékové resistance jsou v současné době dokumentovány pro všechny třídy anthelmintik, což se stalo velkým problémem pro chovatele přežvýkavců po celém světě. Zvýšený výskyt resistance helmintů přispěl k vývoji nové třídy anthelmintik, AAD. Jedná se o sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které vznikají reakcí alkylfenolu s chloracetonem, Streckerovou syntézou, a následnou acylací aminu s arylchloridem (Kaminsky *et al.*, 2008). V současnosti je jediným schváleným léčivem ze třídy AAD MOP, komerčně nazvaný Zolvix® od firmy Novartis AG. Vyskytuje se ve dvou enantiomerních formách, z nichž S-enantiomer je biologicky účinný (Ducray *et al.*, 2008). S objevem genu *acr-23* v *Caenorhabditis elegans* bylo možné identifikovat homologní gen citlivý pro AAD i u *H. contortus*, který byl nazván *mptl-1*. MOP působí právě na specifický receptor nikotin-acetylcholinu *mptl-1* u nematod (Kaminsky *et al.*, 2008; Rufener *et al.*, 2009). Tento receptor není přítomen u savců, a proto pro ně není toxický (Rufener *et al.*, 2009).

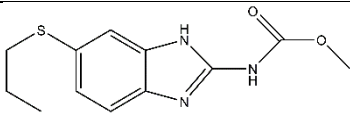
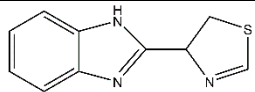
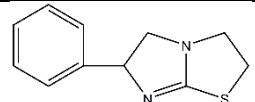
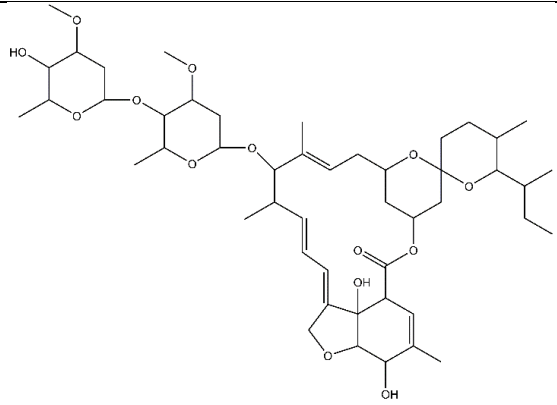
Kombinace dvou nebo více anthelmintik z různých rodin do jednoho výrobku může vést k rozšíření spektra a zlepšení účinnosti. Dobson *et al.* (2011) testoval účinnost MOP v kombinaci s dalšími anthelmintiky na *T. circumcincta* a *H. contortus*. Mezi nejlepší možnosti léčby byl zařazen MOP se směsí anthelmintik (benzimidazoly, levamizol a abamektin) nebo MOP s moxidektinem. Přestože byla potvrzena zvýšená anthelmintická účinnost kombinací léčiv, s největší pravděpodobností nebude v praxi využívána z důvodu vysoké nákladovosti (Dobson *et al.*, 2011).

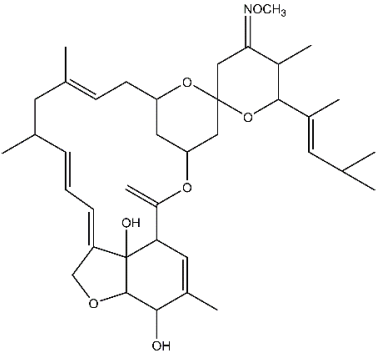
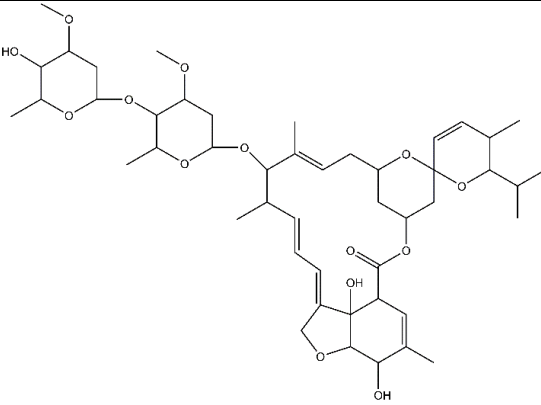
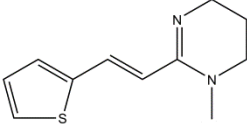
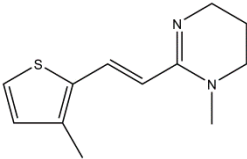
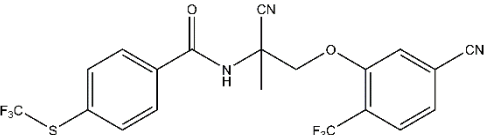
Mezi alternativní léčbu helmintózy patří použití oxidu měďnatého nebo různých extraktů z rostlin. Už malé množství oxidu měďnatého (2,5 – 5 mg) podané ovčím dokáže redukovat počet *H. contortus* (Knox, 2002), avšak s negativním účinkem na březí samice (Burke *et al.*, 2005). Z rostlinných extraktů byly testovány kondenzované taniny (Paolini *et al.*, 2003), které měly anthelmintický účinek jak na

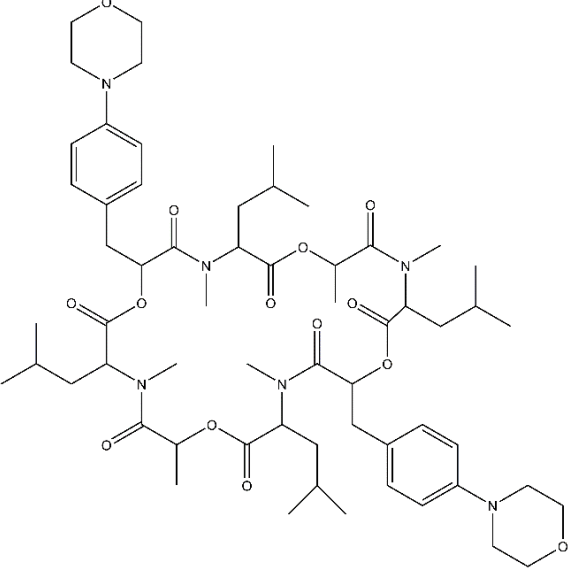
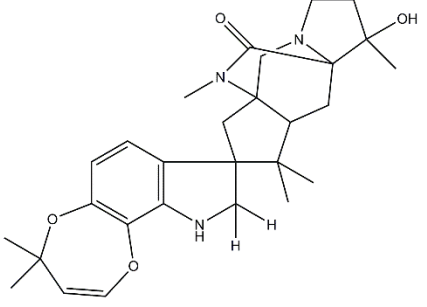
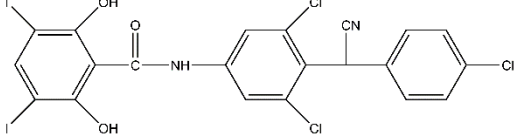
H. contortus tak i na *T. colubriformis*. Dále byla testována *Calotropis procera* (Athanasiadou *et al.*, 2000) se stejným redukujícím účinkem na *H. contortus* (Iqbal *et al.*, 2005). Tyto rostliny mohou být slibnou budoucností pro léčbu helmintóz.

V důsledku nárůstu lékové resistance se obnovil velký zájem najít funkční vakcínu. V ideálním případě by měla mít vysokou účinnost a být komerčně dostupná ve veterinární praxi. Zatím nejslibnější vakcína pro malé přežvýkavce je založena na tzv. skrytém antigenu, specificky cílená pro *H. contortus* (Knox *et al.*, 2003). Skrytým antigenem se rozumí ten, který není hostitelem rozeznáván a nevyvolává imunitní reakci při běžné infekci. Jedná se o epiteliální buňky trávicího traktu Vlasovky slézové (Getachew *et al.*, 2007). Pozdní stádia a dospělí jedinci *H. contortus* po nasátí krve hostitele vyvolají imunitní odpověď, která má negativní dopad na helminta (Knox *et al.*, 2003). V současnosti se však ještě nepodařilo ji zařadit do veterinární praxe.

Tabulka 1 Rozdělení do skupin a struktury jednotlivých anthelmintik.

Benzimidazolová anthelmintika		Albendazol	
		Thiabendazol	
Imidazothiazolová anthelmintika		Levamisol	
Makrocyclické laktony	Avermektiny	Ivermektin	

	Milbemiciny	Moxidectin	
		Abamektin	
Tetrahydropyrimidiny		Pyrantel	
		Morantel	
Aminoacetonitrilové deriváty		Monepantel	

Další anthelmintika	Emodepsid	
	Derkvantel	
	Klosantel	

2.5 Helmintoresistence

První případ benzimidazolové resistance u ovcí se objevil na farmě v Cheshire přibližně po dvaceti letech od zavedení THB na trh ve Velké Británii (Britt, 1982). Následně Cawthorne & Cheong (1984) testovali ovce na jihu Velké Británie a evidovali rezistenci *H. contortus* na THB u 13,5 % testovaných farem. V osmdesátých letech minulého století se resistance začala objevovat po celé Evropě i na další anthelmintická léčiva (levamisol, ivermektin, moxidectin) (Sutherland a Scott, 2010). Coles *et al.* (2006) definoval, že resistance nastává při významném snížení odpovědi na léčbu a je definitivně prokázána, když léčba při podání maximální dávky léčiva, které je hostitel schopen tolerovat, nevykazuje žádný účinek. Snížení odpovědi může probíhat několika možnými způsoby. Můžeme mezi ně zařadit dědičný pokles účinnosti anthelmintika proti parazitům, kteří jsou obecně citliví na dané léčivo (Shalaby, 2013). Což znamená, že vývoj resistance probíhá předáváním

rezistentního genu na následující generaci. Benzimidazolová resistance je spojována s mutacemi v β -tubulinu (Lacey a Gill, 1994). První popsanou změnou byla záměna 200. aminokyseliny tyrosinu za fenylalanin u izotypu 1 β -tubulinu (Kwa *et al.*, 1994; Elard *et al.*, 1996). Existují však i rezistentní populace parazitů, u kterých je fenylalanin na 200. aminokyselině zachován, ale dochází k mutaci na 167. pozici (Prichard, 2001). U malých přežvýkavců se obecně anthelmintická resistance (AR) začala stávat čím dál tím větším problémem (Jackson a Coop, 2000) a to zejména u rodů *Teladorsagia*, *Haemonchus* a *Trichostrongylus* (Papadopoulos *et al.*, 2010).

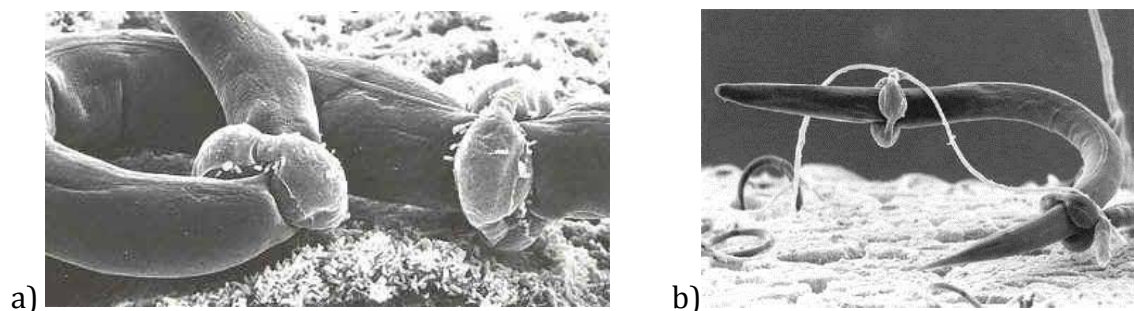
V současné době se ve výzkumu používají různě citlivé kmeny *H. contortus* na daná léčiva. Řadíme mezi ně kmeny citlivé SE (Susceptible Edinburgh), které byly izolovány v době před nasazením anthelmintik. Postupným křížením vznikl citlivý kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh) a rezistentní kmen IRE (Inbred Resistant Edinburgh) (Roos *et al.*, 2004). Dalším hodně užívaným kmenem je WR (White River), který byl získán z farem v Jihoafrické republice a je u něj prokázána resistance na benzimidazolová anthelmintika, ivermektin, radoxanid a na klosantel (van Wyk a Malan, 1988).

2.5.1 Příčiny a prevence

Současným trendem je komplexní profylaktická terapie celého stáda nebo selektivní terapie klinicky nemocných zvířat prováděná ve spolupráci veterináře a chovatele. Avšak nadměrná aplikace nebo časté použití stejné skupiny anthelmintik podporuje vývoj rezistentních kmenů parazitů a dochází tak k ekonomickým ztrátám. Proto je potřeba dbát na správné zacházení a používání léčiv (Taylor a Hunt, 1989). Existují důkazy, že resistance se vyvíjí častěji v regionech, kde jsou hospodářská zvířata pravidelně anthelmintiky léčena. Dalším faktorem vzniku resistance je poddávkování, což může způsobit přežití více odolných jedinců (Smith, 1990). Neméně důležitou roli hraje rozdílná biologická dostupnost v různých hostitelských druzích, která je zásadní při rozhodování o správné terapeutické dávce (Getachew *et al.*, 2007).

Mezi preventivní opatření patří např. použití biologické ochrany, strategie pastvy nebo přísná karanténní opatření u nových přírůstků. Každá z možností prevence by měla být využita, aby se minimalizovalo použití anthelmintických léčiv a předešlo se tak vývoji helmintoresistence (Getachew *et al.*, 2007).

Příkladem biologické ochrany proti GIN je použití některých druhů nematofágních hub s potenciálem snížení larvální populace na pastvině. Jsou to půdní organismy mikroskopických rozměrů. Byly identifikovány dvě hlavní skupiny těchto hub: houby, které produkují adhezivní nebo neadhezivní pasti na nematody (Obr. 3) a endoparazitické houby, které infikují nematody nebo jejich vajíčka. Mezi tyto houby patří *Drechumeria coniospora* a *Harposporium anguillulae*, které působí proti *H. contortus*, zatímco *Arthrobotrys oligospora* a *A. robusta* jsou houby mající vliv na ostatní druhy *Haemonchus* (Larsen, 2000).



Obr. 3 Ukázka adhezivní (a) a neadhezivní (b) parazitární pasti u houby (ihavemeaning.livejournal.com).

Studie ve vlhkých tropických klimatech prokázaly, že nejvyšší koncentrace larev *H. contortus* a *Trychostrongylus* byla na pastvě přibližně jeden týden po kontaminaci a během devíti týdnů klesla na sotva zjiřitelnou hladinu. Střídání hostitelských druhů na pastvinách, střídání samotných pastev a jejich obdělávání, jsou hlavní metody řízení, které poskytují bezpečnější prostředí pro hospodářská zvířata (Banks *et al.*, 1990).

Přijetí přísných karanténních opatření by mělo být zavedeno pro všechny nové přírůstky do hospodářského chovu. Probíhat by mělo v suchém prostředí, kde je možné časté čištění výběhu. Následovat by měl 24 hodinový půst a přeléčení zvířete trojitou po sobě jdoucí dávkou anthelmintik (moxidectin, levamisol, ABZ) a provedením testu redukce počtu vajíček v trusu (FECRT; Faecal Egg Count Reduction Test) (Fleming *et al.*, 2006).

2.5.2 Diagnostické metody

Velký význam včasného odhalení lékové resistance helmintů vedl k rozvoji široké škály spolehlivých a standardizovaných detekčních testů pro výzkumné a diagnostické účely (Coles *et al.*, 1992). Přítomnost resistance může být detekována buď pomocí *in vivo* testů, které jsou spolehlivé pro všechna anthelmintika nebo častěji využívanými *in vitro* testy, kdy se měří vývoj, růst nebo pohyblivost nematod (Jabbar *et al.*, 2006). Nejpoužívanější *in vivo* metodou je test FECRT, který je založený na základě porovnání počtu vajíček helmintů před léčbou a v definovaných časech po ošetření. Doba odběru závisí na použité anthelmintické skupině. Pro počítání vajíček v trusu se používá McMaster techniky, kdy se určuje hodnota EPG (Eggs Per Gram) – počet vajíček nematod na 1 gram trusu (Letková *et al.*, 2010). Pokud je snížení procenta počtu vajíček větší jak 95 %, pak lze anthelmintickou léčbu považovat za účinnou a může se v ní pokračovat (Coles *et al.*, 2006). *In vitro* testy můžeme rozdělit na dvě skupiny, a to na farmakologické, kde je výsledný efekt dosažený přímým působením na fyziologické funkce parazitů, a na biochemické, při kterých vyhodnocujeme vliv anthelmintika na některé biochemické pochody (např. navázání anthelmintika na tubulin larev nebo navázání eserinu na receptory) (Letková *et al.*, 2010). Častou *in vitro* metodou je test líhnutí vajíček (EHT; Egg Hatch Test), který poprvé popsal Le Jambre (1976) a používá se na detekci resistance vůči benzimidazolům. Test je založen na oxicidní vlastnosti benzimidazolů a porovnání schopnosti vajíček vyvíjet se v různých koncentracích léčiva (Letková *et al.*, 2010). Omezujícím prvkem těchto dvou testů je, že jsou schopny detekovat AR, pokud populace parazitů obsahuje alespoň 25 % rezistentních jedinců (Martin *et al.*, 1989). Několik testů je prováděno na larválních stádiích. Patří mezi ně test larválního vývoje (MALDT; Micro-Agar Larval Development Test), test larvální motility a paralýzy. MALDT je založen na schopnosti larev přežít a vyvíjet se v prostředí s různou koncentrací anthelmintik (Letková *et al.*, 2010) a je považován za citlivější než EHT a FECRT (Dobson *et al.*, 1996).

Vzhledem k tomu, že resistance má genetický základ, nabízí se zde možnost využití molekulárních metod pro identifikaci rezistentních alel. Specifičnost sond používaných pro tyto účely společně s jejich náklady omezují použití v rutinní diagnostice, a proto se používají pouze ve výzkumu (Sutherland a Scott, 2010), kde

je PCR (polymerázová řetězová reakce) schopna detekovat 1 % odolných jedinců v citlivé populaci nematod (Roos *et al.*, 1995).

Jedním z dalších přístupů diagnostiky je systém FAMACHA, který byl vyvinutý jihoafrickou firmou. Je jednou z nejlepších metod pro snížení nutnosti pravidelných protihlístových ošetření proti *H. contortus* u ovcí, čímž dochází ke snížení rizika vývoje resistance a nákladů na léčbu. Tato metoda je založena na klinické identifikaci vývoje anémie u jednotlivých zvířat ve stádě a to prostřednictvím pozorování zbarvení jejich spojivkového vaku (Obr. 4) (van Wyk a Bath, 2002).



Obr. 4 FAMACHA test a jeho hodnotící systém (ziegenzucht-bayern.de).

2.6 Biotransformace xenobiotik

Enzymy metabolisující xenobiotika určují, jak bude dané léčivo nebo jiné xenobiotikum biotransformováno. V případě anthelmintik mají aktivita enzymů parazita i hostitele podstatný vliv na farmakoterapii helmintóz. Např. se zvýšenou aktivitou enzymů u hostitele dochází ke snížení plasmatické hladiny anthelmintika, což může mít za následek selhání farmakoterapie. Tento pokles plasmatických hladin účinných látek zvyšuje šanci parazitů na přežití po aplikaci léčiva. Indukce enzymů u hostitele může tak nepřímě přispívat k rozvoji AR (Geerts a Gryseels, 2000; Cvilink *et al.*, 2009).

Obecným cílem biotransformace xenobiotik je změna jejich struktury s omezením vstupu do dalších orgánů nebo tkání s následným snížením potenciální toxicity a usnadnění eliminace. Na základě této změny vznikají látky (metabolity), které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Této přeměně napomáhá řada

enzymů s různou substrátovou specifitou. Poznání enzymů, které jsou za metabolismus xenobiotika zodpovědné, je důležité pro předpověď nežádoucích účinků a potenciálních interakcí (Skálová *et al.*, 2011). Biotransformační enzymy jsou široce rozšířeny v celém organismu a jsou přítomny v několika subcelulárních kompartmentech. U obratlovců jsou játra nejbohatším zdrojem biotransformačních enzymů, které se však mohou vyskytovat i v kůži, plicích, nosní sliznici, gastrointestinálním traktu a ve spoustě dalších tkání (Gram, 1980; Farrell, 1987; Krishna a Klotz, 1994).

Obecně platí, že metabolismus xenobiotik se skládá ze tří fází. Oxidace, redukce nebo hydrolýza xenobiotika patří do I. fáze metabolismu. V tomto kroku se reaktivní a hydrofilní skupiny odhalují nebo se zavádějí do molekuly xenobiotika funkční skupiny, např. -OH, -NH₂, -SH nebo -COOH. Výsledkem je především zvýšení hydrofility a tedy polarity xenobiotika, které bývá lépe rozpoznatelné pro transportní a exkreční systémy. Zavedené funkční skupiny se stávají častým místem pro pokračující II. fázi biotransformace (Parkinson, 2001). V druhé fázi mohou xenobiotika nebo metabolity I. fáze podstoupit konjugační reakce s endogenními látkami. Mezi tyto reakce patří glukuronidace, sulfatace, acetylace, methylace, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami (Paulson *et al.*, 1986). Aktivní transport substrátů, metabolitů nebo konjugátů přes membrány, zprostředkovaný speciálními proteinovými přenašeči, je považován za třetí fázi metabolismu xenobiotik.

Všechny tři systémy: enzymy I. fáze, II. fáze a transportéry slouží k detoxikaci potenciálně škodlivých cizorodých látek a jejich aktivity jsou klíčové pro působení xenobiotik v organismu. Obecně platí, že výchozí látky a metabolit nebo konjugát se liší jak biologickou aktivitou (včetně toxicity), tak i chováním. Výskyt a činnost enzymů určuje způsob a rozsah, jak bude xenobiotikum metabolisováno. Proto tyto enzymy zásadně ovlivňují biologické účinky xenobiotik, které jsou požadované, ale můžou být i nežádoucí (Testa, 1995).

2.6.1 Reakce I. fáze biotransformace

Oxidace

Cytochromy P450 (CYPs) patří mezi enzymy na první místo, pokud jde o katalytickou všestrannost (Guengerich, 1991; Waterman a Johnson, 1991). Jedná se

o monooxygenasy a jejich základní funkcí je vázat jeden kyslíkový atom do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody (Skálová *et al.*, 2011). Tato reakce se používá jak pro detoxikaci xenobiotik, tak i pro biosyntézu mnoha endogenních látek (Hamdane *et al.* 2008). Mohou vykazovat oxidasovou, peroxidasovou i reduktasovou aktivitu. Nejvyšší koncentrace CYPs se nachází v jaterním endoplasmatickém retikulu. Mikrosomální a mitochondriální CYPs hrají klíčovou roli v biosyntéze nebo katabolismu steroidních hormonů, žlučových kyselin, vitamínů rozpustných v tucích a mastných kyselin. Jedná se o hemové proteiny. Železo v hemu je obvykle ve formě Fe^{3+} . Pokud dojde k redukci na Fe^{2+} , může na sebe vázat molekulu kyslíku nebo molekulu CO (Parkinson, 2001). U člověka bylo identifikováno 57 genů pro CYPs a nalezeno 18 isoform, které jsou schopny metabolisovat xenobiotika (Wrighton a Stevens, 1992; Guengerich, 1994; Nebert *et al.*, 2013).

Flavinové monooxygenasy (FMO) jsou přítomny v mnoha tkáních především v jaterní, plicní a ledvinové, a zajišťují především oxidaci xenobiotik obsahující pouze jeden heteroatom dusíku, síry nebo fosforu (Ziegler, 1993; Lawton *et al.*, 1994; Cashman, 1995, 1999; Rettie a Fisher, 1999). Jedná se o membránové proteiny lokalizované na hladkém endoplasmatickém retikulu. Mají monomerní strukturu a obsahují jednu molekulu flavinového koenzymu FAD (flavinadenindinukleotid). Jsou to mikrosomální enzymy vyžadující přítomnost NADPH nebo NADH, jako zdroj elektronů, a molekulární kyslík. FMO rodina zahrnuje 5 isoform (FMO1- FMO5). Katalyzují oxidaci nukleofilních terciárních aminů na *N*-oxidy a sekundárních a primárních aminů na hydroxylaminy. Můžou také oxidovat xenobiotika obsahující síru (thioly, thioestery nebo thiokarbamáty) (Parkinson, 2001; Huijbers *et al.*, 2014).

Mezi další enzymy podílející se na oxidaci xenobiotik patří alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, molybdenové hydroxylasy, peroxidasy a další.

Hydrolyza

Hlavní roli v těchto reakcích hraje molekula vody, která se jako reakční složka štěpí za současného štěpení molekuly substrátu. Nebo může adicí vody na molekulu substrátu docházet k jeho hydrataci (Testa a Krämer, 2008). Mezi enzymy

hydrolýzy patří např. karboxylesterasy, cholinesterasy, peptidasy nebo epoxid hydrolasy. Hydrolyzují xenobiotika obsahující funkční skupinu esterů, amidů, thioesterů, epoxidů, hydrazidů nebo karbamátů (Sato a Hosokawa, 1998).

Redukce

Reduktasy můžeme dělit do tří hlavních nadrodin reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR), se středně dlouhým řetězcem (MDR) a aldo-ketoreduktasy (AKR). Redukci podléhají xenobiotika obsahující např. aldehydovou, ketonovou, azo- nebo nitro- skupinu a může docházet buď k enzymové, nebo neenzymové reakci. Tyto enzymy jsou monomerní a NADPH dependentní, jsou přítomny v krvi a v cytosolické frakci jater, ledvin, mozku a dalších tkání. Redukce azo- a nitro- skupiny probíhá ve střevní mikroflóře. Reakce je inhibována kyslíkem, a proto bývá anaerobní prostředí vhodné pro tento typ reakcí (Parkinson, 2001; Malátková a Wsól, 2014). Redukce aldehydů na primární alkoholy a ketonů na sekundární alkoholy je katalyzována alkoholdehydrogenasami a karbonylreduktasami (Weiner a Flynn, 1989). Těmito reakcemi mohou být redukována i xenobiotika obsahující dusík, síru, halogeny i anorganické sloučeniny.

2.6.2 Reakce II. fáze biotransformace

Glukuronidace

Konjugace s kyselinou glukuronovou je jedna z hlavních metabolických reakcí u savců s výjimkou kočkovitých šelem (Burchell a Coughtrie, 1992; Mackenzie *et al.*, 1992; Miners a Mackenzie, 1992; Burchell, 1999; Tukey a Strassburg, 2000). Kofaktorem je UDP-glukuronová kyselina a reakci katalyzuje UDP-glukuronosyltransferasa, která je lokalizovaná v endoplasmatickém retikulu především v jaterní tkáni, ale i v mnoha dalších tkáních. Zahrnuje přenos aktivované α -D-glukuronové kyseliny na substrát. Ty tvoří po glukuronidaci *O*-, *N*- nebo *S*-glukuronidy podle toho jakou funkční skupinu obsahují. Glukuronové konjugáty xenobiotik a endogenních látek jsou polární a ve vodě rozpustné, a proto jsou z těla vylučovány močí nebo žlučí v závislosti na molekulární hmotnosti (Parkinson, 2001; Kaivosaari *et al.*, 2011).

Konjugace s glutathionem

Tato reakce využívá jako kofaktor endogenní tripeptid glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin; GSH) a je katalyzována glutathion-S-transferasami. Tyto enzymy jsou přítomny ve většině tkání, s vysokou koncentrací v játrech, střevech, ledvinách, nadledvinkách a plicích, lokalizované v cytoplasmě, endoplasmatickém retikulu a mitochondriích. Ke konjugaci může docházet jak enzymaticky tak i neenzymaticky, což je způsobené vysokou koncentrací GSH ve tkáních. Konjugační reakce můžeme rozdělit do dvou typů: nukleofilní substituce (reakce GSH se silně elektrofilními skupinami nebo se sloučeninami obsahujícími kov) a adice (reakce GSH se sloučeninou obsahující dvojnou vazbu). Konjugace glutathionu je snížena přítomností některých funkčních skupin (-OH, -NH₂, -OR) a naopak je zvýšena přítomností substituentů (-F, -Cl, -Br, -I) nebo skupin (-CN, -NO₂, -COOH). GSH konjugáty jsou vyloučeny žlučí nebo jsou dále přeměněny na deriváty merkapturové kyseliny a vyloučeny močí (Parkinson, 2001; Skálová *et al.*, 2011).

Konjugace s aminokyselinami

Existují dvě hlavní cesty konjugace s aminokyselinami. První cesta zahrnuje xenobiotika obsahující karboxylovou skupinu, která reaguje s aminoskupinou aminokyselin, jako jsou glycin, glutamin a taurin. Při druhé cestě dochází ke konjugaci xenobiotik obsahujících aromatický hydroxylamin s karboxylovou skupinou aminokyselin serinu a prolinu (Kato a Yamazoe, 1994). V první fázi je aktivován substrát působením acyl-CoA-synthasy za spotřeby ATP, kdy se acyl aktivovaného karboxylu přesouvá na aminoskupinu. Konečná konjugace aminokyselin je katalyzována *N*- nebo *O*-acyltransferasami. Reakce probíhá tzv. ping-pongovým mechanismem a výsledné metabolity jsou vylučovány žlučí nebo močí (Parkinson, 2001).

Sulfatace, Methylace a Acetylace

Mnoho xenobiotik a endogenních látek, které podstupují *O*-glukuronidaci podléhají sulfataci. Tyto konjugáty produkují ve vodě rozpustné estery kyseliny sírové. Reakce je katalyzována sulfotransferasami, cytosolickými enzymy, které jsou lokalizované primárně v játrech a dále v ledvinách, trávicím traktu, plicích a mozku. Kofaktorem je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát. Největší skupinou substrátů jsou fenoly, alifatické

alkoholy a aminy. Vzniklé metabolity jsou vylučovány především močí nebo žlučí, protože se jedná o látky polární (Parkinson, 2001).

Methylace patří mezi méně časté cesty biotransformace. Odlišuje se od většiny reakcí II. fáze biotransformace, protože snižuje rozpustnost xenobiotik ve vodě, zvyšuje tedy lipofilitu. Methylaci zajišťují *O*-, *N*- nebo *S*-methyltransferasy, podle toho jaký heteroatom substrát obsahuje. Kofaktorem je *S*-adenosylmethionin (Parkinson, 2001).

N-acetylce je hlavní biotransformační cestou xenobiotika, které obsahuje aromatický amin nebo hydrazinovou skupinu, které se přeměňují na aromatické amidy nebo hydrazidy (Evans, 1992). Tato reakce je katalyzována *N*-acetyltransferasami za účasti kofaktoru acetyl-CoA. Jedná se o cytosolické enzymy nacházející se v jaterní tkáni a v mnoha dalších savčích tkáních s výjimkou ve tkáních u psů a lišek (Vatsis *et al.*, 1995).

2.6.3 Transportéry

Mnoho xenobiotik, metabolitů a konjugátů není schopno samovolně procházet přes lipidovou membránu. Proto musí být tyto látky přepravovány pomocí specifických transportních proteinů. Transportéry mají širokou substrátovou specifitu a jsou schopny přepravovat strukturálně odlišné sloučeniny. Transportéry mohou být rozděleny do několika skupin: např. podle toho v jaké formě přijímají energii, nebo podle směru transmembránového přenosu (Cvilink *et al.*, 2009; Skálová *et al.*, 2011).

Zejména rodina ABC transportérů (ATP-binding cassette) má velký význam v souvislosti se vznikem lékové resistance (Cvilink *et al.*, 2009). Jedná se o rodinu tzv. effluxních transportérů, přepravující substrát proti gradientu transportované látky. Jsou zapojovány do detoxikačních procesů a byly nalezeny ve všech typech buněk (Linton a Higgins, 2007; The International Transporter Consortium, 2010; Skálová *et al.*, 2011).

2.7 Biotransformace xenobiotik u parazita *H. contortus*

Dlouhou dobu byli helminti považováni za výjimečnou třídu organismů, které nemají CYPs. Absence CYP u parazitických druhů by měla za následek omezení hlavních obranných mechanismů pouze na redukční a hydrolytické metabolické cesty I. fáze biotransformace (Kotze, 1997). Kotze (1997) studoval několik životních

stádií *H. contortus* a zjistil CYP monoxygenasovou aktivitu (aldrinepoxidasu a ethoxykumarin-*O*-deethylasu) v mikrosomech izolovaných z L1 a L3 larev *H. contortus*, zatímco u dospělců naměřil pouze nízkou aktivitu epoxidasu. Potenciální schopnost detoxikovat léčiva může mít velký význam v AR. Tyto enzymy hrají zřejmě hlavní roli v detoxikačním mechanismu.

Peroxidasu jsou jednou z dalších skupin enzymů, které mohou katalyzovat oxidaci xenobiotik. Přítomnost parazitů vede k aktivaci imunitního systému a ke zvýšení produkce volných radikálů, které mohou způsobovat vyloučení parazitů z hostitele. Avšak střevní paraziti mají jeden nebo více antioxidačních enzymů, které je před působením ROS chrání. Patří mezi ně katalasa, peroxidasu, glutathionperoxidasu, superoxiddismutasa, xanthinoxidasu, peroxidasu a peroxiredoxin (Kotze a McClure, 2001). Superoxiddismutasa a peroxiredoxin jsou pravděpodobně jedny z hlavních detoxikujících enzymů u helmintů (Dzik, 2006). U dospělců i larev *H. contortus* byla prokázána ochranná úloha katalasy, glutathionperoxidasu a peroxiredoxinu proti peroxidu vodíku (Kotze a McClure, 2001; Bagnall a Kotze, 2004).

Cvilink *et al.* (2008 a, b) a Vokřál *et al.* (2010, 2012, 2013) se ve svých studiích zabývali biotransformací benzimidazolových anthelmintik u *H. contortus*. Zjistili, že helminté jsou schopni metabolizovat anthelmintika FLU a ABZ. Pro studie bylo použito několik kmenů *H. contortus* s rozdílnou citlivostí na anthelmintika. U všech testovaných kmenů byly nalezeny stejné metabolity, avšak u rezistentních kmenů byly produkovány ve větším množství. Toto zjištění znamená potenciální schopnost parazita deaktivovat účinek daného léčiva a přispět tak k vývoji AR.

2.8 Využití LC/MS pro detekci a identifikaci metabolitů

Aplikace kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je neoptimálnějším přístupem pro citlivou detekci, identifikaci a kvantifikaci metabolitů I. a II. fáze biotransformace v komplexních biologických maticích (Holčapek *et al.*, 2008). Oproti NMR spektroskopii a rentgenové difrakci má několik výhod. Jedná se především o spojení jak s plynovou tak i s kapalinou chromatografií, nízkou spotřebu vzorku, extrémně vysokou citlivost a možnost získat požadované informace v poměrně krátkém časovém úseku při výběru vhodné ionizace a hmotnostního analyzátoru (Kamel a Prakash, 2006).

Prvním krokem je samotné zpracování vzorku před vlastní analýzou zahrnující vhodný výběr metodiky (vzorkování, homogenizace, výběr interního standardu, deproteinace, extrakce) následované správnou optimalizací chromatografických podmínek poskytující vysokou selektivitu a kompatibilitu s MS detekcí. Využití přídatných UV nebo fluorescenčních detektorů nám může dát cenné analytické informace doplňující výsledky z MS (např. rozlišení polohových izomerů). Vztah mezi strukturními změnami způsobenými metabolickými reakcemi a odpovídající změnou v chování retence je brán jako podpůrná informace pro identifikaci metabolitů. Základní informací při interpretaci hmotnostních spekter je molekulová hmotnost (MW) (Holčápek *et al.*, 2008). MS/MS je pak vhodný nástroj pro další strukturní charakterizaci kvůli výskytu fragmentových iontů a neutrálních ztrát (Císař *et al.*, 2005).

Metabolické změny xenobiotik většinou vedou ke zvýšení jejich polariry a tedy k poklesu retence v obrácených systémech (RP) ve vztahu k parentní látce. Nárůst polariry může být pak silný především u metabolitů II. fáze biotransformace. Oddělení jednotlivých metabolitů většinou vyžaduje použití gradientu nebo přidání modifikátoru do mobilní fáze pro zvýšení retence polárních konjugátů (Samuel *et al.*, 2003). Použití netěkavých pufrů a různých aditiv, jako jsou fosfátové pufrů a další anorganické přísady, není však vhodné pro spojení LC/MS z důvodu možné kontaminace iontového zdroje a iontové optiky (Gustavsson *et al.*, 2001; Ferrer a Thurman, 2005). Nejvhodnější je nahrazení těchto aditiv těkavými látky, které by však měly být v nejnižší použitelné koncentraci. Anorganické kyseliny v mobilní fázi by měly být nahrazeny organickými (např. kyselinou mravenčí nebo octovou) s koncentracemi nižšími než 0,1% (Mauriala *et al.*, 2005; Groff *et al.*, 2006), v některých případech i vyššími (Weimann *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006). Typické pro spojení LC/MS je použití těkavých solí a to octanu amonného nebo mravenčanu (Ferrer a Thurman, 2005; Chen *et al.*, 2005; Dear *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Link *et al.*, 2006).

Současným trendem ve farmaceutické analýze je zkrácení doby analýzy. Můžeme využít několika možných přístupů, mezi které patří např. zkrácení délky kolony společně se zmenšením průměru použitých částic nebo zvýšením teploty kolony. Jako stacionární fáze pro RP se nejčastěji používá silikagel s alkylovým řetězcem C18, avšak můžou se použít i fáze s kratším řetězcem C12 (Gasse a Guse,

2005; Gréen *et al.*, 2006) popřípadě i C8 (Kyle *et al.*, 2005; Lampinen-Salomonsson *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2006). Optimalizace separačních podmínek by neměla být zanedbána, protože i s možností MS/MS analýzy nelze některé strukturní izomery (např. polohové izomery nebo enantiomery) pomocí hmotnostní spektrometrie rozlišit (Yilmazer *et al.*, 2001).

V závislosti na struktuře, molekulové hmotnosti a polaritě stanovované látky by měla být vybrána vhodná ionizační technika. Ve spojení HPLC/MS/MS můžeme použít tři typy měkké ionizace, mezi které patří ionizace elektrosprejem (ESI; Electrospray Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI; Atmospheric Pressure Chemical Ionization) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI; Atmospheric Pressure Photoionization). Ionizace elektrosprejem je nejměkčí ionizační technika a používá se při analýze polárních až iontových látek především v proteomice a při identifikaci metabolitů léčiv (Holčapek *et al.*, 2008).

Funkcí hmotnostního analyzátoru je separace iontů podle jejich rozdílného poměru hmota/náboj (m/z). Můžeme je rozdělovat do skupin podle rozlišovací schopnosti na analyzátory s nízkou (kvadrupól; iontová past) a s vysokou (analyzátor doby letu, TOF; analyzátor s Fourierovou transformací) rozlišovací schopností. Ta charakterizuje kvalitu hmotnostní separace, jak blízké hodnoty m/z mohou být v hmotnostním analyzátoru rozlišeny. Nejrozšířenějším analyzátozem pro identifikaci metabolitů je hybridní tandemový hmotnostní analyzátor poskytující vysokou přesnost měření; kvadrupól-analyzátor doby letu (Castro-Perez *et al.*, 2005 a, b; Liu *et al.*, 2005; Nikolic *et al.*, 2004; Wind *et al.*, 2006).

2.9 Využití qPCR pro stanovení exprese genu

PCR je metoda snadného zmnožení (amplifikace) specifického úseku DNA, které je ohraničeno sekvencemi, na něž nasedají specifické oligonukleotidové sekvence nazývané primery. K syntéze nového vlákna DNA se používá termostabilní DNAPolymerasa, která v průběhu reakce na tyto primery nasedá, čímž zahajuje replikaci původního řetězce. Reakce probíhá v teplotních cyklech, které jsou nejčastěji tříkolové – denaturace, připojení primérů, syntéza (Saunders a Lee, 2013; Slabý *et al.*, 2015).

Metoda kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) umožňuje monitorovat přibývajícím množství produktu v průběhu celé reakce.

Zatímco u klasické PCR je případná kvantitativní analýza amplifikovaného produktu prováděna až po jejím skončení pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu.

Analýzy jsou založeny na detekci fluorescenčního signálu, který úměrně odpovídá množství vzniklého produktu. Grafickým výstupem je amplifikační křivka, zobrazující nárůst fluorescence v každém cyklu. Nastavením tzv. „threshold“ linie, odečítáme fluorescenci pro všechny vzorky v jedné hladině, získáme tím hodnotu Ct (Cycle threshold), čili cyklus, při němž došlo k překročení fluorescence danou „threshold“ linií (Saunders a Lee, 2013; Slabý *et al.*, 2015). Kvantifikace produktů může probíhat absolutně, porovnáním neznámých vzorků se standardy, nebo relativně. Při relativní kvantifikaci se společně s cílovými geny stanovuje i hladina exprese tzv. referenčního genu, která by měla být pro daný systém neměnná. Nejčastěji se používají např. *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa), *HPRT* (hypoxanthinfosforibosyltransferasa) nebo *18S-rRNA* (18S hydrogenasa). Tyto referenční geny se používají k normalizaci naměřených hodnot a umožňují porovnání vzorků (Schmittgen a Livak, 2008). Výsledkem je hodnota, která udává, kolikrát více/méně je zastoupen sledovaný gen v ovlivněném vzorku oproti kontrole.

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo získání nových poznatků o biotransformaci a účincích MOP a jeho derivátů u ovce a Vlasovky slézové.

Dílčími cíli bylo:

- Identifikovat metabolity I. a II. fáze biotransformace MOP *in vitro* v ovčích hepatocytech.
- Identifikovat metabolity I. a II. fáze biotransformace MOP u ovce (*Ovis spp.*) *in vivo*.
- Identifikovat metabolity I. a II. fáze biotransformace MOP u parazita Vlasovky slézové *ex vivo* a porovnat biotransformaci MOP u citlivého kmene ISE a multirezistentního kmene WR.
- Studovat účinek MOP na vývojová stádia Vlasovky slézové.
- Porovnat metabolismus a anthelmintický účinek dalších vybraných AADs .
- Studovat účinek MOP na aktivitu a expresi biotransformačních enzymů.
- Zpracovat informace o MOP dostupné z literatury i získané našimi experimenty do přehledného článku.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

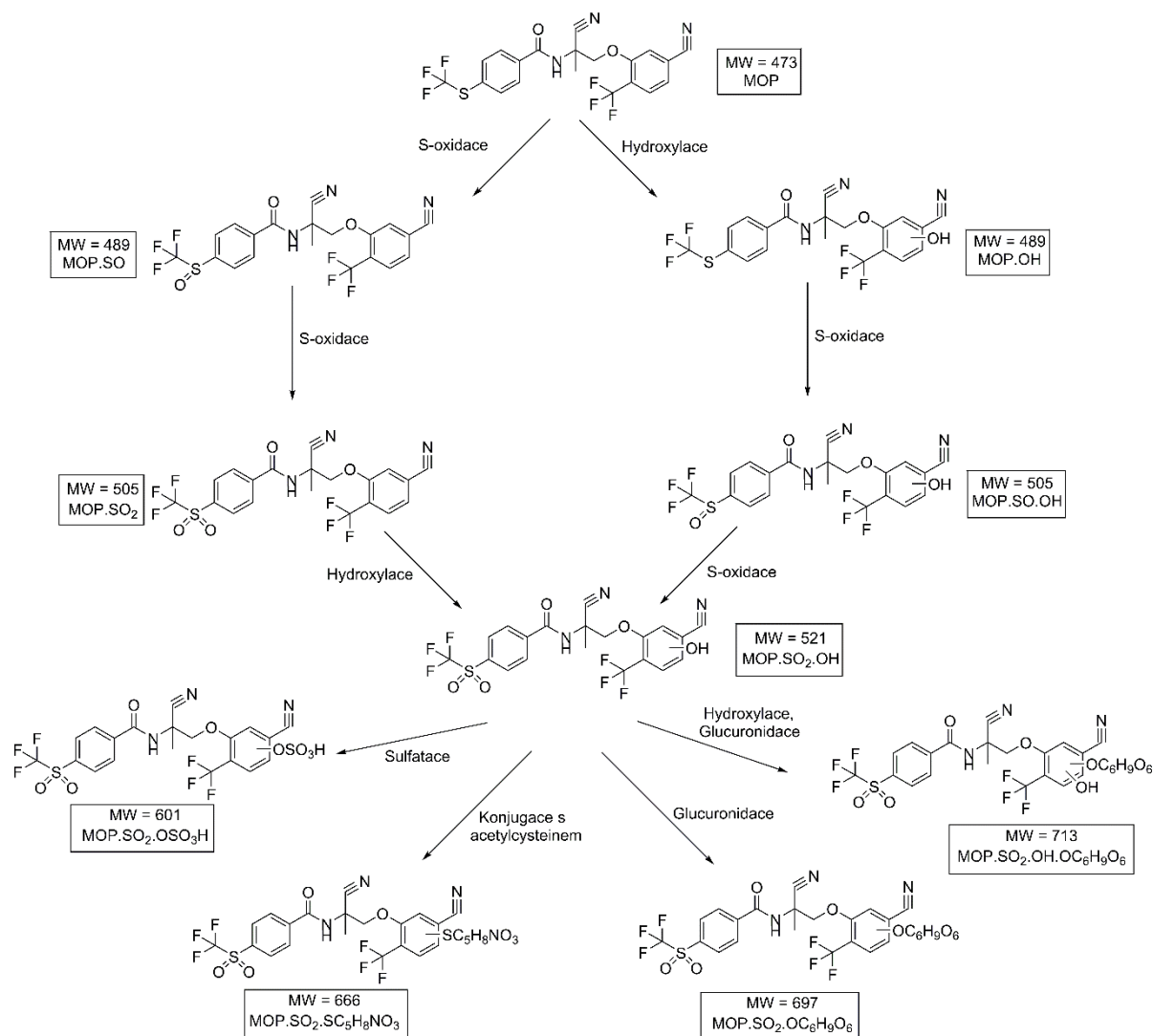
4.1 Metabolismus monepantelu *in vitro* v ovčích hepatocytech

- I. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Špulák, M., Holčapek, M., Szotáková, B., Bártíková, H., Pour, M., Skálová, L. (2013) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 1705-1712. IF₂₀₁₃ = 3,578

Ačkoli je studium metabolických drah anthelmintik velmi důležité pro účinnost léčby a hodnocení rizika lékových interakcí, biotransformace MOP u cílových zvířat nebyla dosud dostatečně zkoumána. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli identifikovat metabolity MOP a navrhnout metabolickou dráhu MOP u ovce *in vitro*.

K testování byla použita primární kultura ovčích hepatocytů. Ta byla získána dvoustupňovou kolagenasovou metodou. Po 24 hod inkubaci hepatocytů s MOP (10 μ M) následovala extrakce na pevných fázích. Detekce metabolitů byla provedena za použití spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií v negativním módu. Výhodou použitého analyzátoru QqTOF je vysoká rozlišovací schopnost, která dovoluje měřit hodnoty m/z s vyšší přesností a správností, a tedy možnost stanovit elementární složení metabolitu.

Získané výsledky ukazují schopnost ovčích hepatocytů metabolisovat MOP využitím biotransformačních enzymů I. i II. fáze. Mezi nalezené biotransformační dráhy patří *S*-oxidace, hydroxylace, glukuronidace, sulfatace a konjugace s acetylcysteinem (Obr. 5). Některé z nich (např. oxidace a hydroxylace) již byly dříve u jiných anthelmintik popsány (Karadzovska *et al.*, 2008; Kinsella *et al.*, 2011), avšak metabolity II. fáze nikoli. Na základě identifikovaných metabolitů bylo navrženo metabolické schéma MOP.



Obr. 5 Metabolické schéma MOP *in vitro* v ovčích hepatocytech.

4.2 Metabolismus monepantelu u parazita a jeho hostitele

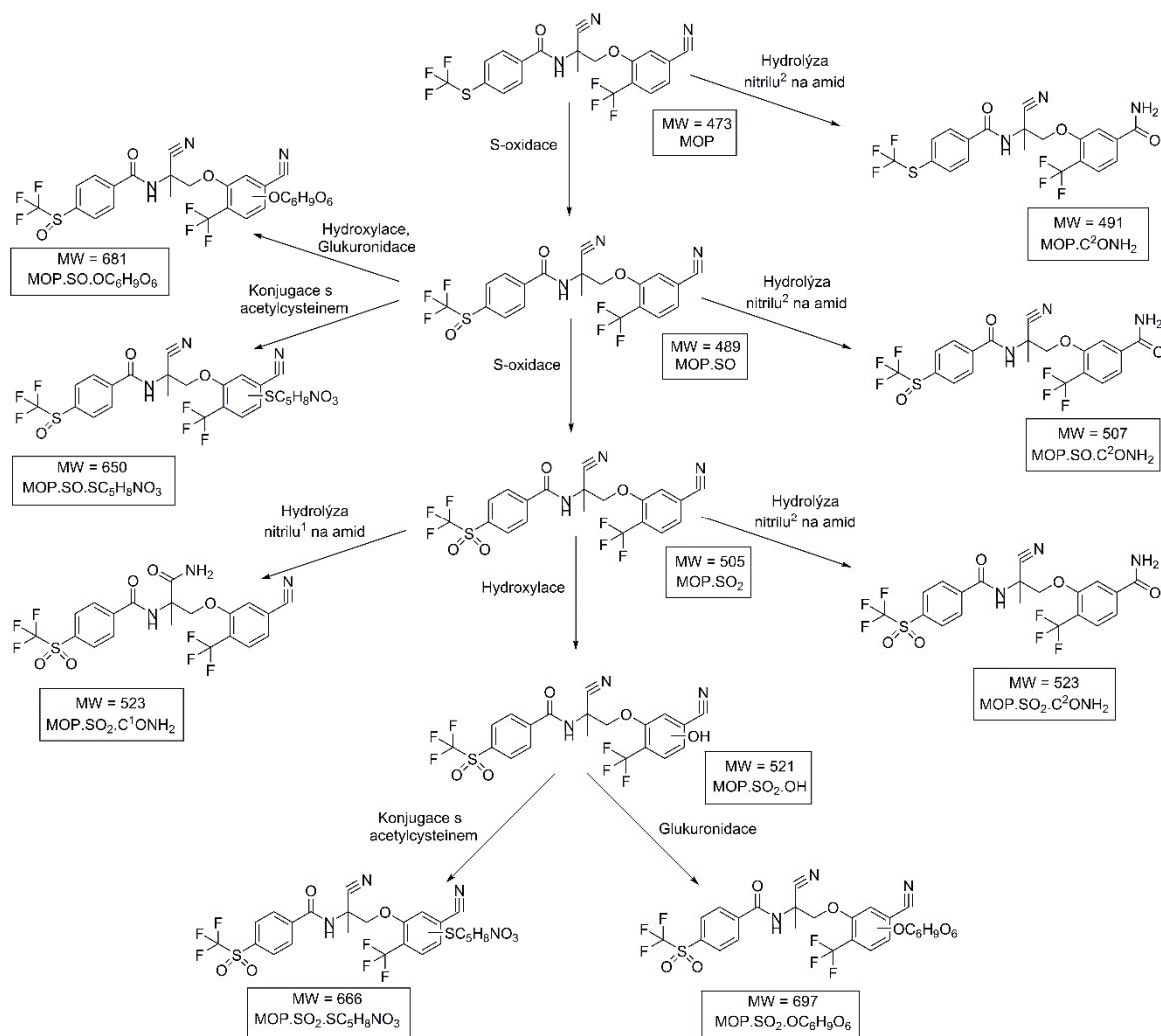
- II. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Valát, M., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2014) Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Testing and Analysis*. 6: 1055-1062. IF₂₀₁₃ = 2,816

Poznání metabolických drah anthelmintik je velmi důležité pro účinnost terapie i posouzení rizika vývoje lékové resistance helmintů. Ačkoli metabolismus MOP byl již prozkoumán *in vitro* v ovčích hepatocytech (Stuchlíková *et al.*, 2013), komplexní informace o metabolismu MOP *in vivo* chyběly. Také nebylo známo, zda jsou hlístice schopny MOP metabolisovat. Právě biotransformační enzymy mohou do určité míry chránit organismus parazita proti působení anthelmintik (a xenobiotik obecně) a schopnost parazita metabolisovat podané anthelmintické léčivo na neúčinný metabolit může představovat výhodný obranný mechanismus.

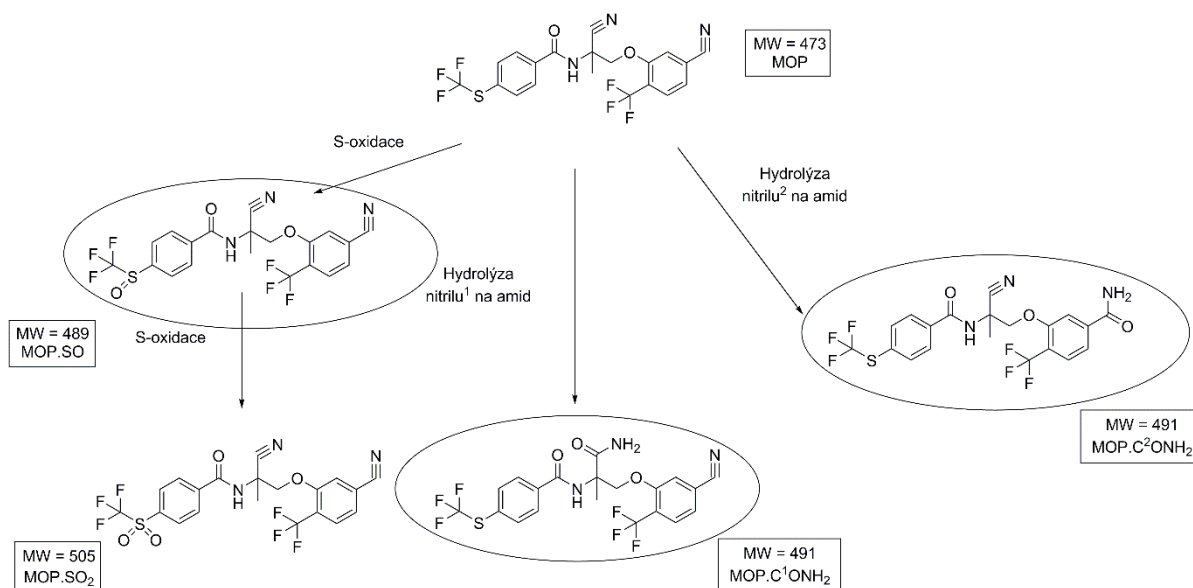
Ke splnění daných cílů byla použita ovce (*Ovis spp.*) jako hostitel a pro porovnání metabolismu u helminta dva kmeny Vlasovky slézové (*H. contortus*) – citlivý kmen ISE a rezistentní kmen WR. Při *in vivo* studii byly ovce perorálně přeléčeny čtyřnásobkem doporučené terapeutické dávky. Následně jim byla po 8 hodinách odebrána moč a po 48 hodinách trus. Při studii *ex vivo* byly odčervené ovce nakaženy 5 000 larvami třetího stádia. Po sedmi týdnech infekce byly ovce usmrceny a dospělí jedinci *H. contortus* byli vyjmuti agarovou metodou ze slézu. Dospělí jedinci byli inkubováni 24 hodin v médiu obsahujícím MOP (10 μ M). V závěru byly všechny vzorky zpracovány, extrahovány a analyzovány za použití UHPLC/MS.

Při studii *in vivo* bylo v ovčích exkrementech nalezeno 13 metabolitů (Obr. 6). Z toho 6 metabolitů bylo popsáno již dříve v *in vitro* studii (Stuchlíková *et al.*, 2013), zatímco 7 metabolitů nebylo ještě detekováno. Rozdíly mezi studii *in vitro* a *in vivo* naznačují, že biotransformace MOP se může odehrávat i v jiných orgánech než v játrech, např. v ledvinách nebo ve střevech. *Ex vivo* studie biotransformace MOP u Vlasovky ukázala, že enzymatický systém helminta je schopen biotransformovat MOP pouze biotransformačními enzymy I. fáze a to přes oxidaci a hydrolýzu nitrilu na amid (Obr. 7). Při srovnání obou kmenů bylo zjištěno, že

rezistentní kmen WR má více typů anebo více aktivních biotransformačních enzymů než citlivý kmen ISE. Zvýšená schopnost helmintů biotransformovat MOP by mohla vést k potenciálnímu budoucímu riziku resistance. V této studii byla poprvé popsána hydrolýza nitrilové skupiny na skupinu amidovou jako biotransformační přeměna xenobiotika u vyšších organismů.



Obr. 6 Metabolické schéma MOP in vivo u hostitele (*Ovis spp.*).



Obr. 7 Metabolické schéma MOP ex vivo u helminta *H. contortus*. Všechny metabolity byly nalezeny u *H. contortus* v kmenu WR, označené metabolity kroužkem byly detekovány v kmenu ISE.

4.3 Účinek monepantelu na vývojová stádia *Haemonchus contortus*

III. Lecová, L., Stuchlíková, L., Lamka, J., Špulák, M., Várady, M., Skálová, L. (2013) Efficacy of monepantel against lower developmental stages of a multi-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates: an *in vitro* study. *Helmintologia*, 50: 91-95. IF₂₀₁₃ = 0,776

MOP je širokospektrým anthelmintikem pro léčbu a kontrolu gastrointestinálních infekcí způsobovaných hlísticemi a mnoho studií již potvrdilo účinek MOP proti čtvrtému vývojovému stádiu a dospělým jedincům *H. contortus*. Avšak účinek na nižší larvální stádia (L₁-L₃) a vajíčka dosud nebyl prozkoumán.

Pro porovnání anthelmintické účinnosti MOP a vybraných modelových anthelmintik byl použit test EHT a MALDT test na dvou kmenech *H. contortus* (rezistentní kmen WR a citlivý kmen ISE). Odčervené ovce byly nakaženy 5 000 larvami třetího stádia. Po sedmi týdnech infekce byly ovcím odebrány exkrementy a vajíčka nematod byla izolována pomocí sítí různých velikostí. Získaná vajíčka byla následně použita pro oba testy (EHT a MALDT).

Tato studie ukázala, že MOP nemá ovicidní účinek. To je však velmi nebezpečné, protože i po přeléčení ovcí MOP vajíčka *H. contortus* v exkrementech zůstanou stále živá a schopná vývoje, což může způsobovat další infekci ještě nenakažených ovcí. Na druhou stranu se ukázalo, že MOP vykazuje larvicidní účinek a to jak v citlivém, tak v rezistentním kmeni *H. contortus*. Výsledky potvrdily, že MOP působí i na WR kmen, který je rezistentní vůči ostatním anthelmintikům.

4.4 Srovnávací studie metabolismu a účinku vybraných AAD s MOP

- IV. Stuchlíková, L., Lecová, L., Jirásko, R., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2015) Comparison of biotransformation and efficacy of aminoacetonitrile anthelmintics *in vitro*. *Drug Testing and Analysis*. (in press)
IF₂₀₁₅ = 2,816

Protože MOP patří mezi velmi účinné anthelmintické léčivo, rozhodli jsme se pro testování dalších látek ze třídy amino-acetonitrilových derivátů, které by bylo možné v budoucnu zařadit do veterinární praxe.

V této studii došlo k testování a porovnání anthelmintické aktivity, hepatotoxicity a biotransformace MOP a vybraných AAD (AAD-970, AAD-1154, AAD-1336). Pro tento účel byly použity následující metody: test viability buněk a MALDT test. Biotransformační studie byla prováděna za použití techniky UHPLC/MS. Jako modelový systém byly použity vajíčka dvou kmenů *H. contortus* (citlivý kmen ISE a rezistentní kmen WR) a ovčí a potkaní hepatocyty. Vajíčka *H. contortus* byla získána pomocí sítí různých velikostí z nakažených ovcí, kterým byl po sedmi týdnech od infekce odebrán trus a následně byl použit pro provedení MALDT testu. Ovčí a potkaní hepatocyty byly získány dvoustupňovou kolagenasovou metodou. Vyizolované hepatocyty byly dále inkubovány s testovanými látkami v různých koncentracích (potkaní: 1-100 μM pro testování viability buněk, ovčí: 10 μM pro biotransformaci). Hepatotoxicita byla vyhodnocována pomocí MTT testu.

Všechna AAD včetně MOP vykazovala larvicidní účinek na oba testované kmeny *H. contortus* (Tabulka 2). Test na viabilitu buněk ukázal, že všechny testované látky jsou netoxické pro hepatocyty (Obr. 8). V biotransformační studii byly

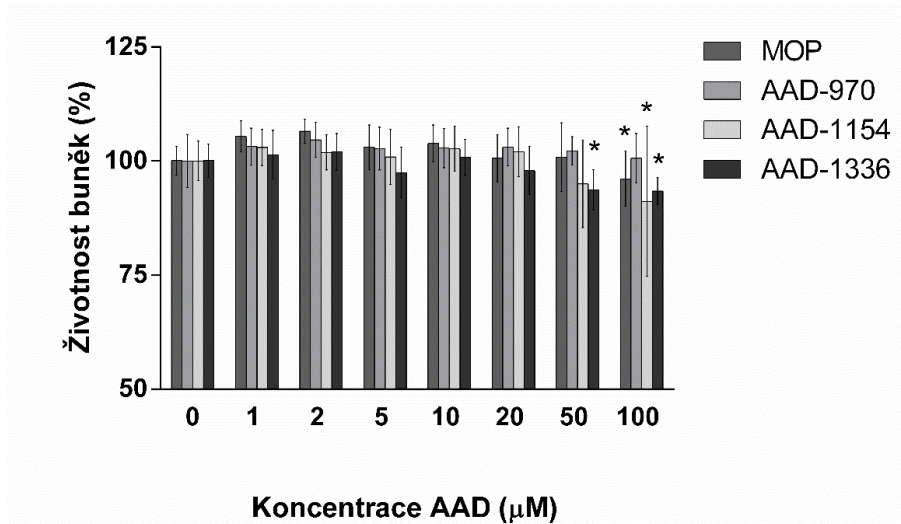
pozorovány minimální rozdíly, které byly způsobeny v závislosti na struktuře dané látky (Obr. 9). Na základě získaných výsledků můžeme brát testované látky AAD-1154 a AAD-1336 v úvahu jako potencionální kandidáty pro kombinovanou léčbu gastrointestinálních infekcí.

Tabulka 2 Hodnoty letální koncentrace (LC; ng.ml⁻¹; průměr ± SD) MOP/AADs/FLU/TBZ pro rezistentní (WR) a citlivý (ISE) kmen *H. contortus* a faktor resistance (RF). ▼▲ ukazují významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi LC50/99 MOP a dalších látek (▲ zvýšení, ▼ snížení).

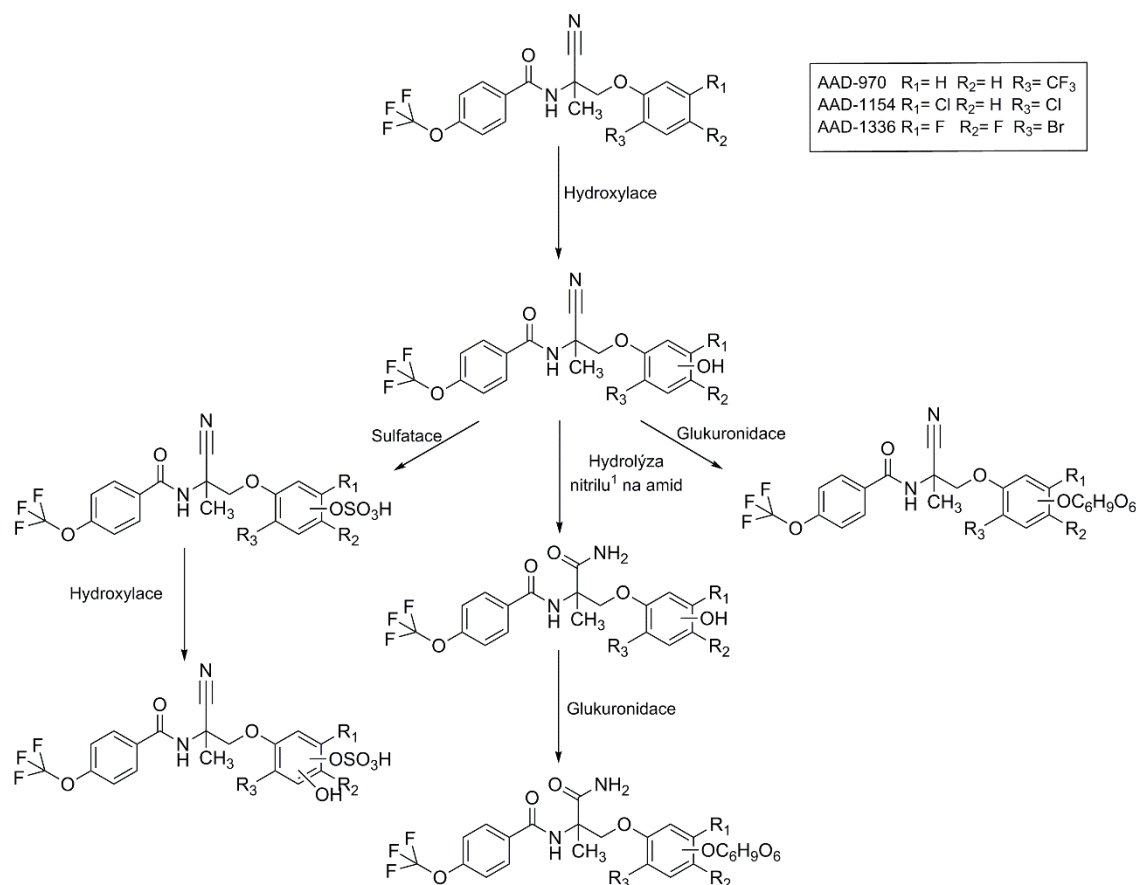
Drug	WR		ISE		RF ₅₀ ^a	RF ₉₉ ^b
	LC ₅₀	LC ₉₉	LC ₅₀	LC ₉₉		
MOP	4.6 ± 0.3	8.1 ± 1.5	3.7 ± 0.1	9.0 ± 1.0	1.24	0.90
AAD-970	5.4 ± 0.0 [▲]	25.6 ± 14.7	5.6 ± 0.7 [▲]	24.5 ± 16.6	0.96	1.05
AAD-1154	4.2 ± 0.1 [▼]	5.0 ± 0.2 [▼]	4.2 ± 0.1 [▲]	5.1 ± 0.1 [▼]	1.00	0.98
AAD-1336	5.3 ± 0.0 [▲]	6.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2 [▲]	6.3 ± 0.3 [▼]	1.02	1.02
FLU	12.0 ± 0.3 [▲]	57.6 ± 13.4 [▲]	6.7 ± 0.2 [▲]	16.5 ± 2.1 [▲]	1.79	3.48
TBZ	16.1 ± 3.3 [▲]	429.1 ± 151.1 [▲]	7.4 ± 1.4 [▲]	18.0 ± 6.5 [▲]	2.17	23.80

^a podíl hodnot LC₅₀ pro WR a LC₅₀ pro ISE

^b podíl hodnot LC₉₉ pro WR a LC₉₉ pro ISE



Obr. 8 Účinek MOP a AAD v koncentracích 1-100 μM na životnost ovčích hepatocytů. Hodnoty jsou vztaženy k 100 % kontroly. * značí signifikantní rozdíl od kontroly ($p < 0.05$).



Obr. 9 Metabolické schéma AAD in vitro v ovčích hepatocytech.

4.5 Vliv monepantelu na aktivitu a expresi biotransformačních enzymů

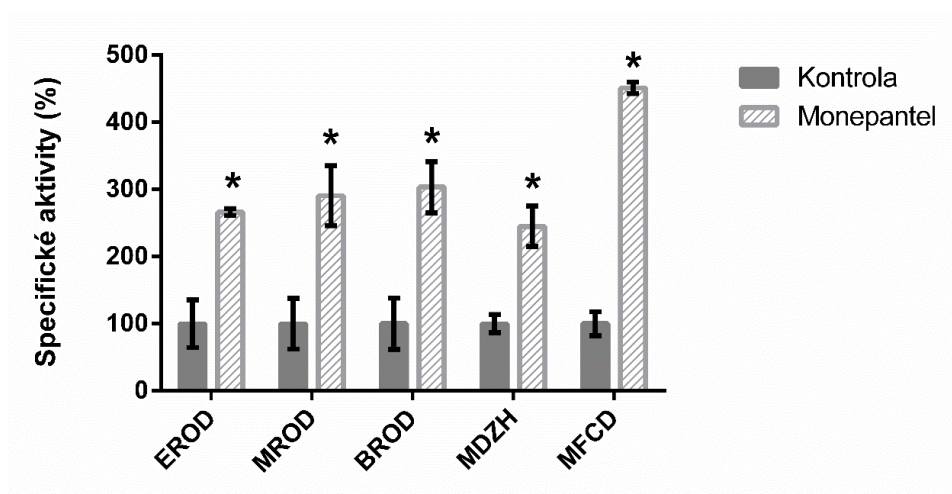
- V. Stuchlíková, L., Matoušková, P., Bártíková, H., Vokřál, I., Štolcová, T., Pětníková H., Lamka, J., Szotáková, B., Kubiček, V., Skálová, L. (2015) Monepantel induced hepatic cytochromes P450 in sheep *in vivo* and *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*. 227: 63-68. IF₂₀₁₃ = 2,982

Kontakt organismu s léčivem nebo s jinou cizorodou látkou – xenobiotikem může způsobovat modulaci aktivit a/nebo exprese biotransformačních enzymů. Indukce i inhibice těchto enzymů může mít negativní dopad na farmakologické a i toxikologické vlastnosti současně podávaných léčiv a způsobovat tak nežádoucí lékové interakce. U většiny organismů mají dominantní úlohu v biotransformaci xenobiotik CYPs (Trepanier, 2006). Ačkoli se MOP hojně používá ve veterinární praxi několik let, jeho vliv na CYPs u cílových druhů zvířat dosud nebyl zkoumán. Na základě těchto skutečností jsme se rozhodli zjistit účinek MOP na základní isoformy z rodiny CYPs (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C a CYP3A) ve studii *in vivo* i *in vitro*.

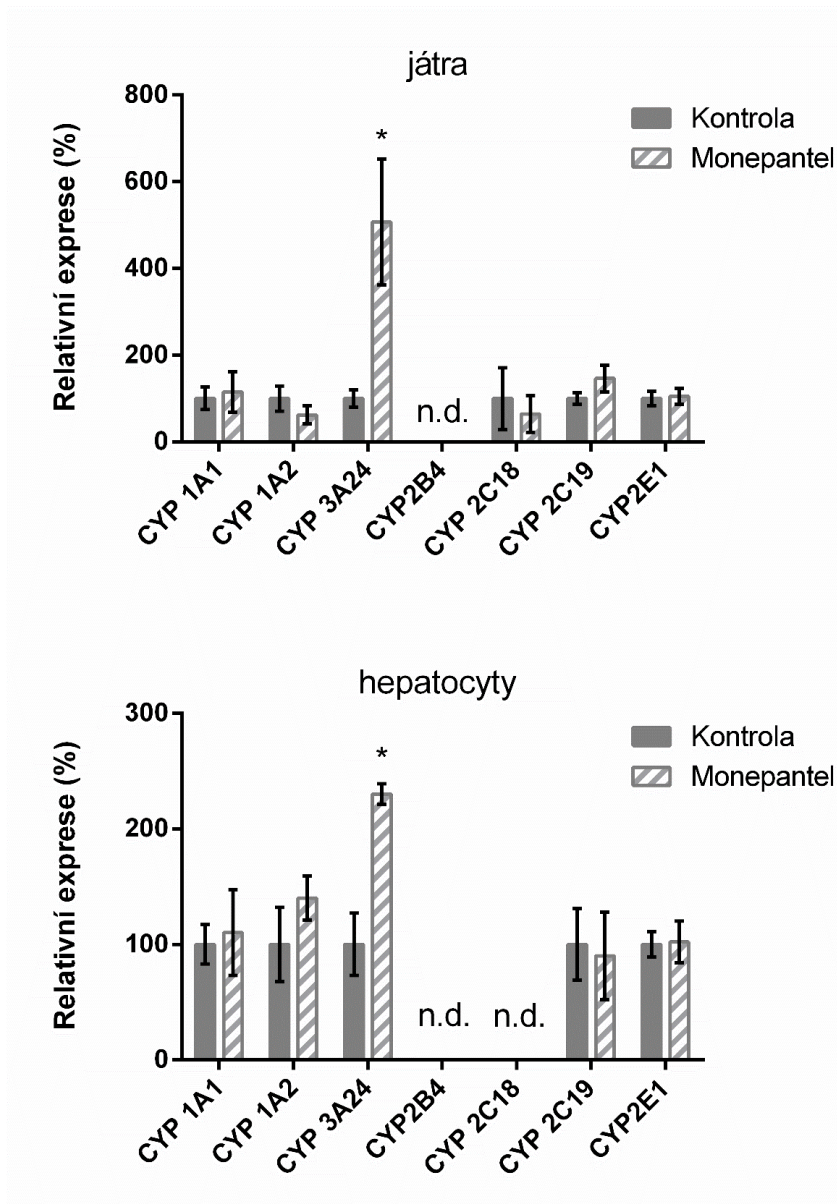
V *in vivo* studii byly použity kastrované ovce. První skupině ovcí byla podána doporučená terapeutická dávka MOP (2,5 mg na kg živé hmotnosti), druhá skupina představovala neléčenou kontrolu. Po 24 hodinách byla všechna zvířata usmrcena. Z jaterního homogenátu byla připravena mikrosomální frakce a izolována RNA. V biologickém materiálu byla stanovena specifická enzymová aktivita a kvantifikována mRNA několika isoform CYPs. V *in vitro* studii byla inkubována primární kultura ovčích hepatocytů s 10 μ M MOP a s vybranými modelovými induktory CYP. Po 24 hodinách byla z buněk izolována RNA a stanoveno množství mRNA pro jednotlivé CYP isoformy.

U všech testovaných enzymových aktivit (pro CYP1A1/2 - EROD, MROD, pro CYP 3A - BROD, MDHZ a pro CYP2C9 - MFCD) byl nalezen indukční účinek MOP s výjimkou PROD (pro CYP2B), která nebyla detekována (Obr. 10). Signifikantně zvýšené množství mRNA bylo zjištěno pouze u CYP3A24 a to jak *in vivo*, tak i *in vitro* (Obr. 11). Tato isoforma metabolisuje téměř polovinu všech léků a jejich účinnost může být touto indukcí ovlivněna. Protože se většinou u ovcí vyskytuje smíšená infekce, často dochází k použití kombinaci léčiv. Např. u benzimidazolových anthelmintik, která jsou substrátem pro CYP3A, by mohlo dojít při současném

použití s MOP ke snížení jejich účinku. Proto by se neměl MOP s těmito léčivými kombinovat.



Obr. 10 Specifické aktivity isoformů cytochromu P450 vztažené k 100 % kontroly. * značí signifikantní zvýšení.



Obr. 11 Relativní exprese genu měřená v játrech a hepatocytech in vitro vztažená k 100 % kontroly. * značí signifikantní zvýšení.

4.6 Přehled současných poznatků o MOP

- VI. *Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L., Skálová, L. (2014) Monepantel - the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*. 141: 1686-1698.*
IF₂₀₁₄ = 2,350

V tomto přehledovém článku byl shrnout současný stav poznání o tomto léčivu z různých pohledů: účinnost na různé druhy a stádia parazitů, způsob účinku, metabolismus, farmakokinetika, toxicita, resistance a mnoho dalšího.

5 ZÁVĚRY

V disertační práci jsem se zabývala identifikací metabolických drah a stanovením účinku nového anthelmintika MOP a dalších AAD (AAD-970, -1154 a -1336). Dosažené výsledky mohu shrnout do následujících závěrů:

- Identifikovali jsme metabolity I. a II. fáze biotransformace MOP v ovčích hepatocytech a navrhli metabolické schéma MOP u ovce *in vitro*.
- Identifikovali jsme metabolity I. a II. fáze biotransformace MOP v moči a trusu ovcí po *p.o.* podání MOP a navrhli metabolické schéma MOP u ovce *in vivo*.
- Identifikovali jsme metabolity I. fáze biotransformace MOP u parazita *H. contortus* a porovnali biotransformaci u dvou kmenů – citlivý kmen ISE a resistantní kmen WR - *ex vivo*. Zjistili jsme, že resistantní kmen WR má větší schopnost metabolisovat MOP než citlivý kmen ISE.
- Sledovali jsme účinek MOP na nižší vývojová stádia *H. contortus* a zjistili jsme, že MOP nemá ovicidní účinek, avšak vykazoval výrazný larvicidní efekt i na resistantní kmen WR.
- Porovnali jsme metabolismus a účinek vybraných AAD s MOP. Výsledky ukázaly, že AAD-1154 a AAD-1336 jsou vhodnými kandidáty pro další výzkum a na jejich možné použití ve veterinární praxi.
- Zjistili jsme významný indukční účinek MOP na CYPs, především na CYP3A, u ovcí *in vitro* i *in vivo*. Tato skutečnost poukazuje na možné interakce MOP s ostatními léčivy.
- Informace o MOP dostupné z literatury i získané našimi experimenty jsme zpracovali do přehledového článku

6 SEZNAM LITERATURY

1. **Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F., Coop RL.** (2000) Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitized with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* **30**:1025-1033.
2. **Bagnall NH., Kotze AC.** (2004) cDNA cloning and expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase, and a glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* **94**:283-289.
3. **Balic A., Cunningham CP., Meesusen ENT.** (2006) Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol* **28**:107-115.
4. **Banks DJ., Singh R., Barger IA., Pratap B., Le Jambre LF.** (1990) Development and survival of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* on pasture in a tropical environment. *Int J Parasitol* **20**:155-160.
5. **Britt DP.** (1982) Benzimidazole-resistant nematodes in Britain. *Vet Rec* **110**:343-344.
6. **Brown HD., Matzuk AR., Ilves IR.** (1961) Antiparasitic drugs. IV. 2-(4-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintik. *J American Soc* **83**:1764-1765.
7. **Burchell B., Coughtrie MWH.** (1992) UDP- glucuronosyltransferases. In: Pharmacogenetics of drug metabolism. (ed. Pergamon Press, New York) pp. 195-225.
8. **Burchell B.** (1999) Transformation reactions: Glucuronidation. In: Handbook of drug metabolism. (ed. Marcel Dekker, New York) pp.153-173.
9. **Burke JM., Miller JE., Brauer DK.** (2005) The effectiveness of copper oxide wire particles as an anthelmintic in pregnant ewes and safety to offspring. *Vet Parasitol* **131**:291-297.
10. **Cashman JR.** (1995) Structural and catalytic properties of the mammalian flavin monooxygenase. *Chem Res Toxicol.* **8**:165-181.
11. **Cashman JR.** (1999) *In vitro* metabolism: FMO and related oxygenations. In: Handbook of drug metabolism. (ed. Marcel Dekker, New York) pp. 477-505.
12. **Castro-Perez J., Plumb R., Granger JH., Beattie I., Joncour K., Wright A.** (2005a) Increasing throughput and information content for in vitro drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**:843-848.
13. **Castro-Perez J., Plumb R., Liang L., Yang E.** (2005b) A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**:798-804.
14. **Cawthorne RJG., Cheong FH.** (1984) Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep in south-east England. *Vet Rec* **114**:562-564.

15. **Císař P., Nobilis M., Vybíralová Z., Holčápek M., Kolářová L., Pour M., Kuneš J., Klimeš J.** (2005) Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal* **37**:1059-1071.
16. **Coles GC., Bauer C., Borgsteede FHM., Geerts S., Klei TR., Taylor MA., Waller PJ.** (1992) World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* **136**:167-185.
17. **Coles GC., Jackson F., Pomroy WE., Prichard RK., Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor MA., Vercruyse J.** (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* **136**:167-185.
18. **Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubeňová M., Novotná R., Gavelová M., Skálová L.** (2008a) Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* **151**:242-248.
19. **Cvilink V., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Kostianen R., Ketola RA.** (2008b) LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*. *Anal Bioanal Chem* **391**:337-343.
20. **Cvilink V., Lamka J., Skálová L.** (2009) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metab Rev* **41**:8-26.
21. **Dear GJ., James AD., Sarda S.** (2006) Ultra-performance liquid chromatography coupled to linear ion trap mass spectrometry for the identification of drug metabolites in biological samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**:1351-1360.
22. **Dobson RJ., Le Jambre LF., Gill JH.** (1996) Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Intl J Parasitol* **26**:993-1000.
23. **Dobson RJ., Hosking BC., Beiser RB., Love S., Larsen JWA., Rolfe PF., Bailey JN.** (2011) Minimising the development of anthelmintic resistance, and optimising the use of the novel anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems. *Aust Vet J* **89**:160-166.
24. **Ducray P., Gauvry N., Pautrat F., Goebel T., Fruechtel J., Desaulles Y., Weber SS., Bouvier J., Wagner T., Froelich O., Kaminsky R.** (2008) Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **18**:2935-2938.
25. **Dzik JM.** (2006) Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochem Pol* **53**:33-64.
26. **Elard L., Comes AM., Humbert JF.** (1996) Sequences of b-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and-resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Mol Biochem Parasitol* **79**:249-253.

27. **Evans DAP.** (1992) N-Acetyltransferase. In: Pharmacogenetics of drug metabolism. (ed. Pergamon Press, New York) pp. 95-178.
28. **Farrell GC.** (1987) Drug metabolism in extrahepatic diseases. *Pharmacol Ther.* **35**:375-404.
29. **Fernandez D.** (2011) Rain brings relief, New problems to livestock producers. *Goat Sheep news.* **3**
30. **Ferrer I., Thurman EM.** (2005) Measuring the mass of an electron by LC/TOF-MS: a study of "twin ions". *Anal Chem* **77**:3394-3400.
31. **Fleming SA., Craig T., Kaplan RM., Miller JE., Navarre C., Rings M.** (2006) Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J Vet Parasitol* **24**:103-108.
32. **Gasser A., Guse AH.** (2005) Determination of intracellular concentrations of the TRPM2 agonist ADP-ribose by reversed-phase HPLC. *J Chromatogr B* **821**:181-187.
33. **Geerts S., Gryseels B.** (2000) Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin Microbiol Rev* **13**:207-222.
34. **Getachew T., Dorchies P., Jacquet P.** (2007) Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite* **14**:3-14.
35. **Githia SM., Thamsborg SM., Munyua WK., Maingi N.** (2001) Impact of gastro-intestinal helminths on production in goats in Kenya. *Small Rumin Res* **42**:21-29.
36. **Gobert NG., Jones MK.** (2008) Discovering new schistosome drug targets: the role of transcriptomics. *Curr Drug Targets* **9**:922-930.
37. **Gram TE.** (1980) Extrahepatic metabolism of drugs and other foreign compounds. (ed. New York) pp. 1-601.
38. **Gréen H., Vretenbrant K., Norlander B., Peterson C.** (2006) Measurement of paclitaxel and its metabolites in human plasma using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry with a sonic spray ionization interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**:2183-2189.
39. **Groff M., Riffel K., Song H., Lo MW.** (2006) Stabilization and determination of a PPAR agonist in human urine using automated 96-well liquid-liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* **842**:122-130.
40. **Guengerich FP.** (1991) Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. *J Biol Chem* **266**:10019-10022.
41. **Guengerich FP.** (1994) Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: Relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicol Lett* **70**:133-138.
42. **Gustavsson SA., Samskog J., Markides KE., Langstrom B.** (2001) Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J Chromatogr A* **937**:41-47.
43. **Hamdane D., Zhang H, Hollenberg P.** (2008) Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynth Res* **98**:657-666.

44. **Hoberg ER, Lichtenfels JR, Gibbons L.** (2004) Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *J Par* **90**:1085-1102.
45. **Holčápek M, Kolářová L, Nobilis M.** (2008) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem* **391**:59-78.
46. **Hoste H, Chartier C, Le Frileux Y.** (2002) Control of gastrointestinal parasitism with nematodes by treating the host category at risk. *Vet Res* **33**:531-545.
47. **Huijbers MM, Montersino S, Westphal AH, Tischler D, van Berkel WJ.** (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys* **544**:2-17.
48. **Chan W, Cui L, Xu G, Cai Z.** (2006) Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxic aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**:1755-1760.
49. **Chen H, Chen Y, Du P, Han F, Wang H, Zhang H.** (2006) Sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine. *J Pharm Biomed Anal* **40**:142-150.
50. **Chen H, Chen Y, Wang H, Du P, Han F, Zhang H.** (2005) Analysis of scopolamine and its eighteen metabolites in rat urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **67**:984-991.
51. **Iqbal Z, Lateef M, Jabbar A, Muhammad G, Khan MN.** (2005) Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *J Ethnopharmacol* **102**:256-261.
52. **Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M.** (2006) Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* **79**:2413-2431.
53. **Jackson F, Coop RL.** (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* **120**:95-107.
54. **Jankovic D, Liu Z, Gause WC.** (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: Asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* **22**:450-457.
55. **Jurášek V, Dubinský P.** (1993) Veterinárna parazitológia. 1st. (ed. Príroda, Bratislava) pp. 146-307.
56. **Kaivosaari S, Finel M, Koskinen M.** (2011) *N*-glucuronidation of drugs and other xenobiotics by human and animal UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* **41**:652-669.
57. **Kamel A, Prakash C.** (2006) High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology. *Curr Drug Metab* **7**:837-852.
58. **Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P.** (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* **452**:176-180.

59. **Karadzovska D., Seewald W., Browning A., Smal M., Bouvier J., Giraudel JM.** (2008) Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* **32**:359-367.
60. **Kato R., Yamazoe Y.** (1994) Metabolic activation of N-hydroxylated metabolites of carcinogenic and mutagenic arylamines and arylamides by esterification. *Drug Metab Rev* **26**:413-430.
61. **Kinsella B., Byrne P., Cantwell H., McCormack M., Furey A., Danaher M.** (2011) Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC-MS/MS and QuEChERS method. *J Chromatogr B* **879**:3707-3713.
62. **Knox MR.** (2002) Effectiveness of copper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Aust Vet J* **80**:224-227.
63. **Knox DP., Redmond DL., Newlands GF., Skuce PJ., Pettit D., Smith WD.** (2003) The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Int J Parasitol* **33**:1129-1137.
64. **Kohler P.** (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* **31**:336-345.
65. **Kooyman FNJ., Van Kooten PJS., Huntley JF., Mackellar A., Cornelissen AWCA., Schallig HDFH.** (1997) Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology* **114**:395-406.
66. **Kotze AC.** (1997) Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *Int J Parasitol* **27**:33-40.
67. **Kotze AC., McClure SJ.** (2001) *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide *in vitro*. *Int J Parasitol* **31**:1563-1571.
68. **Krejsek J., Kopecký O.** (2004) Imunitní odpověď na fungální a parazitární infekce. In: *Klinická imunologie*. (ed. Nucleus HK, CZ) pp. 527-538.
69. **Krishna DR., Klotz U.** (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* **26**:144-160.
70. **Kwa MSG., Veenstra JG., Roos MH.** (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in b-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* **63**:299-303.
71. **Kyle PB., Adcock KG., Kramer RE., Baker RC.** (2005) Use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pentoxifylline and lisofylline in plasma. *Biomed Chromatogr* **19**:231-326.
72. **Lacey E., Gill JH.** (1994) Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop.* **56**:245-262.
73. **Lampinen-Salomonsen M., Beckman E., Bondesson U., Hedeland M.** (2006) Detection of altrenogest and its metabolites in post administration horse urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry--increased sensitivity by chemical derivatisation of the glucuronic acid conjugate. *J Chromatogr B.* **883**:245-256.

74. **Lawton MP., Cashman JR., Cresteil T., Dolphin CT., Elfarra AA., Hines RN., Hodgson E., Kimura T., Ozols J., Philips IR., Philpot RM., Poulsen LL., Rettie AE., Shephard EA., Williams DE., Ziegler DM.** (1994) A nomenclature for the mammalian Flavin monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. *Arch Biochem Biophys.* **305**:254-257.
75. **Lamka J., Ducháček L.** (2006) Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. 3rd (ed. Karolinum, Praha) pp. 62-69.
76. **Larsen M.** (2000) Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology.* **120**:S121-S131.
77. **Le Jambre LF.** (1976) Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol.* **2**:385-391.
78. **Letková V., Čisláková L. and collective** (2010) Diagnostika anthelmintickej rezistence. In: Laboratórne diagnostické metódy vo veterinárskej parazitológii. (ed. Košice, Slovenská republika) pp 99-105.
79. **Link M., Hakala KS., Wsól V., Koistinen R., Ketola RA.** (2006) Metabolite profile of sIBUTRAMINE in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *J Mass Spectrom.* **41**:1171-1178.
80. **Linton KJ., Higgins CF.** (2007) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.* **453**:555-567.
81. **Liu Z., Floss HG., Cassidy JM., Chan KK.** (2005) Metabolism studies of the anti-tumor agent maytansine and its analog ansamitocin P-3 using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **40**:389-399.
82. **Mackenzie PI., Rodbourne L., Stranks S.** (1992) Steroid UDP glucuronosyltransferases. *J Ster Biochem.* **43**:1099-1105.
83. **Malátková P., Wsól V.** (2014) Carbonyl reduction pathways in drug metabolism. *Drug Metab Rev.* (in press).
84. **Martin PJ., Anderson N., Jarret RG.** (1989) Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. *Aust Vet J.* **66**:236-240.
85. **Martin RJ.** (1997) Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J.* **154**:11-34.
86. **Mauriala T., Chauret N., Oballa R., Nicoll-Griffith DA., Bateman KP.** (2005) A strategy for identification of drug metabolites from dried blood spots using triple-quadrupole/linear ion trap hybrid mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **19**:1984-1992.
87. **Miners JO., Mackenzie PI.** (1992) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther.* **51**:347-369.
88. **Mortensen LL., Williamson LH., Terrill TH., Kircher R., Larsen M., Kaplan RM.** (2003) Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *JAVMA* **23**:495-500.

89. **Nebert DW., Wikrall K., Miller WL.** (2013) Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **368**:20120431.
90. **Nikolic D., Li Y., Chadwick LR., Grubjesic S., Schwab P., Metz P., van Breemen RB.** (2004) Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **32**:272-279.
91. **Paolini V., Bergeaud JP., Grisez C., Prevot F., Dorchies P., Hoste H.** (2003) Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* **113**:253-261.
92. **Papadopoulos E.** (2008) Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin Res.* **76**:99-103.
93. **Papadopoulos E., Gallidis E., Ptochos S.** (2010) Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Vet Parasitol* **189**:85-89.
94. **Parkinson A.** (2001) Biotransformation of xenobiotics. pp. 133-224.
95. **Paulson GD., Caldwell J., Hutson DH., Menn JJ.** (1986) Xenobiotic Conjugation Chemistry. (ed. American Chemical Society, Washington, DC) pp. 1-358.
96. **Prichard RK.** (2001) Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* **17**:445-453.
97. **Rainbird MA., Macmillan D., Meusen EM.** (1998) Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol.* **20**:93-103.
98. **Rettie AE. Fisher MB.** (1999) Transformation enzymes: Oxidative; non-P450. In: Handbook of drug metabolism. (ed. Marcel Dekker, New York) pp. 131-151.
99. **Roos MH., Kwa MSG., Grant WN.** (1995) New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Today.* **11**:148-150.
100. **Roos MH., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra JG., Lenstra JA.** (2004) Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol.* **34**:109-115.
101. **Rufener L., Mäser P., Roditi I., Kaminsky R.** (2009) *Haemonchus contortus* Acetylcysteine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *Pathogens.* **5**:e1000380.
102. **Saddiqi HA., Jabbar A., Sarwar M., Iqbal Z., Muhammad G., Nisa M., Shahzad A.** (2011) Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res.* **109**:1483-1500.
103. **Samuel K., Yin W., Stearns RA., Tang YS., Chaudhary AG., Jewell JP., Lanza T Jr., Lin LS., Haggmann WK., Evans DC., Kumar S.** (2003) Addressing the metabolic activation potential of new leads in drug discovery: a case study using ion trap mass spectrometry and tritium labeling techniques. *J Mass Spectrom.* **38**:211-221.
104. **Satoh T., Hosokawa M.** (1998) The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **38**:257-288.

105. **Saunders NA., Lee MA.** (2013) Real-time PCR; Advanced Technologies and Applications (ed. Caister Academic Press, London, UK).
106. **Shalaby HA.** (2013) Anthelmintics resistance; How to overcome it? *Iran J Parasitol.* **8**:18-32.
107. **Shoop WL., Mrozik H., Fisher MH.** (1995) Structure and activity of avermectines and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol.* **59**:139-156.
108. **Schmittgen TD., Livak KJ.** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat Protoc.* **3**:1101-1108.
109. **Skálová L., Boušová I. a kolektiv** (2011) Enzymy metabolizující xenobiotika. In: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik* (ed. Karolinum, Prague, CZ) pp. 21-90.
110. **Slabý O. a kolektiv** (2015) Laboratorní matematika v molekulární medicíně. In: *Molekulární medicína* (ed. L. Houdek, Galén, Semily, CZ) pp. 210-222.
111. **Smith G.** (1990) Hookworm disease: Current status and new directions. In: *Chemotherapy future problems.* (ed. Schad GA., Warren KS., Taylor & Francis, London, UK) pp. 291-303.
112. **Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Špulák, M., Holčapek, M., Szotáková, B., Bártíková, H., Pour, M., Skálová, L.** (2013) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* **405**:1705-1712.
113. **Sutherland I., Scott I.** (2010) Anthelmintic. In: *Gastrointestinal nematode of sheep and cattle.* (ed. Oxford, United Kingdom) pp. 95-116.
114. **Testa B.** (1995) Xenobiotic metabolism: The global view. In: *The metabolism of Drug and Others Xenobiotics.* (ed. B. Testa, Academic Press, Lausanne) pp. 5-23.
115. **Testa B., Krämer SD.** (2008) Reactions of hydrolysis and their enzymes. In: *The biochemistry of drug metabolism: Principles, redox reactions, hydrolyses* (ed. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich) pp. 201- 251.
116. **The International Transporter Consortium** (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* **9**:215-236.
117. **Thienpont D., Vanparijs OFJ., Raeymaekers AHM., Vandenberg J., Demoen JA., Allewijn FT., Marsboom RP., Niemegeers CJ., Schellekens KH., Janssen PA.** (1966) Tetramisole (R 8299), a new, potent broad spectrum anthelmintic. *Nature.* **209**:1084-1086.
118. **Trepanier LA.** (2006) Cytochrome P450 and its role in veterinary drug interactions. *Vet Clin North Am, Small Anim Pract.* **36**:975-985.
119. **Tukey RH., Stassburg CP.** (2000) Human UDP- glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **40**:581-616.
120. **Tylor MA., Hunt KR.** (1989) Anthelmintic drug resistance in the UK. *Vet Rec.* **125**:143-147.
121. **Vatsis KP., Weber WW., Bell DA., Dupret JM., Evans DAP., Grant DM., Hein DW., Lin HJ., Meyer UA., Relling MV., Sim E., Suzuki T., Yamazoe Y.** (1995) Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics.* **5**:1-17.

122. **Vokřál I., Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Szotáková B., Várady M., Nobilis M., Skálová L.** (2010) Effect of flubendazol on biotransformation enzymes activities in *Haemonchus contortus*. *Open Parasitol J.* 4:24-28.
123. **Vokřál I., Bártíková H., Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kubíček V.** (2012) The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology.* **139**:1309-1316.
124. **Vokřál I., Jirásko R., Stuchlíková L., Bártíková H., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Skálová L.** (2013) Biotransformation of albendazole and activities of selected enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Vet Parasitol.* **196**:373-381.
125. **Volf P., Horák P.** (2007) Paraziti a jejich biologie. (ed. Triton, Praha, CZ) pp. 163-185.
126. **Van Wyk JA., Malan FS.** (1988) Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectine, closantel, rafoxanid and the benzimidazoles in South Africa. *Vet Rec.* **123**:226-228.
127. **Van Wyk JA., Bath GF.** (2002) The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet Res.* **33**:509-529.
128. **Waterman MR., Johnson EF.** (1991) Cytochrome P450. In: *Methods in Enzymology.* (ed. Academic Press, New York)
129. **Weimann A., Sabroe M., Poulsen HE.** (2005) Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **40**:307-316.
130. **Weiner H., Flynn TG.** (1989) *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 2: Aldehyde dehydrogenase, Alcohol dehydrogenase, and Aldo-Keto Reductase.* (ed. Liss, New York).
131. **Williamson LN., Terry AV Jr., Bartlett MG.** (2006) Determination of chlorpyrifos and its metabolites in rat brain tissue using coupled-column liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **20**:2689-2695.
132. **Wind M., Spickermann J., Schleimer M., Donzelli M., Gebhardt K., Sturm-Haurany R., Klauer D., Fullhardt P., Schmitt-Hoffmann A.** (2006) Investigation of low-abundant in vitro metabolites of stable isotope-labelled BAL4815 by accurate mass capillary-LC-ESI-qTof-MS and MS/MS. *J Mass Spectrom.* **41**:903-910.
133. **Wrighton SA., Stevens JC.** (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* **22**:1-21.
134. **Yilmazer M., Stevens JF., Buhler DR.** (2001) *In vitro* glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett.* **491**:252-256.
135. **Ziegler DM.** (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **33**:179-199.

Internetové zdroje:

<http://www.ziegenzucht-bayern.de/wuermer-bei-ziegen-gezielte-entwurmung.html>

<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/09/how-to-escape-a-deadly-embrace.html>

7 SEZNAM ZKRATEK

AAD	amino-acetonitrilové deriváty
ABC	ATP-binding cassette; ABC transportéry
ABZ	albendazol
AKR	aldo-keto reduktázy
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization; chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization; fotoionizace za atmosférického tlaku
AR	anthelmintická resistance
ATP	adenosintrifosfát
BROD	benzyloxyresorufin <i>O</i> -dearylasa
CYPs	cytochromy P450
Ct	Cycle threshold
EHT	Egg Hatch Test; test líhnutí vajíček
EPG	Eggs Per Gram; počet vajíček na gram trusu
EROD	7-ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylasa
ESI	Electrospray ionization; ionizace elektrosprejem
FAD	flavinadenindinukleotid
FECRT	Faecal Egg Count Reduction Test; test redukce počtu vajíček v trusu
FMO	flavinové monooxygenasy
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GIN	gastrointestinální nematoda
GSH	γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin
HPRT	hypoxanthinfosforibosyltransferasa
ISE	Inbreed Susceptible Edinburgh
IRE	Inbreed Resistant Edinburgh
LC	letální koncentrace
MAC	Membrane Attack Factor; komplex proteinů
MALDT	Micro-agar Larval Development Test; test larválního vývoje
MDR	reduktasy/dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem

MDHZ	midazolam hydroxylasa
MFCD	7-methoxy-4-(trifluormethyl)kumarin demethylasa
MOP	monepantel
MROD	7-methoxyresorufin <i>O</i> -demethylasa
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
MS	Mass spectrometry; hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MW	Molecular weight; molekulová hmotnost
<i>m/z</i>	Mass-to-charge ratio; poměr hmota/náboj
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	Nuclear magnetic resonance; nuleární magnetická rezonance
PCR	Polymerase Chain Reaction; polymerázová řetězová reakce
PROD	7-penthoxyresorufin <i>O</i> -depentylasa
QqTOF	Tandem Quadrupole/Time-of-Flight Mass Analyzer; hybridní tandemový hmotnostní analyzátor – kombinace kvadrupól-průletový analyzátor
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction; kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RF	faktor resistance
RNA	ribonukleová kyselina
RP	Reverse phase; obrácené systémy-fáze
SDR	reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem
SE	Susceptible Edinburgh
THB	thiabendazol
TOF	Time-of Flight Analyzer; analyzátor doby letu
UHPLC/MS	Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry; vysoce účinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
UV	Ultraviolet; ultrafialové záření
WR	White River
18S-rRNA	18S hydrogenasa

8 PODÍL PŘEDKLADATELKY NA PUBLIKACÍCH ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- I. *Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Špulák, M., Holčapek, M., Szotáková, B., Bártíková, H., Pour, M., Skálová, L. (2013) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405: 1705-1712. IF₂₀₁₃ = 3,578*
- Izolace primární kultury hepatocytů dvoustupňovou kolagenasovou metodou
 - Inkubace hepatocytů s testovaným léčivem a extrakce na pevných fázích
 - Podíl na analýze dat
 - Zpracování publikace
- II. *Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Valát, M., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2014) Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). Drug Testing and Analysis. 6: 1055-1062. IF₂₀₁₄ = 2,816*
- Kultivace nematod, inkubace s testovaným léčivem a extrakce vzorků na pevných fázích
 - Příprava vzorků trusu a moče na UHPLC/MS analýzu
 - Podíl na analýze dat
 - Zpracování publikace
- III. *Lecová, L., Stuchlíková, L., Lamka, J., Špulák, M., Várady, M., Skálová, L. (2013) Efficacy of monepantel against lower developmental stages of a multi-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates: an *in vitro* study. Helminthologia, 50: 91-95. IF₂₀₁₃ = 0,776*
- Podíl na přípravě a vyhodnocování testů
 - Podíl na zpracování publikace

- IV. Stuchlíková, L., Lecová, L., Jirásko, R., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2015) Comparison of biotransformation and efficacy of aminoacetonitrile anthelmintics *in vitro*. *Drug Testing and Analysis*. (in press)
IF₂₀₁₄ = 2,816

- Izolace hepatocytů dvoustupňovou kolagenasovou metodou
- Stanovení viability buněk
- Kultivace nematod, inkubace s testovaným léčivem a extrakce vzorků na pevných fázích
- Podíl na analýze dat
- Zpracování publikace

- V. Stuchlíková, L., Matoušková, P., Bártíková, H., Vokřál, I., Štolcová, T., Pětníková H., Lamka, J., Szotáková, B., Kubíček, V., Skálová, L. (2015) Monepantel induced hepatic cytochromes P450 in sheep *in vivo* and *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*. 227: 63-68. IF₂₀₁₃ = 2,982

- Izolace primární kultury hepatocytů dvoustupňovou kolagenasovou metodou
- Inkubace hepatocytů s testovaným léčivem
- Stanovení enzymových aktivit (CYPs)
- Zpracování publikace

- VI. Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L., Skálová, L. (2014) Monepantel - the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*. 141: 1686-1698.
IF₂₀₁₄ = 2,350

- Podíl na zpracování publikace

9 PŘÍLOHY

9.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce

- I. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Špulák, M., Holčapek, M., Szotáková, B., Bártíková, H., Pour, M., Skálová, L. (2013) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 1705-1712. IF₂₀₁₃ = 3,578
- II. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Valát, M., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2014) Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Testing and Analysis*. 6: 1055-1062. IF₂₀₁₄ = 2,816
- III. Lecová, L., Stuchlíková, L., Lamka, J., Špulák, M., Várady, M., Skálová, L. (2013) Efficacy of monepantel against lower developmental stages of a multi-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates: an *in vitro* study. *Helmintologia*, 50: 91-95. IF₂₀₁₃ = 0,776
- IV. Stuchlíková, L., Lecová, L., Jirásko, R., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2015) Comparison of biotransformation and efficacy of aminoacetonitrile anthelmintics *in vitro*. *Drug Testing and Analysis*. (in press) IF₂₀₁₄ = 2,816
- V. Stuchlíková, L., Matoušková, P., Bártíková, H., Vokřál, I., Štolcová, T., Pětníková H., Lamka, J., Szotáková, B., Kubíček, V., Skálová, L. (2015) Monepantel induced hepatic cytochromes P450 in sheep *in vivo* and *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*. 227: 63-68. IF₂₀₁₃ = 2,982
- VI. Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L., Skálová, L. (2014) Monepantel - the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*. 141: 1686-1698. IF₂₀₁₄ = 2,350

9.1.1 Publikace I.

- I. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Špulák, M., Holčapek, M., Szotáková, B., Bártíková, H., Pour, M., Skálová, L. (2013) Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 1705-1712. IF₂₀₁₃ = 3,578

Investigation of the metabolism of monepantel in ovine hepatocytes by UHPLC/MS/MS

Lucie Stuchlíková · Robert Jirásko · Ivan Vokřál · Jiří Lamka · Marcel Špulák · Michal Holčapek · Barbora Szotáková · Hana Bártíková · Milan Pour · Lenka Skálová

Received: 11 October 2012 / Revised: 14 November 2012 / Accepted: 14 November 2012 / Published online: 25 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Monepantel (MOP) belongs to a new class of anthelmintic drugs known as aminoacetonitrile derivatives. It was approved for use in veterinary practice in Czech Republic in 2011. So far, biotransformation and transport of MOP in target animals have been studied insufficiently, although the study of metabolic pathways of anthelmintics is very important for the efficacy of safety of therapy and evaluation of the risk of drug–drug interactions. The aim of this study was to identify MOP metabolites and to suggest the metabolic pathways of MOP in sheep. For this purpose, primary culture of ovine hepatocytes was used as a model in vitro system. After incubation, medium samples and homogenates of hepatocytes were extracted separately using solid-phase extraction. Analysis was performed using a

hybrid quadrupole-time-of-flight analyzer with respect to high mass accuracy measurements in full scan and tandem mass spectra for the confirmation of an elemental composition. The obtained results revealed S-oxidation to sulfoxide and sulfone and arene hydroxylation as MOP phase I biotransformations. From phase II metabolites, MOP glucuronides, sulfates, and acetylcysteine conjugates were found. Based on the obtained results, a scheme of the metabolic pathway of MOP in sheep has been proposed.

Keywords Monepantel · Aminoacetonitrile derivatives · Ultrahigh-performance liquid chromatography/mass spectrometry · Biotransformation · Drug metabolism

Abbreviations

AADs	Aminoacetonitrile derivatives
BSA	Bovine serum albumin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGTA	Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N,N,N',N' - tetraacetic acid
ESI	Electrospray ionization
HPLC	High-performance liquid chromatography
MOP	Monepantel
MOP.OH	Monepantel with hydroxylation
MOP.SO	Monepantel sulfoxide
MOP.SO.OH	Monepantel sulfoxide with hydroxylation
MOP.SO ₂	Monepantel sulfone
MOP.SO ₂ .OC ₆ H ₅ O ₆	Glucuronide of hydroxylated monepantel sulfone
MOP.SO ₂ .OH	Monepantel sulfone with hydroxylation

L. Stuchlíková · B. Szotáková · H. Bártíková · L. Skálová (✉)
Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in
Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Czech Republic
e-mail: skaloval@faf.cuni.cz

R. Jirásko · M. Holčapek
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical
Technology, University of Pardubice, Studentská 573,
532 10 Pardubice, Czech Republic

I. Vokřál · J. Lamka
Department of Pharmacology and Toxicology,
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Charles University in Prague, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Czech Republic

M. Špulák · M. Pour
Department of Inorganic and Organic Chemistry,
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Charles University in Prague, Heyrovského 1203,
500 05 Hradec Králové, Czech Republic

MOP.SO ₂ .OH.OC ₆ H ₅ O ₆	Glucuronide of dihydroxylated monepantel sulfone
MOP.SO ₂ .OSO ₃ H	Sulfate of hydroxylated monepantel sulfone
MOP.SO ₂ .SC ₅ H ₈ NO ₃	Monepantel sulfone conjugated with acetylcysteine
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
QqTOF	Quadrupole-time-of-flight analyzer
RP	Reversed-phase
SPE	Solid-phase extraction
<i>t</i> -BuOK	Potassium <i>tert</i> -butoxide
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran-2-yl
UHPLC	Ultrahigh-performance liquid chromatography

Introduction

A major problem facing the agriculture industry and human health is the battle against parasitic helminths. Anthelmintics remain the sole accessible means in helminthoses therapy, but only a limited number of chemical groups of broad-spectrum anthelmintics is available. The treatment of helminthoses is mainly based on the administration of anthelmintic drugs from the following groups: benzimidazoles (e.g., flubendazol, albendazol, and fenbendazol), imidazothiazoles (e.g., levamisole), and macrocyclic lactones (e.g., ivermectin) [1]. The frequent use of similar anthelmintics over many years has inevitably led to the development of drug resistance in some helminths [2, 3]. This phenomenon is a serious problem worldwide and causes extensive economic losses. Therefore, the development of new class of anthelmintics is extremely important [2, 4].

In 2008, the preparation and promising anthelmintic efficacy of amino-acetonitrile derivatives (AADs) has been reported. AADs, low-molecular-mass compounds, were prepared by the alkylation of phenol with chloroacetone followed by Strecker reaction on the resulting ketone and a final acylation step of the amino group using an acid chloride [5, 6]. These compounds have aryloxy and aroyl moieties on an amino-acetonitrile core [7]. AADs have met requirements for the treatment of helminthoses in livestock: low toxicity, favorable pharmacokinetic properties, and broad-spectrum efficacy against sheep and cattle nematodes [5]. At this time, one AADs representative—monepantel—has been approved for use in veterinary practice (Fig. 1). For the determination of AADs including monepantel in biological samples, high-performance liquid chromatography with

tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) method with the negative-ion electrospray ionization (ESI) was employed [7, 8].

Safe and effective therapy and limitation of drug–drug interactions require not only information about pharmacokinetic of parent drug but also detailed knowledge of drug metabolism in target species. HPLC/MS/MS is usually a method of choice for the metabolic studies due to high sensitivity and structural information even for trace metabolites in highly complex matrices [9]. The ongoing development on HPLC/MS/MS including ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) has opened up new strategies for the veterinary drug residue analysis [7, 10–12]. Several strategies, such as the use of selected tandem mass spectrometry (MS/MS) scans [9, 13–15], online hydrogen/deuterium exchange HPLC/MS/MS [13], accurate mass measurements [9, 15], radio-labeling of parent-drugs [16], chemical derivatization to determine the metabolite position or to improve ionization efficiency [13, 14], and software dedicated to the metabolite prediction or detection [15] can be applied for this purpose.

Monepantel sulfone is the only metabolite of monepantel reported so far. In sheep, monepantel sulfone was found in milk and muscle [7]. Detection of monepantel sulfoxide, presumable intermediate of monepantel sulfone, in the preliminary study was mentioned (unpublished data of Jung et al., see in [8]). No information about phase II metabolites of MOP has been available yet. Therefore, the goal of present study is the identification of all phase I and phase II metabolites in sheep using the primary culture of ovine hepatocytes. For this purpose, the extraction procedure for MOP and its metabolites was developed and UHPLC/MS/MS method for the identification of MOP metabolites was optimized.

Materials and methods

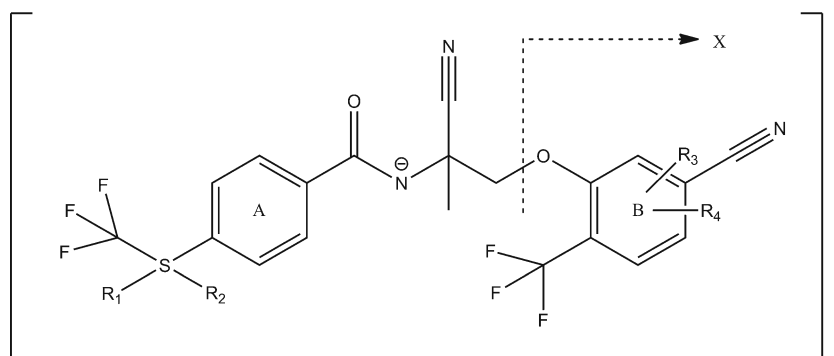
Animals

Sheep (*Ovis* sp.) were bred in the farm Běleč (Czech Republic). For experiments, male castrated lambs (body weight approximately 20 kg; age 9 months) were used. All experimental procedures were undertaken in accordance with the Czech guidelines for the care and use of farm and experimental animals and were performed under the supervision of Ethical Committee of the Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

Chemicals and reagents

Monepantel was prepared at the Department of Organic Chemistry (Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic) according to

Fig. 1 Chemical structure of monepantel (MOP), *N*-[(1*S*)-1-cyano-2-(5-cyano-2-trifluoromethyl-phenoxy)-1-methyl-ethyl]-4-trifluoromethylsulfanylbenzamide, product ions, and substituents of metabolites of phase I and II biotransformation (see Table 2)



Kaminsky et al. [5] with minor modifications. The starting hydroxyacetone was firstly converted to tetrahydropyran-2-yl (THP) ether in 79 % yield followed by Strecker reaction employing potassium cyanide, ammonium chloride, and ammonia solution in ethanol affording the product in 70 % yield. The resultant amino-acetonitrile was converted to its (4-trifluoromethylsulfanyl) benzamide derivative by the reaction of appropriate benzoyl chloride (71 % yield), and then THP protecting group was cleaved in slightly acidic conditions (pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS)/methanol, 97 % yield). The last step involved nucleophilic aromatic substitution with 4-fluoro-3-trifluoromethylbenzonitrile and alcoholate, in situ released by the fresh solution of *t*-BuOK in THF from AAD (27 %). The structure and purity of prepared substance was tested using NMR and liquid chromatography with mass spectrometry. Liquid sterile-filtered medium Ham F12, Williams' medium, bovine serum albumin (BSA), ethylene glycol-bis(β -amino-ethyl ether) *N,N,N',N'*-tetra acetic acid (EGTA), and other chemicals (UHPLC, MS, or analytical grade) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Collagenase was purchased from Sevapharma (Prague, Czech Republic).

Preparation of primary culture of ovine hepatocytes

Lamb was stunned and exsanguinated in agreement with Czech slaughtering rules for farm animals. After removal of the liver from the abdominal cavity (up to 5 min), the liver was flushed with Euro Collins solution (15 mM KH_2PO_4 , 42.5 mM K_2HPO_4 , 15 mM KCl, 10 mM NaHCO_3 , and 0.2 M glucose) through the main veins and transported to the laboratory on ice (within 60 min). The ovine hepatocytes were obtained from the ovine liver by two-step collagenase method [17, 18]. Briefly, left lobe (100–150 g) was perfused with salt solution (0.14 M NaCl, 5.0 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4) in Na^+/K^+ phosphate buffer (0.2 mM, pH 7.4) containing a calcium binding component (0.4 mM EGTA). Consequently, the lobe was perfused with phosphate buffer containing calcium chloride (1.46 mM) and collagenase (30 mg/100 mL) at 37 °C. The collagenase perfusion was proceeded 8–10 min. After

perfusion, the lobe was transferred to medium containing BSA, and the hepatocytes were released. The obtained suspension was filtered through a nylon mesh and centrifuged at $40\times g$ for 5 min at 4 °C. The pellet was re-suspended in chilled buffer, and the washing procedure was twice repeated. Finally, three millions of viable (75–80 %) cells in 3 mL of culture medium ISOM (1:1 mixture of Ham F12 and Williams' E) were placed into 60 mm plastic dishes pre-coated with collagen. The fetal calf serum was added in the culture medium (5 %). Cultures were maintained without the substrate for 4 h at 37 °C in a humid atmosphere of air and 5 % CO_2 .

Incubation of hepatocytes with monepantel and solid-phase extraction

After the attachment of hepatocytes, the medium was replaced with a fresh serum-free one with monepantel (10 μM in 3 mL of fresh medium). Monepantel was pre-dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in the medium did not exceed 0.2 %. After 24 h, the hepatocytes were scraped and homogenized. Samples were centrifuged at $3,000\times g$ for 5 min. The supernatant was extracted using the solid-phase extraction (SPE) method. The sample was loaded onto the Phenomenex Strata X (3 mL, 60 mg, 33 μm ; Phenomenex, Torrance, California, USA) extraction cartridge, which was preconditioned by washing with 1 mL of acetonitrile and 1 mL of purified water. In the next step, the cartridge was washed out with 2 mL of 10 % (*v/v*) acetonitrile. Compounds of interest were eluted with 1 mL of acetonitrile. Samples were evaporated to dryness using vacuum concentrator. Dry samples were quantitatively reconstituted in the mixture of acetonitrile/water (30:70, *v/v*) by sonication. The solutions were mixed using a vortex for 5 min. One microliter of reconstituted samples was injected into the UHPLC/MS system.

UHPLC/MS/MS conditions

UHPLC/MS/MS chromatograms of samples were measured in the negative-ion ESI mode on a hybrid quadrupole-time-of-flight mass analyzer (microTOF-Q, Bruker Daltonics,

Germany). UHPLC was performed on an Agilent 1290 Infinity liquid chromatograph (Agilent Technology, Waldbronn, Germany) using Zorbax Eclipse C18 column 150×2.1 mm, 1.8 μm (Agilent Technology, Waldbronn, Germany), temperature 25 °C, flow rate 0.3 mL/min, and the injection volume 1 μL. The mobile phase consisted of 0.5 mM ammonium acetate adjusted to pH=4.0 (A) and acetonitrile (B). The linear gradient was as follows—0 min, 30 % B; 11 min, 95 % B; 12 min, 95 % B; and finally washing and reconditioning of the column. The quadrupole-time-of-flight (QqTOF) mass spectrometer with average resolving power higher than 13,000 was used with the following setting of tuning parameters—capillary voltage, 4.5 kV; drying temperature, 220 °C; the flow rate and pressure of nitrogen were 8 L/min and 1.3 bar, respectively. The external calibration was performed with sodium formate clusters before individual measurements. ESI mass spectra were recorded in the range of m/z 50–1,000 in the negative-ion mode. The isolation width $\Delta m/z$ 4 and the collision energy 20 eV (found as optimal energy for fragmentation of studied metabolite ions) using argon as the collision gas were used for MS/MS experiments.

Results and discussion

Detected in vitro metabolites were identified based on the presence of deprotonated molecules $[M-H]^-$ and the interpretation of their product ion spectra. The standards of potential metabolites were not synthesized due to their difficult synthesis. High mass accuracy measurement allows the confirmation of elemental composition and the type of metabolic reactions according to exact mass defects. Structures of possible metabolites were predicted using the MetabolitePredict software (Bruker Daltonics) and the knowledge of fragmentation behavior associated with metabolic reactions [9, 14, 15]. Various phase I metabolites can be expected in hepatocytes according to our previous in vitro studies [10, 11, 19, 20].

The total ion current chromatogram of sheep in vitro sample is shown in Fig. 2. Retention times, m/z values,

molecular weights, elemental composition, and key fragment ions of MOP metabolites detected in MS/MS experiments are summarized in Table 1. All measurements discussed below were carried out in the negative-ion ESI mode, because this mode provides a better sensitivity for studied metabolites.

MS/MS spectrum of deprotonated molecule of parent drug (retention time, 8.5 min) at m/z 472 resulted in the abundant product ion at m/z 186. Similar results were reported by Kinsella et al. [7]. Key fragmentation patterns of all MOP metabolites formed during phases I and II biotransformation in sheep are summarized in Table 2 and Fig. 1. These product ions allow distinguishing of present substituents on the B ring. The proposed main metabolic pathways for MOP in ovine hepatocytes are shown in Fig. 4.

Phase I metabolites of MOP

Phase I biotransformation exposes or introduces a functional group and usually results in certain increase in the hydrophilicity of xenobiotics. Various oxidation, reduction, or hydrolysis reactions can be mentioned among possible phase I reactions of xenobiotics [21]. In case of MOP, products of S-oxidation, hydroxylation, and their combinations were identified as phase I metabolites in sheep (Fig. 4). All hydroxylation steps occur on the aromatic ring B. The position of oxidation and hydroxylation can be determined in different ways. The most reliable is the interpretation of MS/MS spectra of detected metabolites.

The S-oxidation and arene hydroxylation are two initial steps of MOP biotransformation. Sulfoxide of MOP (MOP.SO) was detected at m/z 488 $[M-H]^-$ in the negative-ion mode. This metabolite was converted to sulfone (MOP.SO₂; m/z 504 $[M-H]^-$ in the negative-ion mode) via further S-oxidation. MOP.SO₂ is the main MOP metabolite in sheep, and it represents the only MOP metabolite described previously by Kinsella [7]. Arene hydroxylation (MOP.OH) represented the second way of MOP phase I biotransformation. MOP.OH was detected at m/z 488 $[M-H]^-$ in the negative-ion mode. This metabolite was

Fig. 2 Total ion current chromatogram of the sheep hepatocytes extract. Arrows show detected metabolites

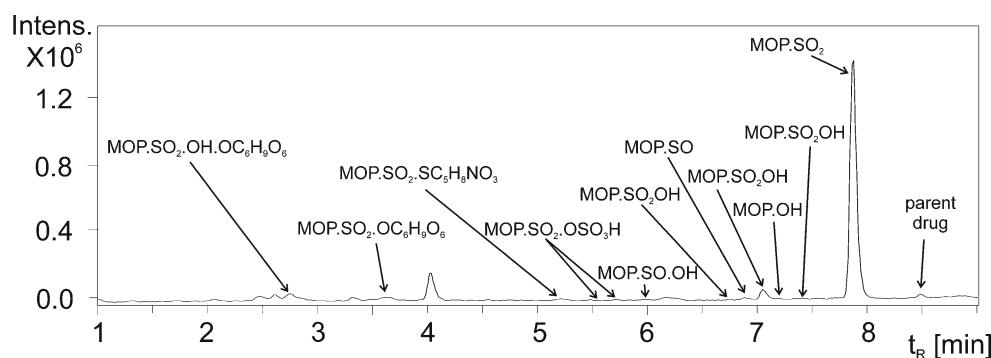


Table 1 List of main peaks for monepantel biotransformation samples detected by UHPLC/MS/MS with their retention times, theoretical and experimental values of $[M-H]^-$ ions in ESI negative-ion mode, mass accuracies, molecular weights, elemental composition, product ions, and description of present metabolites

t_R [min]	UHPLC	Important observed ions		Mass accuracy [ppm]	MW	Elemental composition	Description of metabolite formation		Product ions of $[M-H]^-$, m/z	Abbreviations
		ESI-MS, m/z , $[M-H]^-$					Phase I	Phase II		
		Theoretical	Experimental							
2.6		712.0677	712.0668	-1.3	713	$C_{20}H_{21}F_6N_3O_{15}S$	2*S-oxidation, 2*hydroxylation	Glucuronidation	536; 394; 374; 354; 218	MOP.SO ₂ .OH.LO.C ₆ H ₆ O ₆
3.6		696.0728	696.0729	0.1	697	$C_{20}H_{21}F_6N_3O_{11}S$	2*S-oxidation, hydroxylation	Glucuronidation	520; 378; 358; 202	MOP.SO ₂ .OC ₆ H ₆ O ₆
5.2		665.0605	665.0603	-0.3	666	$C_{25}H_{30}F_6N_4O_7S_2$	2*S-oxidation, hydroxylation	Conjugation with acetylcysteine	638; 347; 186	MOP.SO ₂ .SC ₃ H ₈ NO ₃
5.5		599.9975	599.9971	-0.7	601	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_8S_2$	2*S-oxidation, hydroxylation	Sulfation	520; 202	MOP.SO ₂ .OSO ₃ H
5.7		599.9975	599.9979	0.7	601	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_8S_2$	2*S-oxidation, hydroxylation	Sulfation	520; 202	MOP.SO ₂ .OSO ₃ H
6.0		504.0458	504.0462	0.8	505	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_4S$	S-oxidation, hydroxylation	-	435; 202	MOP.SO.OH
6.7		520.0407	520.0399	-1.5	521	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_5S$	2*S-oxidation, hydroxylation	-	493; 202	MOP.SO ₂ .OH
6.9		488.0509	488.0521	2.5	489	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_3S$	S-oxidation	-	186; 166	MOP.SO
7.1		520.0407	520.0416	1.7	521	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_5S$	2*S-oxidation, hydroxylation	-	493; 202; 182	MOP.SO ₂ .OH
7.2		488.0509	488.0505	-0.8	489	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_3S$	Hydroxylation	-	202; 182	MOP.OH
7.4		520.0407	520.0417	1.9	521	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_5S$	2*S-oxidation, hydroxylation	-	202; 182	MOP.SO ₂ .OH
7.9		504.0458	504.0455	-0.6	505	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_4S$	2*S-oxidation	-	186; 166	MOP.SO ₂
8.5		472.0560	472.0570	2.1	473	$C_{20}H_{13}F_6N_3O_2S$	-	-	186	MOP

consequently converted via S-oxidation to form the secondary metabolite (MOP.SO.OH; m/z 504 $[M-H]^-$ in the negative-ion mode). MS/MS spectra of two metabolites at m/z 488 (MOP.SO and MOP.OH) and m/z 504 (MOP.SO₂ and MOP.SO.OH) with the identical elemental composition are shown in Fig. 3. The different position of oxidation is easily recognized based on typical neutral losses. The presence of hydroxyl on the B ring is characterized by the fragment ion at m/z 202, whereas the oxidation on sulfur yields fragment ion at m/z 186 in accordance with the parent drug fragmentation.

MOP sulfone with arene hydroxylation (MOP.SO₂.OH) in various positions was identified in sheep. These metabolites, formed by two step S-oxidation and aromatic B hydroxylation, provided identical deprotonated molecules at m/z 520 $[M-H]^-$ in the negative-ion mode. In our experiments, three types of positional isomers were found. All positional isomers provide identical MS/MS spectra, and the position of hydroxylation cannot be distinguished based on mass spectra [22].

Another characteristic neutral losses for all phase I metabolites (except for MOP.SO.OH) were the hydrogen fluoride ($\Delta m/z$ 20) from the aromatic ring (B ring), for metabolites of MOP.SO and MOP.SO₂, ion m/z 166 $[186-HF]^-$, and for arene hydroxylation metabolites, ion m/z 182 $[202-HF]^-$, respectively. In case of MOP.SO.OH metabolite, the product ion at m/z 435 (Fig. 3) was formed via loss of trifluoromethyl group $[504-CF_3]^-$. The neutral loss of HCN ($\Delta m/z$ 27) was observed for MOP.SO₂.OH metabolite in the fragment ion m/z 493 $[520-HCN]^-$. MOP metabolites with reduced carbonyl group were not found, although other anthelmintics with carbonyl group (flubendazole, mebendazole) undergo carbonyl reduction during biotransformation. In MOP, carbonyl group is probably stabilized by peptide bond and nitrile group.

All MOP phase I metabolites described above were found in 24-h incubations of MOP with the primary culture of ovine hepatocytes. Cytochrome P450 superfamily are the main enzymes that could catalyze MOP arene hydroxylation. These enzymes together with flavine monooxygenases could also be responsible for MOP S-oxidation [21], but the specific identification of participating enzymes will be matter of further study.

Phase II metabolites of MOP

Functional groups formed during phase I biotransformation are often sites of phase II biotransformation. Most phase II biotransformation reactions result in a significant increase in the hydrophilicity of metabolites, which greatly promotes the excretion of xenobiotics. In sheep in vitro samples, MOP glucuronides, sulfate, and acetylcysteine conjugates were found as products of MOP phase II biotransformation

Table 2 List of product ions and substituents of MOP metabolites of phase I and II biotransformation

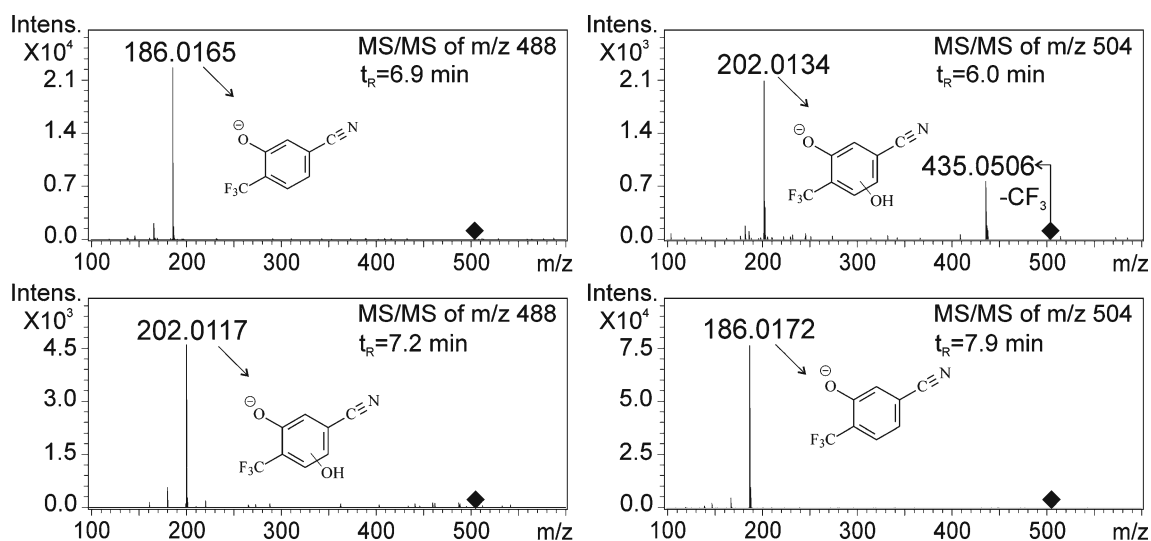
Metabolite	Substituent R ₁	Substituent R ₂	Substituent R ₃	Substituent R ₄	Key fragment ions, <i>m/z</i>
MOP	–	–	H	H	186
MOP.SO	O	–	–	–	186
MOP.SO ₂	O	O	–	–	186
MOP.OH	–	–	OH	–	202
MOP.SO.OH	O	–	OH	–	202
MOP.SO ₂ .OH	O	O	OH	–	202
MOP.SO ₂ .OH.OC ₆ H ₉ O ₆	O	O	OC ₆ H ₉ O ₆	OH	394
MOP.SO ₂ .OC ₆ H ₉ O ₆	O	O	OC ₆ H ₉ O ₆	–	378
MOP.SO ₂ .SC ₅ H ₈ NO ₃	O	O	SC ₅ H ₈ NO ₃	–	347

(Fig. 4). The glucuronidation is a major pathway of xenobiotic biotransformation in mammalian species except for the cat family. The glucuronidation requires the cofactor uridine diphosphate–glucuronic acid, and the reaction is catalyzed by UDP-glucuronosyltransferases. Glucuronide conjugates of xenobiotics and endogenous compounds are polar, water-soluble conjugates that are eliminated from the body in urine or bile. Many of xenobiotics and endogenous substrates that undergo *O*-glucuronidation also undergo sulfate conjugation. The sulfate conjugation generally produces a highly water-soluble sulfuric acid ester. This reaction is catalyzed by sulfotransferases, and the cofactor for the reaction is 3′-phosphoadenosine-5′-phosphosulfate. Many xenobiotic compounds are commonly conjugated with tripeptide glutathione through the action of glutathione S-transferases. Formed glutathione conjugates are unstable in many cases, and they are converted to conjugates with mercapturic acids (acetylcysteine) via the sequential cleavage of glutamic acid and glycine from the glutathione moiety, followed by *N*-acetylation of the resulting cysteine

conjugate [21]. For the identification of MOP phase II conjugates, the similar fragmentation pattern as for phase I metabolites fragmentation were expected due to the similarity of molecular structures.

In ovine samples, the glucuronide of dihydroxylated MOP sulfone, MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆, with deprotonated molecule at *m/z* 712 was found. Glucuronide of hydroxylated MOP sulfone, MOP.SO₂.OC₆H₉O₆, with *m/z* 696 [M-H][−] was another detected MOP metabolite. The compound at *m/z* 665 [M-H][−] was identified as MOP sulfone conjugated with acetylcysteine (MOP.SO₂.SC₅H₈NO₃). Two sulfates of hydroxylated MOP sulfone, MOP.SO₂.OSO₃H, at *m/z* 600 [M-H][−] with different elution times were also detected in ovine hepatocytes.

Three metabolites (MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆, MOP.SO₂.OC₆H₉O₆, MOP.SO₂.SC₅H₈NO₃) had similar product ions as the parent drug (*m/z* 186), but these metabolites differed by substituents on the aromatic B ring, which resulted in fragments *m/z* 394 for MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆, *m/z* 378 for MOP.SO₂.OC₆H₉O₆, and *m/z* 347 for

**Fig. 3** Tandem mass spectra of [M-H][−] ions *m/z* 488 and *m/z* 504 (see Table 1)

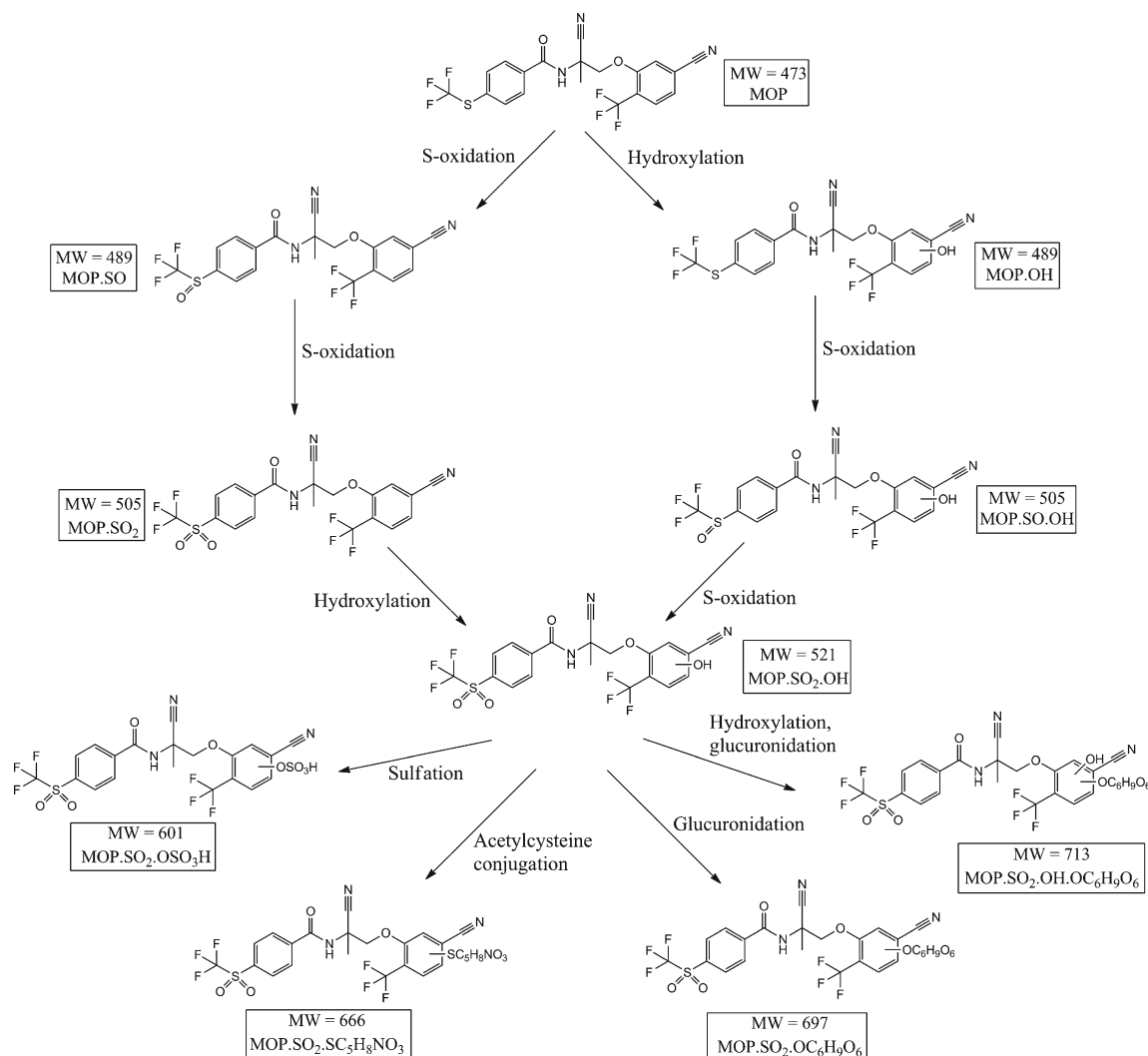


Fig. 4 Scheme of metabolic pathways of MOP in sheep in vitro study

MOP.SO₂.SC₅H₈NO₃ (Table 1). All metabolites of phase II biotransformation had similar product ion with characteristic losses of substituents on the aromatic B ring, at m/z 218 [394-C₆H₈O₆]⁻ for MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆, at m/z 202 [378-C₆H₈O₆]⁻ for MOP.SO₂.OC₆H₉O₆, at m/z 186 [347-SC₅H₈NO₃]⁻ for MOP.SO₂.SC₅H₈NO₃. Two metabolites (MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆, MOP.SO₂.OC₆H₉O₆) had the same neutral loss of the anhydroglucuronic acid $\Delta m/z$ 176 from the aromatic B ring, at m/z 536 [712-C₆H₈O₆]⁻ and at m/z 520 [696-C₆H₈O₆]⁻, respectively. This is the characteristic neutral loss for all types of glucuronides [9, 23]. The identification of the conjugation site by MS is a difficult task, and the distinction is mostly achieved only for conjugation sites on different aromatic rings. Both metabolites had the characteristic neutral loss of hydrogen fluoride ($\Delta m/z$ 20) from the aromatic B ring, ion m/z 374 [394-HF]⁻, and ion m/z 354 [374-HF]⁻ for MOP.SO₂.OH.OC₆H₉O₆ and ion m/z 358 [378-HF]⁻ for MOP.SO₂.OC₆H₉O₆, respectively.

The product ion at m/z 520 [600-SO₃]⁻ corresponds to sulfate of MOP sulfone (MOP.SO₂.OSO₃H). Only conjugate with acetylcysteine MOP.SO₂.SC₅H₈NO₃ had the neutral loss of HCN ($\Delta m/z$ 27) at m/z 638 [665-HCN]⁻.

Conclusions

The aim of this study was to extend the knowledge of biotransformation of a new anthelmintic drug MOP in sheep. For this purpose, the incubation of MOP in the primary culture of ovine hepatocytes followed by SPE was used. All detected metabolites were identified using UHPLC/ESI-MS/MS technique in the negative-ion mode. The advantage of high mass accuracy measurements on QqTOF analyzer is the determination of elemental composition according to accurate m/z values of deprotonated molecules and their fragment ions. Typical neutral losses

allowed distinguishing the position of oxidation. Five MOP phase I metabolites and four phase II metabolites were detected in ovine hepatocytes. MOP biotransformation consisted of two-step S-oxidation, hydroxylation, sulfation, glucuronidation, and conjugation with glutathione followed by hydrolysis and acetylation resulting in MOP-conjugate with acetylcysteine. Obtained results demonstrate the ability of ovine hepatocytes to extensively metabolize MOP using both phase I and II phase biotransformation enzymes. Based on these results, the scheme of metabolic pathway of MOP in sheep has been proposed.

Acknowledgments This project was supported by the Czech Science Foundation (GA ČR, grant No. P502/10/0217), by the Grant Agency of Charles University (GA UK, grant No. 673612/B-CH/2012) and by the Charles University in Prague (research projects SVV 265 004).

References

- Leathwick DM (2012) Modelling the benefits a new class of anthelmintic in combination. *Vet Parasitol* 186:93–100
- Papadopoulos E (2008) Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Rumin Res* 76:99–103
- Gobert NG, Jones MK (2008) Discovering new schistosome drug targets: the role of transcriptomics. *Curr Drug Targets* 9:922–930
- Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20:477–481
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452:176–180
- Ducray P, Gauvry N, Pautrat F, Goebel T, Fruechtel J, Desaulles Y, Weber SS, Bouvier J, Wagner T, Froelich O, Kaminsky R (2008) Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 18:2935–2938
- Kinsella B, Byrne P, Cantwell H, McCormack M, Furey A, Danaher M (2011) Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC-MS/MS and QuEChERS method. *J Chromatogr B* 879:3707–3713
- Karadzovska D, Seewald W, Browning A, Smal M, Bouvier J, Giraudel JM (2008) Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 32:359–367
- Holčapek M, Kolářová L, Nobilis M (2008) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem* 391:59–78
- Vokřál I, Jedličková V, Jirásko R, Stuchlíková L, Bártíková H, Skálová L, Lamka J, Holčapek M, Szotáková B (2011) Metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Vet Parasitol* 185:168–174
- Vokřál I, Jirásko R, Jedličková V, Bártíková H, Skálová L, Lamka J, Holčapek M, Szotáková B (2012) The inability of tapeworm *Hymenolepis diminuta* and fluke *Dicrocoelium dendriticum* to metabolize praziquantel. *Vet Parasitol* 185:168–174
- Holčapek M, Jirásko R, Lísa M (2012) Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J Chromatogr A* 1259:3–15
- Liu DQ, Hop CE (2005) Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. *J Pharm Biomed Anal* 37:1–18
- Liu X, Jia L (2007) The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies. *Curr Drug Metab* 8:815–821
- Jirásko R, Holčapek M, Nobilis M (2011) Identification of phase I and phase II metabolites of benfluron and dimefluron in rat urine using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 25:2153–2162
- Staack RF, Hopfgartner G (2007) New analytical strategies in studying drug metabolism. *Anal Bioanal Chem* 388:1365–1380
- Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ (1991) Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: Burdow RH, van Knippenberg PH (eds) Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. Elsevier Science, Amsterdam, pp 15–35
- Baliharová V, Velík J, Savlík M, Szotáková B, Lamka J, Tahotná L, Skálová L (2004) The effects of fenbendazole, flubendazole and mebendazole on activities of hepatic cytochromes P450 in pig. *J Vet Pharmacol Ther* 27:85–90
- Velík J, Baliharová V, Skálová L, Szotáková B, Wsól V, Lamka J (2003) Stereospecific biotransformation of albendazole in muflon and rat-isolated hepatocytes. *J Vet Pharmacol Ther* 26:297–302
- Montesissa C, Anfossi P, Van't Klooster G, Mengelers M (1996) The use of cultured hepatocytes from goats and cattle to investigate xenobiotic oxidative metabolism. *Vet Res Commun* 20:449–460
- Parkinson A (2001) In: Klaassen CD (ed) Casarett & Doull's toxicology—the basic science of poisons. New York, McGraw-Hill
- Nobilis M, Anzenbacher P, Pastera J, Svoboda Z, Hrubý K, Května J, Ubik K, Trejtnar F (1996) Study of the biotransformation of a potential benzocfluorene antineoplastic using high-performance liquid chromatography with high-speed-scanning ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 681:143–151
- Holčapek M, Jirásko R, Lísa M (2010) Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J Chromatogr A* 25:3908–3921

9.1.2 Publikace II.

- II. Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Valát, M., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2014) Metabolic pathways of anthelmintic drug monepantel in sheep and in its parasite (*Haemonchus contortus*). *Drug Testing and Analysis*. 6: 1055-1062. IF₂₀₁₄ = 2,816

9.1.3 Publikace III.

- III. Lecová, L., Stuchlíková, L., Lamka, J., Špulák, M., Várady, M., Skálová, L. (2013)
Efficacy of monepantel against lower developmental stages of a multi-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates: an *in vitro* study. *Helmintologia*, 50: 91-95. IF₂₀₁₃ = 0,776

9.1.4 Publikace IV.

- IV. Stuchlíková, L., Lecová, L., Jirásko, R., Lamka, J., Szotáková, B., Holčapek, M., Skálová, L. (2015) Comparison of biotransformation and efficacy of aminoacetonitrile anthelmintics *in vitro*. *Drug Testing and Analysis*. (in press) IF₂₀₁₄ = 2,816

9.1.5 Publikace V.

- V. Stuchlíková, L., Matoušková, P., Bártíková, H., Vokřál, I., Štolcová, T., Pětníková H., Lamka, J., Szotáková, B., Kubiček, V., Skálová, L. (2015) Monepantel induced hepatic cytochromes P450 in sheep *in vivo* and *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*. 227: 63-68. IF₂₀₁₃ = 2,982

9.1.6 Publikace VI.

- VI. *Lecová, L., Stuchlíková, L., Prchal, L., Skálová, L. (2014) Monepantel - the most studied new anthelmintic drug of recent years. *Parasitology*. 141: 1686-1698.*
IF₂₀₁₄ = 2,350

9.2 Ostatní publikace v recenzovaných časopisech

Bártíková H., Skálová L., Stuchlíková L., Vokřál I., Vaněk T., Podlipná R. (2015) Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug Metabolism Review* (submitted) IF₂₀₁₃ = 3,487

Prchal, L., Bártíková, H., Bečanová, A., Jirásko, I., Vokřál, I., Stuchlíková, L., Skálová, L., Kubíček, V., Lamka, J., Trejtnar, F., Szotáková, B. (2015) Biotransformation of anthelmintics and the activity of drug-metabolizing enzymes in the tapeworm *Moniezia expanza*. *Parasitology*. 142: 648-659. IF₂₀₁₄ = 2,350

Vokřál, I., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Skálová, L. (2013) Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology*. 196: 373-381. IF₂₀₁₃ = 2,545

Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H., Szotáková, B., Kubíček, V., Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vaněk, T., Vokřál, I. (2013) Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology*. 144: 216-224. IF₂₀₁₃ = 5,039

Vokřál, I., Jedličková, V., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Skálová, L., Lamka, J., Holčapek, M., Szotáková, B. (2013) The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology*, 140: 361-367. IF₂₀₁₃ = 2,350

Vokřál, I., Bártíková, H., Prchal, L., Stuchlíková, L., Skálová, L., Szotáková, B., Lamka, J., Várady, M., Kubíček, V. (2012) The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 139: 1309-1316. IF₂₀₁₂ = 2,355

9.3 Prezentace na konferencích

Stuchlíková, L., Lecová, L., Štolcová, T., Pětníková, H., Lamka, J., Szotáková, B., Kubíček, V., Skálová, L. Modulation of selected drug-metabolizing enzymes by monepantel in sheep *in vivo*. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting 19.-23.10.2014 San Francisco, Californie, USA; sborník abstraktů str. 150-151

Stuchlíková, L., Lecová, L., Jirásko, R., Valát, M., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. *In vitro* comparative study of metabolic pathways and efficacy of monepantel and its derivatives. V4 Parasitological meeting 26.-30.5.2014, Stará Lesná, Slovensko; sborník abstraktů str. 120

Stuchlíková, L., Bártíková, H., Jirásko, R., Valát, M., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. Comparative study of the metabolic pathway of new anthelmintic drug monepantel in host and parasite using UHPLC/MS technique. 10th International ISSX meeting 29.9.-3.10.2013, Toronto, Ontario, Kanada; sborník abstraktů str. 140

Stuchlíková, L., Jirásko, R., Valát, M., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. Identification of metabolic pathways of monepantel in sheep *in vivo* using UHPLC/MS technique. 27. Xenobiochemické sympozium 27.-30.5.2013, Pavlov, Česká republika; sborník abstraktů str. 53

Stuchlíková, L., Jirásko, R., Valát, M., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Skálová, L. UHPLC/MS/MS identification of monepantel metabolites formed *ex vivo* and *in vitro* in *Haemonchus contortus*. 20. Helmintologické dny 13.-17.5.2013, Štědrónín u Orlíku, Česká republika; sborník abstraktů str. 50

Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vokřál, I., Lamka, J., Szotáková, B., Bártíková, H., Valát, M., Skálová, L. Liquid chromatography-mass spectrometry identification of monepantel metabolites formed *in vitro* and *in vivo* by sheep (*Ovis species*). 23. Biochemický sjezd 26.-29.8.2012, Brno, Česká republika; sborník abstraktů str. 172

Stuchlíková L., Jirásko R., Vokřál I., Lamka J., Špulák M., Holčapek M., Szotáková B., Bártíková H., Pour M., Skálová L. UHPLC/MS/MS identifikace metabolitů MONEPANTELU in vitro v ovčích hepatocytech. 3. Postgraduální & 1. postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK 29.-30.1.2012, Hradec Králové, Česká republika