

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

BIOTRANSFORMACE VYBRANÝCH ANTHELMINTIK U VLASOVKY SLEZOVÉ

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Anna Sečkařová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.“

Anna Sečkařová

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Lucii Raisové Stuchlíkové, Ph. D. za metodické vedení, cenné rady a připomínky k experimentální práci. Rovněž děkuji za možnost vypracovat diplomovou práci za podpory Grantové agentury České republiky 17-11954Y a Univerzity Karlovy v Praze v rámci projektů PRIMUS/17/SCI/4 a SVV 206 416.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Anna Sečkařová

Školitel: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Biotransformace vybraných anthelmintik u vlasovky slezové

Rezistence na benzimidazolová anthelmintika je jeden z hlavních problémů, se kterými se potýká chov malých přežvýkavců. Nejproblematictějším parazitem ovcí a koz je krevsající vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), která každoročně způsobuje obrovské ztráty. Cílem této práce bylo studium metabolismu vybraných benzimidazolů (albendazol, ABZ, rikobendazol, RCB a flubendazol, FLU) u vlasovky slezové. Byl porovnáván metabolismus samců a samic a dále citlivý kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3) s rezistentním kmenem IRE (Inbred Resistant Edingburgh, MHco5). Pro detekci metabolitů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (UHPLC/MS). Bylo identifikováno 12 metabolitů FLU, 9 metabolitů ABZ a 7 metabolitů RCB. Na základě identifikovaných metabolitů byla navržena metabolická schémata. Při porovnávání metabolismu byly nalezeny významné rozdíly mezi pohlavími i mezi kmeny. Samice testovaná anthelmintika metabolizovaly intenzivněji než samci. Několik metabolitů bylo identifikováno pouze u samic rezistentního kmene IRE. Z výsledků je patrné, že zvýšený metabolismus anthelmintik může hrát roli v mechanismu rezistence.

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Anna Sečkařová

Supervisor: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Biotransformation of selected anthelmintics in *Haemonchus contortus*

Resistance to benzimidazole anthelmintics is one of the main problems of small ruminant producers. The most problematic parasite of goats and sheep is the bloodsucking barber's pole worm, *Haemonchus contortus*. This parasite is responsible for considerable losses every year. The goal of this thesis was an analysis of the metabolism of a few selected benzimidazoles (albendazole, ABZ; ricobendazole, RCB and flubendazole, FLU) in *H. contortus*. The metabolism of male and female worms and a susceptible ISE strain (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3) with a resistant IRE strain (Inbred Resistant Edinburgh, MHco5) were compared. For metabolite detection, ultra-high-performance liquid chromatography with mass spectrometry (UHPLC/MS) was used. 12 metabolites of FLU, 9 metabolites of ABZ and 7 metabolites of RCB were identified. From the identified metabolites, schemes of metabolism were proposed. In metabolism comparisons, significant differences between sexes and strains were found. Female worms metabolized tested anthelmintics more intensively than males. A few metabolites were only identified in the females of the resistant IRE strain. From these results, it is evident that increased metabolism of anthelmintics may play a part in the mechanism of resistance.

# OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	9
<b>2. Teoretická část</b> .....	10
2.1 <i>Haemonchus contortus</i> .....	10
2.1.1 Morfologie .....	10
2.1.2 Druhy vlasovek .....	11
2.1.3 Životní cyklus .....	12
2.2 Helmintózy .....	13
2.2.1 Haemonchóza .....	13
2.2.2 Diagnostika helmintóz .....	14
2.2.2.1 Koproskopické metody .....	14
2.2.2.2 Identifikace genových sekvencí parazita .....	15
2.2.2.3 Měření ztrát krve způsobených vlasovkou slezovou .....	16
2.2.3 Nefarmakologická opatření .....	17
2.3 Anthelmintika .....	20
2.3.1 Rozdělení anthelmintik podle chemické struktury .....	20
2.3.1.1 Benzimidazoly .....	20
2.3.1.2 Imidazothiazoly .....	21
2.3.1.3 Makrocyclické laktony .....	21
2.3.1.4 Derquantel .....	22
2.3.1.5 Aminoacetonitrilové deriváty .....	22
2.3.2 Důvody selhávání anthelmintik .....	22
2.3.3 Budoucnost anthelmintik .....	23
2.4 Rezistence .....	25
2.5 Metabolismus xenobiotik .....	26
2.5.1 Všeobecné rysy metabolismu xenobiotik .....	26
2.5.2 Metabolismus xenobiotik u vlasovek .....	26
2.5.2.1 Enzymy I. fáze metabolismu .....	26
2.5.2.2 Enzymy II. fáze metabolismu .....	27
2.5.2.3 Transportéry .....	28
2.5.3 Role metabolismu ve vzniku rezistence u helmintů .....	28
2.5.4 Stav výzkumu metabolismu u helmintů se zaměřením na benzimidazoly .....	29

2.5.4.1	Albendazol .....	29
2.5.4.2	Flubendazol.....	30
2.6	Metody stanovení metabolitů v biologickém materiálu .....	31
2.6.1	Kapalinová chromatografie .....	31
2.6.1.1	HPLC .....	31
2.6.1.2	UHPLC .....	32
2.6.2	Hmotnostní spektrometrie .....	32
2.6.2.1	Ionizační zdroje.....	33
2.6.2.2	Analyzátoary – typy hmotnostních spektrometrů.....	34
2.6.2.3	Detektory .....	35
2.6.2.4	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	35
2.6.2.5	Možnosti interpretace hmotnostních spekter .....	36
<b>3.</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>38</b>
4.1	Biologický materiál, přístrojové vybavení, reagentie a chemikálie.....	38
4.1.1	Biologický materiál .....	38
4.1.2	Přístrojové vybavení.....	38
4.1.3	Reagentie a chemikálie .....	39
4.2	Pracovní postupy .....	40
4.2.1	Příprava pracovních roztoků .....	40
4.2.2	Sběr biologického materiálu.....	40
4.2.3	Rozdělení červů a jejich inkubace.....	41
4.2.4	Zpracování červů a médií, SPE extrakce.....	42
4.2.5	Rozpouštění odparků v mobilní fázi .....	43
4.2.6	Stanovení bílkovin.....	43
4.2.7	LC/MS analýza.....	44
4.2.8	Statistické zpracování.....	45
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>46</b>
5.1	Stanovení bílkovin .....	46
5.2	Flubendazol.....	48
5.2.1	Metabolity I. fáze .....	48
5.2.2	Metabolity II. fáze .....	49
5.3	Albendazol .....	53
5.3.1	Metabolity I. fáze .....	53

5.3.2 Metabolity II. fáze .....	53
5.4 Rikobendazol (Albendazol-sulfoxid).....	56
<b>6. Diskuze .....</b>	<b>59</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>64</b>
<b>8. Seznam zkratek.....</b>	<b>65</b>
<b>9. Seznam použité literatury .....</b>	<b>68</b>
<b>10. Příloha - Chemické vzorce iontů identifikovaných při tandemové hmotnostní spektrometrii .....</b>	<b>81</b>



# 1. Úvod

Jedna z nejrozšířenějších helmintóz v chovech zvířat po celém světě je infekce vlasovkou slezovou. Tento parazit, stejně jako ostatní hlístice, se byl schopen v posledních letech vyvinout natolik, že na něj v mnoha lokalitách už žádná anthelmintika nezabírají (Kaplan a Vidyashankar 2012). V posledních letech se sice podařilo uvést na trh nová efektivní anthelmintika, i na ně však byla již hlášena rezistence.

Aby se předešlo rezistenci, je potřeba dodržovat nefarmakologická opatření (vytvoření refugií parazitů pro snížení evolučního tlaku na vznik rezistence na anthelmintika, rotace spásaných prostor, kvalitní strava ovcí atd.) v kombinaci s efektivním užíváním anthelmintik. Důležité je také neaplikovat terapii plošně celým stádům, ale jen tehdy a těm zvířatům, pro která je to skutečně prospěšné.

Tento palčivý problém chovů drobných přežvýkavců přitahuje v posledních desetiletích také pozornost farmaceutických expertů. Metabolismus hlístic však není detailně prozkoumán a stále je tu mnoho nejasností. Řadu let byly jejich metabolické pochody málo prozkoumány a mělo se za to, že jejich biotransformace je převážně redukční (Cvilink et al. 2009). Později však bylo prokázáno, že nematoda disponují poměrně širokou paletou biotransformačních enzymů, které by mohly přispívat k jejich značné odolnosti vůči anthelmintikům (Robinson et al. 2004b, Vokřál et al. 2012, 2013).

Tato práce na tyto studie navazuje a využívá toho, že je od nedávné doby dostupný kmen *H. contortus* MHco5, který je blízce příbuzný standardnímu citlivému kmeni stejného parazita, MHco3, běžně nazývanému ISE, avšak na rozdíl od něj je rezistentní na benzimidazoly (Yilmaz et al. 2017). Na těchto kmenech jsou porovnány rozdíly v metabolismu samců a samic, které jsou u zvířat běžné, u helmintů však dosud neprozkoumané. Použita je velmi citlivá analytická metoda, umožňující identifikovat i metabolity, vyskytující se ve stopových množstvích.

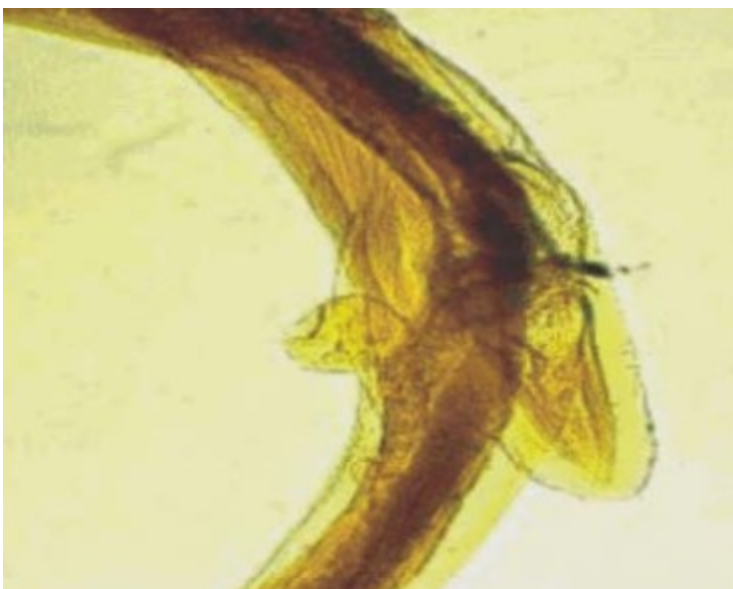
## 2. Teoretická část

### 2.1 *Haemonchus contortus*

*Haemonchus contortus* - vlasovka slezová je krevsající žaludeční parazit ovcí a koz. Jedná se o živočicha patřícího do kmene hlístice (Nematoda), řádu Strongylida, čeledi Trichostrongylidae. Způsobuje značné ztráty v napadených chovech působením anémie až úhynu výrazně napadených zvířat. Vyskytuje se převážně v tropických a subtropických oblastech. V dnešní době je však rozšířen po celé zeměkouli vyjma Antarktidy. Ve zvířatech je lze snadno identifikovat jejich specifickou lokalizací v *abomasu* a poměrně velkým tělem samic (2-3 cm) (Kuchai et al. 2012).

#### 2.1.1 Morfologie

Parazit má válcovité tělo s načervenalým zbarvením, způsobeným krví, kterou se živí. Samice jsou větší, dosahují 18-30 mm, zatímco samci dorůstají jen 10-20 mm. Samci mají kopulační bursu s asymetrickým zádovým lalokem. Tělo je pokryto kutikulou složenou ze tří vrstev, která chrání parazita před strávením žaludečními šťávami. Spikuly samců měří okolo 500 µm, každý má u konce malý háček. Samice mají typicky žíhané zbarvení způsobené tím, že mají navzájem stočená bílá ovaria a načervenalá, krví naplněná střeva. Odtud také pochází anglický název vlasovky – barber's pole worm. Vulva samice je chráněna jazykovitým výběžkem, který je velmi dobře viditelný (Tak et al. 2014).

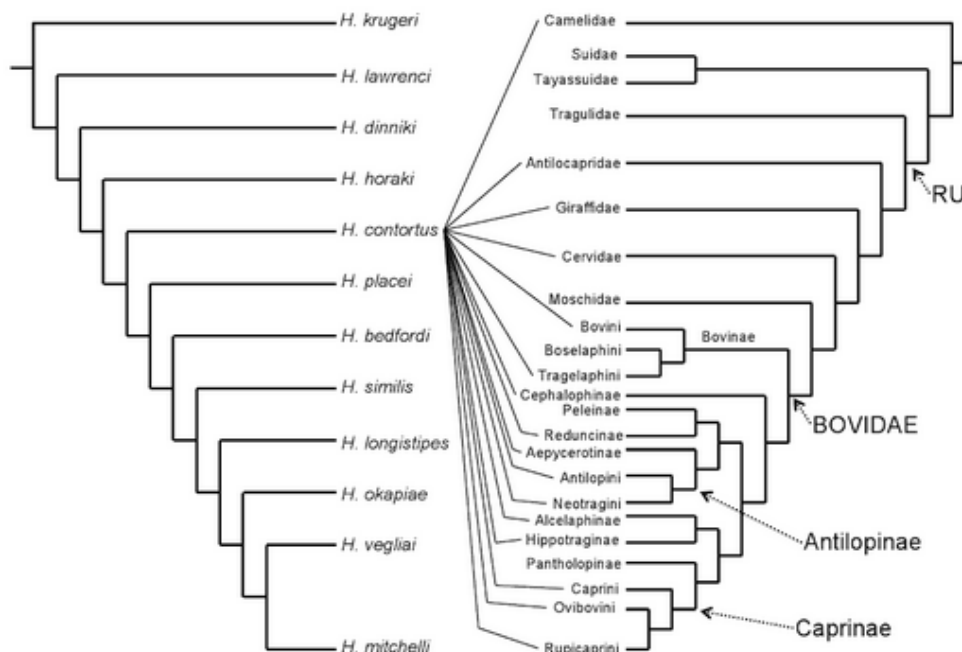


Obr. 1. Vulvální oblast samice *Haemonchus contortus* při pohledu pod mikroskopem.

## 2.1.2 Druhy vlasovek

Aktuálně je uznáváno 12 druhů vlasovek. Většina z nich je však omezena jen na určitou oblast nebo určitého hostitele. Nejrozšířenější územně i počtem hostitelů je *Haemonchus contortus*, parazit nejčastěji napadající malé přežvýkavce. Dalšími velmi rozšířenými jsou *H. placei* a *H. similis*, kteří více napadají skot. Vzhledem k přizpůsobivosti parazitů je však chybou se domnívat, že podle druhu hostitele je možné spolehlivě určit druh parazita. Vlasovky jsou si velmi podobné, proto je někteří vědci berou jako varianty jednoho druhu, který nazývají *H. contortus*. Existuje však dostatečné množství rozdílů, které je identifikuje jako samostatné druhy (Gasser a von Samson-Himmelstjerna 2016).

Důležité je to například proto, že hostitelé infikovaní *H. placei* nejsou schopní si vyvinout zkříženou imunitu na *H. contortus*. Naopak pokud je stejné zvíře dvakrát infikováno vlasovkou stejného druhu, imunitní odpověď výrazně komplikuje uchycení parazita při druhé infekci a tak výrazně snižuje její závažnost. U ovcí je imunitní odpověď na *H. placei* intenzivnější než na typičtějšího parazita ovcí, *H. contortus*. To je pravděpodobně dáno společnou koevolucí těchto dvou druhů, kdy *H. contortus* není imunitním systémem ovce tak dobře rozeznáván (Santos et al. 2014). Zvířata jsou často infikována oběma druhy naráz.



Obr. 2. Uznávané druhy vlasovek. Většina z nich se specializuje na několik málo druhů hostitelů. Nejvýraznější výjimku tvoří vlasovka slezová, pro kterou je na obrázku vypsána širší škála hostitelů, které může napadnout (Gasser a von Samson-Himmelstjerna 2016).

### 2.1.3 Životní cyklus:

*H. contortus* má přímý životní cyklus a pro svůj vývoj nepotřebuje meziphostitele. Rozlišujeme larvy pěti stadií, L<sub>1</sub>-L<sub>5</sub>.

Vajíčka z trusu se na pastvině vylíhnou v larvu stadia L<sub>1</sub>, která se vyvine v larvu stadia L<sub>3</sub> ve vhodných podmínkách již za 5 dní. Stadia L<sub>1</sub> a L<sub>2</sub> se živí bakteriemi přítomnými na pastvině. L<sub>3</sub> potravu nepřijímá, jde o zapouzdřené stadium, velmi odolné vůči vnějším podmínkám. Po pozření přežvýkavcem se larva v rumen odpouzdří a dvakrát svlékne. Stadium L<sub>4</sub> se již živí krví ze sliznice *abomasa* (Laing et al. 2013). Doba od nákazy hostitele po počátek produkce vajíček se nazývá prepatentní perioda. U *H. contortus* je dlouhá cca 2-3 týdny, u *H. placei*, který napadá převážně skot, je delší, kolem 4 týdnů (Santos et al. 2014). Jedna samice je za den schopná vyprodukovat až 10 000 vajíček. Populace na pastvinách je většinou výrazně početnější, než podíl červů ve svých hostitelích (Prichard 2001).

*H. contortus* se dokáže velmi rychle množit v pro něj příznivých podmínkách – v teple a vlhku. Je schopen přežít pro něj nepříznivá období jako hypobiotická larva – inaktivní L<sub>4</sub> v hostiteli, která se dále nevyvíjí. Tato vlastnost je obzvláště důležitá v chladnějším a sušším klimatu. Reinfekce na jaře je usnadněna oslabením imunity v puerperálním období (Waller et al. 2004).

## 2.2. Helmintózy

Současná situace naznačuje, že postupy pro kontrolu helmintóz přestávají být dostačující. Parazitující hlístice se vyvinuly v koexistenci se svými hostiteli, na nichž se přiživují, ale málokdy je ohrožují na životě. Domestikace však způsobila stav, který více vyhovuje hlísticím, a ty proto získávají převahu. Tato dysbalance je způsobena chovem přežvýkavců ve velkých stádech na poměrně menších pastvinách a pastvou ve stále stejné oblasti. Dalším problémem je zavlékání helmintů z jiných oblastí světa spolu s hostitelskými zvířaty (Sargison 2012).

Mezi druhy výrazně omezující produktivitu ovcí patří *Teladorsagia circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus columbriformis* a *Nematodirus battus*. Hlístice škodí svým hostitelům převážně odebíráním živin a narušováním jejich imunitního systému. Infikovaný přežvýkavec toho méně spase a méně živin využije na produkci biomasy, proteiny se místo toho využijí na imunologickou odpověď a na opravu poškozených tkání. Infekce parazity *Ostertagia circumcincta* nebo *Haemonchus contortus* zvyšuje pH slezu a snižuje sekreci pepsinogenu (Greer 2008).

Nejpřirozenější způsob, jak se vyhnout helmintózám, je chovat ovce extenzivním způsobem, na velkých plochách, po menších stádech. Pomáhá i pasení spolu s jinými přežvýkavci. Ekonomicky je však tento způsob chovu náročnější. Je vhodné alespoň střídat pastviny tak, aby daná pastvina měla období, kdy se na ní alespoň půl roku v kuse nepasou ovce. Taková pastvina se dá použít pro jiné přežvýkavce, nebo například jako pole. Problém je však v tom, že ovce se často chovají na málo úrodné, zpravidla výše položené nebo členité půdě, kterou nelze jinak hospodářsky využít (Sargison 2012).

### 2.2.1 Haemonchóza

Inkubační doba haemonchózy u ovcí je 2-3 týdny. Jeden červ za den vysaje asi 0,05 ml krve za den, jejich nálož se však u akutní haemonchózy může pohybovat v desetitisícovkách. Při chronické haemonchóze může několik stovek červů z dlouhodobého hlediska oslabovat zvířata (Urquhart et al. 1987). Akutní onemocnění se projevuje edémy, především submandibulárnými nebo ascitem, anémií, abomasitidou, dále letargií a tmavými výkaly. Sekundárně se může projevit porucha funkce kostní dřeně. U chronické haemonchózy se vyskytuje převážně slabost a inapetence.

U krav není haemonchóza tak závažná jako u ovcí a koz z toho důvodu, že krávy mají tendenci si na tohoto parazita vytvářet přirozenou imunitu a zvířata starší dvou let již většinou klinicky neonemocní (Urquhart et al. 1987).

## **2.2.2 Diagnostika helmintóz**

Problematická zůstává i diagnostika helmintóz. V současnosti je nejpoužívanější FECRT (fecal egg count reduction test), který je nejméně nákladný.

### **2.2.2.1 Koproskopické metody**

Všechny tyto metody by měly být prováděny z čerstvého trusu, ideálně přímo z rekta daného zvířete, aby se zamezilo záměnám a vzorek se nekontaminoval. Pouhá tvorba koproskopického preparátu nemusí být dostatečně citlivá, další metody proto slouží k zakoncentrování parazitů z trusu (Jacobs et al. 2016).

Koproskopické metody většinou nerozlišují, kterého parazita zvíře ve skutečnosti má a zda nemá smíšenou infekci. Vajíčka *H. contortus* lze od ostatních odlišit tím, že hojně váží arašídový agglutinin, což je možné využít při rozlišování pomocí průtokové cytometrie nebo mikroskopu (Colditz et al. 2002). Jednotlivé parazity lze od sebe lépe rozeznat založením larvální kultury a identifikací larev namísto vajíček, která jsou si příliš podobná. To však trvá 7-10 dní. Místo toho se v současnosti vyvíjejí metody založené na PCR, které by identifikaci zkrátily na pouhý den (Preston et al. 2014).

### **Flotační metody**

Jsou nejpoužívanější technikou zakoncentrování parazitárních útvarů z trusu. Flotační roztok má vyšší hustotu a vajíčka a larvy tak vyplavou na hladinu, odkud se sbírají a přenášejí na mikroskopické sklíčko. Při použití známých objemů je možné odhadnout počet vajíček nebo larev v 1 g trusu (Jacobs et al. 2016). Na toto se používá McMasterova kvantifikační metoda nebo Willisova technika, která dosahuje vyšší přesnosti (Basetto et al. 2011).

### **FECRT**

Následuje po zakoncentrování vajíček z trusu. Test snížení počtu vajíček v trusu postiženého zvířete porovnává množství vajíček v trusu před a po aplikaci anthelmintik.

Tím určuje, zda je infekce na dané anthelmintikum citlivá. Nerozlišuje však, o jakého parazita se jedná.

FECRT má bohužel stanovené standardy jen pro ovce, a ty jsou navíc přes 20 let staré (Coles et al. 1992). Je tu velké riziko chybného určení, je-li daná skupina zvířat infikována rezistentním kmenem nebo ne. Počet vajíček v trusu je navíc velmi variabilní, je proto doporučeno dělat FECRT ve třech opakováních, běžně se však provádí z jediného vzorku (Vercruyssen et al. 2001).

Odchylku může způsobovat také rychlost produkce vajíček parazity, která je závislá mimo jiné na počtu parazitů. Tedy je-li část populace parazita v hostiteli eliminována, zbytek bude produkovat větší množství vajíček v přepočtu na jednu samici (Churcher et al. 2006).

Pro statistické zpracování je důležité, aby se ve vzorku od zvířete nacházelo před léčbou alespoň 70 vajíček, pro určení 95% spolehlivosti jako kritéria rezistence. Typické FECRT se dělá ze vzorků více zvířat, aby se dosáhlo dostatečného počtu vajíček (Dobson et al. 2011).

### **Migrační techniky**

Pro hlístice se také dají využít migrační techniky – larvy nematod migrují k vodě, a toho se využívá při jejich identifikaci. Takto se dají nalézt hlístice i ve vzorcích z pastvin.

### **EHA – egg hatch assay**

Používá se pro zjištění koncentrace anthelmintika, potřebné k inhibici vylíhnutí 50% vajíček (von Samson-Himmelstjerna et al. 2009). Test probíhá v řadě roztoků daného anthelmintika o rostoucí koncentraci. Používají se čerstvé vzorky stolice obsahující alespoň 100 epg (vajíček v 1 g trusu). Vajíčka se extrahují vhodnou metodou a upraví se na roztok o cca 100 vajíčkách na 1 ml. Jako rezistentní se bere  $EC_{50} > 0,1$ .

### **2.2.2.2 Identifikace genových sekvencí parazita**

Jinou potenciální metodou určení rezistence kmenu je přítomnost genotypu rezistence - například změny podoby genu pro  $\beta$ -tubulin – místo účinku benzimidazolových anthelmintik (Saunders et al. 2013). Jedná se převážně o pyrosekvenování, ale lze využít i další metody založené na PCR. Toto vyšetření dobře koreluje s FECRT u *H. contortus*, ale u jiných hlístic to není tak jednoznačné.

Barrère et al. (2013) hodnotili přínos genetického testování v praxi v porovnání s FECRT, a zjistili, že tato metoda umožňuje vyšetřovat rezistenci již před terapií anthelmintikem, je méně náročná, rychlejší a levnější, navíc ji lze provést z menšího množství materiálu. Zatím však dokáže vyšetřit pouze vlasovky a pouze na benzimidazolovou rezistenci, pro praxi je potřeba univerzálnější vyšetření. Podobné metody se vyvíjí i na parazity krav jako je *C. oncophora*, *O. ostertagi* (Demeler et al. 2013). V této oblasti má tento test větší potenciál, protože u krav rezistence na benzimidazoly zatím není tak rozvinutá, a toto vyšetření by ji mohlo pomoci dále zpomalit. U těchto parazitů není tak jasně patrná převaha SNP v pozici 200 a mohou dominovat i jiné, avšak stále se jedná o stejná umístění jako ta, která byla identifikována u *H. contortus*.

PCR lze použít také na rozlišení jednotlivých druhů gastrointestinálních parazitů. V takovém případě se vybírají výrazně exprimované geny, například mitochondriální, se sekvencemi specifickými pro jednotlivé parazity. U PCR analýz je v současnosti největší problém izolovat ze vzorku dostatečně čistý materiál, aby byl použitelný, nepřilíš náročnou metodou. Bott et al. (2009) se podařilo vyvinout real-time PCR rozlišující 7 hlavních druhů parazitických červů, výsledky dobře korelují s larval development assay, který je náročnější na čas i provedení (Gasser a von Samson-Himmelstjerna 2016).

### **2.2.2.3 Měření ztrát krve způsobených vlasovkami**

U tohoto vyšetření vždy existuje riziko, že krevní ztráta je způsobena něčím jiným, například poraněním nebo kokcidiózou. Proto je doporučeno jej kombinovat s vyšetřením na přítomnost helmintů pro potvrzení diagnózy.

**PVC** (Packed cell volume) je indikátor anémie získávaný přímo z krve zvířat. Používá se převážně ve výzkumu.

**Haemonchus Dipstick** je komerčně dostupné vyšetření na přítomnost krve v trusu zvířat.

**FAMACHA** je metoda umožňující přibližně diagnostikovat závažnost anémie podle barvy sliznice očních víček zvířat (Preston et al. 2014).



### **2.2.3 Nefarmakologická opatření**

Použití anthelmintik je nejpoužívanějším způsobem kontroly helmintóz. Ukazuje se však, že kvůli rychlosti vzniku rezistence na ně nemohou být dlouhodobě jediným prostředkem kontroly, pokud chceme zachovat udržitelné podmínky pro chov malých přežvýkavců.

Nefarmakologických postupů je několik, často se kombinují s anthelmintiky. Nejeftektivnější postupy se liší i podle klimatických podmínek.

#### **Tvorba refugií nevselektovaných populací nematod**

Ukazuje se výhodné nechávat malou část stáda bez terapie anthelmintiky, aby se zachovala nevselektovaná populace parazitů. Tento přístup je důležitý hlavně v klimatech, kde larvy nedokáží dlouhodobě přežít mimo hostitele kvůli okolním podmínkám (přílišná zima nebo sucho). Tato část populace ředí geny rezistence na anthelmintika, aby nebyly tak rychle selektovány.

Refugium je část populace parazita, která se vyhne kontaktu s anthelmintiky a dokáže se úspěšně rozmnožit (van Wyk 2001). Tohoto se dá v řadě případů dosáhnout terapií jen některých skupin zvířat, například laktujících nebo s klinickými známkami anémie. Procento neléčených hostitelů se však značně liší podle klimatu a parazita. Farmáři mohou mít problém akceptovat představu neléčení celého stáda, s rychlým nárůstem rezistencí je to však nutné. Výsledkem tohoto postupu je výrazně menší výskyt rezistence, avšak větší zátěž ovcí a pastvin parazity, je proto nutné dosáhnout správného kompromisu. Z této idey vychází strategie TST – target selective treatment.

#### **Starší postupy**

Dříve byla prosazována jiná metoda, nechat ovce po terapii anthelmintiky spásat nekontaminovanou pastvinu. Studie prokázaly, že používání „bezpečných“ pastev pro mladá zvířata může efektivně snížit počet nutných terapií anthelmintiky a tím zpomalit vznik rezistence. Problém s touto strategií je v tom, že pokud jsou ovcím podána anthelmintika a poté jsou umístěny na pastvu bez larev hlístic, může nastat rychlá selekce na rezistenci (van Wyk 2001).

## **TST – targeted selective treatments**

Tyto postupy jsou důležité hlavně pro zachování refugií tím, že se nebudou léčit zvířata, která to nepotřebují. Jako indikátory slouží váhové přírůstky, produkce mléka, vlny, anémie, FEC, body condition score. Existují dva hlavní přístupy:

### **1. FAMACHA**

Tato metoda je určena především pro *H. contortus*. Zjišťuje míru anémie zvířat podle zabarvení sliznice očních víček, umožňuje snížení počtu aplikací anthelmintik o 40-50% při zachování nutnosti léčit skutečně nemocná zvířata. Tento test je možné vyhodnocovat různě, podle stanovení, která zvířata již jsou hodnocena jako vhodná pro léčbu. I pokud mezi nimi bude více falešně pozitivních jedinců, celkový počet jedinců podstupující terapii bude stále výrazně nižší, než při plošné terapii celého stáda (Kaplan et al. 2004).

### **2. markery prospívání zvířat**

Metoda slouží pro hodnocení závažnosti infekce nehematofágními parazity. Podle poměrně komplexních výpočtů se určí, kolik by které jehně mělo přibrat, a když tohoto cíle nedosáhne, bude přeléčeno. Hmotnosti se kontrolují co 2 týdny. Jiné možné přístupy zahrnují vyhodnocování kvality produkované vlny či objem produkce mléka (Greer et al. 2009). Studie Besier et al. (2010) zjistila, že použitím skórovacího systému tělesné kondice ovcí je možné nechat až 50% ovcí bez terapie v případech, kdy by jinak byla použita terapie celého stáda, aniž by to výrazně snížilo produktivitu stáda (studie proběhla v podmínkách západní Austrálie).

### **Jiné nefarmakologické postupy**

Další možnosti podpory obranyschopnosti přežvýkavců vůči gastrointestinálním parazitům spočívají například v krmení sušenými rostlinami s antiparazitárním účinkem, případně s vysokým obsahem taninů. Jedná se převážně o bobovité rostliny, při jejich konzumaci se více proteinů dostane přes rumen do abomasa, což vede k rychlejšímu přibývání na váze, podpoře imunitního systému a lepší kvalitě vlny. Navíc se třísloviny váží na proteiny bohaté na prolin, jako je kutikula nematod, především ve vulvární oblasti u samic, efekt je doložen především na *H. contortus*. Tento přístup je problematický v tom, že různé rostliny působí na přežvýkavce různě a konečný efekt také závisí na množství bílkovin ve stravě. Třísloviny brání přílišné

degradaci proteinů, ale při nedostatku proteinů snižují jejich absorpci (Waghorn 2008a). Možností je i příkrmování oxidem měďnatým. Zajímavým způsobem kontroly jsou také houby, schopné ničit infekční larvy nematod v trusu a na pastvinách. Výhodná je i suplementace výživy zvířat (Burke et al. 2009). Vakcinace je také možností, avšak zatím příliš drahou. Další prokázanou metodou je rotační pastva, která snižuje FEC oproti pasení zvířat stále na stejném místě (Terril et al. 2012, Burke et al. 2009).

## 2.3 Anthelmintika

První anthelmintikum bylo objeveno ve 40. letech minulého století – již nepoužívaný fenothiazin (Swales 1939). V roce 1975 se objevil thiabendazol (Borgers et al. 1975), přibližně ve stejnou dobu levamisol (Coles et al. 1975), ivermektin roku 1989 (Turner a Schaeffer 1989). Nověji se používá monepantel ze třídy aminoacetonitrilových derivátů (Kaminsky et al. 2008). Nejnovějším anthelmintikem na trhu, používaným jen v některých státech jižní polokoule, je derquantel, který se používá v kombinaci s abamektinem (Little et al. 2011). Anthelmintika lze dělit z mnoha různých hledisek, jako je spektrum helmintů, na které jsou efektivní, nebo typ hostitelů, u nichž je dané anthelmintikum použitelné. Dále dle cílové struktury, na kterou dané molekuly působí, nebo chemické struktury těchto molekul.

### 2.3.1 Rozdělení anthelmintik podle chemické struktury

#### 2.3.1.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly zabraňují polymerizaci tubulinu a tím tvorbě mikrotubulů (Borgers et al. 1975). Mikrotubuly zajišťují motilitu, sekreční funkce, koordinaci a glukosový transport – parazité tedy umírají hlady. Benzimidazoly mají i ovicidní účinek – zábrana tvorby mikrotubulů zabrání vylíhnutí vajíček. Studie molekulárních modelů podle Robinson et al. (2004a) naznačuje, že vazba benzimidazolu destabilizuje molekuly tubulinu a vede k jejich depolymerizaci. Mezi benzimidazolová anthelmintika patří albendazol, flubendazol, febantel, mebendazol, fenbendazol, oxibendazol, thiabendazol a triklabendazol (Lamka a Ducháček 2006).

#### **Albendazol**

Albendazol je efektivní na nematoda, trematoda i cestoda (European Medicines Agency 2004). Ve veterinární medicíně se používá především u krav a ovcí na gastrointestinální a plicní oblé červy. Dále se používá na tasemnice a dospělé motolice jaterní (Veterinary Medicines Directorate 2011). U krav a ovcí se používá v dávkování 5-7,5 mg/kg, až 10 mg/kg na *Fasciola hepatica*. U lidí se používá v dávce 400 mg (European Medicines Agency 2004).

### **Rikobendazol**

Je širokospektrý, má podobné indikace jako albendazol, použití u ovcí a skotu. V České republice není registrován přípravek s rikobendazolem jako účinnou látkou. Dávkování je podobné albendazolu, 5-7,5 mg/kg, na motolice se používají vyšší dávky (Veterinary Medicines Directorate 2010).

### **Flubendazol**

Flubendazol je obvykle používán u monogastrických zvířat, jako jsou prasata, psi, kočky a kur domácí. Dávkování je závislé na živočišném druhu a délce terapie, například u prasat se používá v dávce 1 mg/kg po dobu 5 dnů nebo 2,5 mg/kg po dobu 2 dnů (Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv 2013). Na haemonchózy obvykle není používán, ale jeho efektivita na hlísticové infekce malých přežvýkavců byla prokázána (Bártíková et al. 2010, Lamka et al. 2000).

#### **2.3.1.2 Imidazothiazoly**

Imidazolothiazolové anthelmintikum levamisol působí jako cholinergní agonista, depolarizuje nervová ganglia hlístic a vede tak ke spastické paralýze parazitů (Coles et al. 1975). Ochromení parazité jsou ze zvířete vyloučeni zažívacím traktem spolu s trusem. Místem účinku je nAChR nematod, transmembránový iontový kanál složený z pěti podjednotek. Tento receptor je otevírán acetylcholinem a propouští ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  přes membránu. Receptor má více než 30 různých podjednotek (Laing et al. 2013), které se skládají do různých pentamerů. Ty vykazují rozdílnou aktivitu a citlivost k levamisolu, který tento kanál otevírá.

#### **2.3.1.3 Makrocyclické laktony**

Makrocyclické laktony zvyšují membránovou permeabilitu pro chloridové ionty (Turner a Schaeffer 1989). Hlavní používanou látkou této skupiny, jinak nazývané avermektiny, je ivermektin. Dalšími látkami z této skupiny jsou například abamektin, moxidektin.

Makrocyclické laktony způsobují zpomalení peristaltiky pharyngu, svalovou paralýzu a ochromení dělohy. Zasažení parazité se tedy nemohou dále krmit, hýbat ani vylučovat vajíčka. U vlasovek se nejcitlivějším na účinek makrocyclických laktonů jeví pharynx (Prichard 2001).

Místem účinku těchto molekul jsou glutamátém řízené chloridové kanály. Tyto GluCl kanály jsou nejvíce exprimovány u dospělců, což by vysvětlovalo vyšší citlivost dospělých vlasovek oproti larvám a vajíčkům. Makrocyclické laktony tyto kanály ireverzibilně aktivují, a tím inhibují aktivitu neuronů a kontraktilitu svalů, čímž způsobují paralýzu a smrt (Kotze et al. 2014). Dalším, prvním objeveným místem účinku těchto molekul jsou glycinem a kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) řízené chloridové kanály (Prichard 2001). GABA receptory však reagují na makrocyclické laktony až při vyšší koncentraci.

#### **2.3.1.4 Derquantel**

Novější sloučenina derquantel se váže na nikotinový acetylcholinový receptor, vede k rychlé svalové paralýze a smrti červa. Derquantel je semisyntetický spiroindol, používá se v kombinaci s abamektinem. Abamektin jakožto makrocyclický lakton potencuje antagonistický účinek derquantelu na nikotinové receptory příčně pruhované svaloviny a dále způsobuje hyperpolarizaci pharyngu pomocí aktivace GluCl receptorů (Puttachary et al. 2013). Tato kombinace má široké spektrum a vysokou účinnost. Současné použití má synergický efekt, protože se jedná o kompetitivního (derquantel) a nekompetitivního (abamektin) antagonistu (Little et al. 2011).

#### **2.3.1.5 Aminoacetonitrilové deriváty**

U monepantelu je místem účinku pravděpodobně pro hlístice specifická podjednotka acetylcholinových receptorů. Mělo by se jednat o podjednotku ACR-23, patřící do DEG-3 podrodiny nAChR, které se u savců nevyskytují (Kaminsky et al. 2008). Tato podjednotka není cílem ostatních anthelmintik působících na nikotinových receptorech, nevykazuje s nimi proto zkříženou rezistenci.

### **2.3.2 Důvody selhání anthelmintik**

S globálním oteplováním se klima na většině pastvin stává teplejší a vlhčí. Tím se pozměňují vzorce výskytu nematod v čase (van Dijk et al. 2010).

Starší strategie podávání anthelmintik se zaměřovala na naprostou eliminaci všech parazitů pomocí anthelmintik, což vedlo k vysokému evolučnímu tlaku a vzniku rezistence na anthelmintika. Tomuto se v současnosti pokoušíme zabránit tvorbou refugií pro citlivé parazity.

U většiny anthelmintik je mechanismus vzniku rezistence na ně neznámý. Nejvíce prozkoumaný a zřejmě jednodušší, než u ostatních, je mechanismus vzniku rezistence na benzimidazolová anthelmintika.

Vznik rezistence dále podporuje poddávkování a příliš časté terapie anthelmintiky, pro gastrointestinální nematoda v intervalu přibližně 3 týdnů (Jackson et al. 2012). Problém s dávkováním je především u koz, protože u těch jsou často anthelmintika používána off-label. U koz pravděpodobně vzniká rezistence na anthelmintika snadněji (například *T. circumcincta* rezistentní na ivermektin byla u koz nahlášena o 10 let dříve než u ovcí), kvůli jejich nižší schopnosti vytvořit si imunitu na gastrointestinální parazity. Proto je často nutná terapie anthelmintiky i u dospělců, což výrazně omezuje schopnost vytvářet refugia (Scott et al. 2013). Kozy mají také intenzivnější metabolismus, což vede k nižším dávkám anthelmintika v místě účinku (Jackson et al. 2012). Anthelmintika se jim tedy většinou podávají v 1,5-2 násobných dávkách podle typu anthelmintika.

### **2.3.3 Budoucnost anthelmintik**

Všechna dosavadní anthelmintika byla nalezena metodou náhodného screeningu. Zprvu na živých infikovaných hostitelích, posléze na modelových parazitech chovaných v kulturách. V poslední době se metodologie přesunuje k screeningu, založenému na mechanismech účinku na předem vytipovaných molekulárních cílech. I proto se snažíme podrobněji pochopit biologii a biochemii hlístic. Zatím však poslední jmenovaný přístup nevedl k úspěchu. Zavádění nových léčiv je záležitost velice drahá a náročná, a ve veterinární oblasti dlouhodobě podfinancovaná (Geary et al. 2015). Je nutná kombinace zodpovědné aplikace anthelmintik s nefarmakologickými opatřeními pro kontrolu infekcí.

Testují se další potenciálně efektivní přístupy pro kontrolu helmintóz, hlavně kontrola výživy s dostatečným přísunem bílkovin, antiparazitární vakcíny nebo například nematofágní houby (Burke et al. 2009).

Vědci se snaží pomoci farmářům s výběrem strategie anthelmintické terapie tak, aby rezistence nastoupila co nejpozději a zároveň to pro ně nebylo příliš náročné, aby byla taková terapie v praxi dodržována. Příkladem takové snahy je studie Dobson et al., 2011 zaměřená na australské podmínky. Jednoduchým způsobem, jak oddálit vznik rezistence, je používat kombinace anthelmintik s různými mechanismy účinku, to však

nemusí být efektivní, pokud se již na farmě vyskytla multirezistence. Dříve (v 80. letech minulého století) se doporučovala pravidelná rotace anthelmintik s různými mechanismy účinku. Tento postup v současnosti doporučen není, důvodem je to, že jakmile se jednou vyvine rezistence na určité anthelmintikum, populace hlístic si již tuto alelu přenáší s poměrně vysokou četností (Waghorn et al. 2008b).



## 2.4 Rezistence

Hlístice si dokáží vytvářet rezistenci na anthelmintika znepokojující rychlostí. Tento fakt je do značné míry dán tím, že parazitující červi vykazují i v rámci stejné populace značné genetické polymorfismy. Naopak populace z různých regionů se navzájem až tak drasticky neliší. To je vzhledem k minimální schopnosti samotného parazita cestovat na delší vzdálenosti přisuzováno především čilým přesunům hostitelských zvířat. Rychlost mutací je u vlasovky slezové přibližně 3x rychlejší, než u obratlovců. Toto spolu s praktickou neexistencí populací, na které není vyvíjen evoluční tlak působením anthelmintik, vede k velmi rychlému rozšiřování alel vedoucí k rezistenci (Blouin et al. 1995).

Současná světová situace je alarmující, například v USA je hlášena až 98% rezistence červů na benzimidazoly. Rezistence na levamisol a ivermektin je taktéž vysoká, o něco efektivnější zůstává moxidektin, ale na mnoha farmách jsou hlášeny kmeny rezistentní na všechna běžná anthelmintika (Kaplan a Vidyashankar 2012).

Masivní rozšíření rezistence na anthelmintika je důsledkem mnoha faktorů, mimo jiné plošným používáním anthelmintik jako relativně levného způsobu zvýšení produktivity chovu. Vysokou rezistenci na anthelmintika vykazují především *H. contortus* a *T. circumcincta*. Samovolná reverze rezistence je nepravděpodobná kvůli tomu, že jsou zvířata chována ve stádech. V extrémních případech je nutno chovy, ve kterých přetrvává vysoká multirezistence, zlikvidovat (Blake a Coles 2007).

První známkou vzniku rezistence na anthelmintika v chovu obvykle bývá, že jehňata nedokáží před zimou dosáhnout cílové hmotnosti ani přes preventivní používání anthelmintik (Sargison et al. 2007).

### Možnosti vzniku rezistence

- a) S introdukcí nových zvířat do chovu – je nutné dodržovat karantény a zvířata pustit dohromady až tehdy, když mají nová zvířata negativní FECRT.
- b) Genový drift při stálé expozici malým množstvím anthelmintik – selekce mutací, poskytujících evoluční výhodu, jejich úspěšnost závisí na síle evolučního tlaku a na tom, zda jsou alely dominantní nebo recesivní.
- c) Selektce preexistujícího rezistentního genotypu (Prichard et al. 1980).
- d) Efektivní likvidace refugií – evoluční tlak je vyvíjen na celou populaci parazita.

## 2.5 Metabolismus xenobiotik

### 2.5.1 Všeobecné rysy metabolismu xenobiotik

Všeobecný způsob detoxifikace tělu cizích látek je všem organismům společný. Skládá se obvykle ze tří na sebe navazujících fází.

V první fázi se v molekule odhalují nebo k ní přidávají reaktivní polární skupiny pomocí různých enzymů, především CYP (cytochromy P450), ale i dehydrogenas (MDR – medium-chain dehydrogenases, SDR – short-chain dehydrogenases, AKR – aldo-keto reductases), FMO (flavinmonooxidas), reduktas a řadou dalších. K méně častým enzymům účastnících se přeměn I. fáze metabolismu patří také peroxidasy, MAO (monoaminoxidasa) nebo XO (xanthinoxidasa) (Cvilink et al. 2009).

Ve druhé fázi jiné enzymy na tato odhalená polární místa molekuly přidávají polární zbytky jiných molekul, které výsledný produkt činí výrazně lépe rozpustným ve vodě. Konjugační enzymy vyžadují ke své funkci dodání energie ve formě makroergního kofaktoru. Mezi tyto konjugační enzymy patří glutathion-S-transferasy, UDP-glykosyltransferasy, sulfatasy, N-acetyltransferasy atd. Glutathion-S-transferasy (GST) mají zároveň schopnost neutralizovat volné radikály.

Třetí fáze zahrnuje export přeměněných xenobiotik ven z buněk. Nejdůležitější transportéry, které toto zajišťují, patří do rodiny ABC-transportérů (ATP-binding cassette). Některé z těchto transportérů jsou zodpovědné za multirezistenci, například skupiny ABCB (P-glykoprotein, MDR – multi drug resistant), ABCC (MRP – multidrug resistant related protein) a ABCG (včetně BCRP – breast cancer resistant protein) (Choe et al. 2012).

### 2.5.2 Metabolismus xenobiotik u vlasovek

#### 2.5.2.1 Enzymy I. fáze metabolismu

##### Oxidasy

Nějakou dobu se mělo za to, že hlístice úplně postrádají cytochromy P450. Pak byly identifikovány geny pro CYP v genomech těchto parazitů, poprvé u blízké příbuzné vlasovek, *C. elegans*. U vlasovek byla výraznější aktivita pozorována u larev než u dospělců, pravděpodobně díky tomu, že ve volném prostředí je larva vystavena většímu oxidačnímu stresu, než dospělec v žaludku. Cytochromy jsou většinou monooxygenasy, mohou však fungovat také jako oxotransferasy nebo reduktasy.

Oxidovat xenobiotika mohou dále peroxidasy, které byly u hlístic také identifikovány. Pro parazity je schopnost bránit se oxidantům velmi důležitá, protože při reakci imunitního systému na parazita vznikají reaktivní kyslíkové radikály. Mezi enzymy schopné vypořádat se s tímto nebezpečím patří SOD (superoxiddismutasa), katalasa, glutathionperoxidasa, XO (xanthinoxidasa), cytochrom c peroxidasa a peroxiredoxiny. U helmintů patří mezi důležité oxidační enzymy i FMO (flavinmonooxidasy) (Cvilink et al. 2009).

### **Reduktasy a hydrolasy**

Tyto enzymy byly u helmintů identifikovány historicky dříve. Redukci podléhají zejména aldehydické sloučeniny. Přestože jejich aktivita je dobře prozkoumána, o samotných enzymech toho moc známo zatím není (Cvilink et al. 2008a). Mezi další sloučeniny podléhající redukci u parazitických červů patří azosloučeniny, nitrosloučeniny a sulfoxidy.

Hydrolasy obstarávají rozklad esterů, amidů a cyklických sloučenin. Dále mohou rozkládat produkty druhé fáze metabolismu xenobiotik.

### **2.5.2.2 Enzymy II. fáze metabolismu**

Většina z nich není dosud detailně prozkoumána, jediná skupina, na kterou se výzkum více zaměřil, jsou glutathion-S-transferasy (Cvilink et al. 2009).

#### **GST**

Vzhledem k široké a často se překrývající substrátové specificitě se GST klasifikují podle analýzy sekvence aminokyselin, které je tvoří. U savců byly identifikovány skupiny alfa, mí, pí, sigma, theta, kappa, zeta a omega, a samostatná skupina MAPEG, která zahrnuje s membránou spojené GST. Zdá se, že ostatní organismy exprimují jim specifické skupiny GST.

Výzkum GST u *H. contortus* byl inspirací k zavedení nové skupiny GST do terminologie, takové, která je specifická pro helminty. Do této skupiny by se daly zařadit všechny tyto enzymy nalezené u *H. contortus* a 7 z těch, které byly nalezeny u *C. elegans*. GST nejsou jen biotransformační enzymy, hrají významnou roli také při ochraně před oxidačním stresem a odstraňují produkty peroxidace lipidů.

## **Další enzymy II. fáze**

Byla prokázána acetylační aktivita, u některých helmintů také důkazy aktivit glukosidačních a sulfatačních (Cvilink et al. 2009).

### **2.5.2.3 Transportéry**

Nejdůležitější pro export cizích látek z buněk jsou ABC transportéry (ATP-binding cassette). Tyto transportéry mají dvě transmembránové domény a 2 domény vážící nukleotidy. U *Schistosoma mansoni* byl identifikován i transportér mající jednu TMD (transmembrane domain) a jednu NBD (nucleotide-binding domain) doménu, který je podobnější prokaryotickým strukturám. U vlasovky slezové bylo identifikováno alespoň 7 různých ABC efluxních transportérů (Kerboeuf et al. 2003). Ke své funkci vyžadují energii ve formě ATP. Některé jsou substrátově specifické a transportují živiny a důležité látky do buněk za spotřeby ATP. Řada však zastává funkci exportní a je daleko méně specifická. Takové transportéry zajišťují eflux odpadních látek a xenobiotik z buněk (Higgins 2001).

Většina ABC transportérů je u helmintů lokalizována ve faryngu a střevech, což odpovídá jejich funkci při ochraně parazita před nebezpečnými látkami z vnějšího prostředí. Blokace ABC transportérů pomocí jejich inhibitorů, například verapamilem, dokáže částečně zvrátit rezistenci na benzimidazoly a makrocyclické laktony (Kerboeuf et al. 2003).

### **2.5.3 Role metabolismu ve vzniku rezistence u helmintů**

Rezistence na anthelmintika může být založena na podtextu farmakodynamickém nebo farmakokinetickém. Farmakodynamická rezistence znamená typicky změnu cílového místa, díky které daný lék ztratí efekt. Farmakokinetická rezistence může být způsobena horším průnikem anthelmintika do tkání parazita, jeho metabolizací na inaktivní látky nebo rychlejším vylučováním. Tímto se efekt léku sníží, ale zcela nevymizí. Tyto mechanismy se často kombinují (Cvilink et al. 2009).

Aktivita biotransformačních enzymů parazitických červů se může zvyšovat i díky přítomnosti polutantů prostředí, které působí jako enzymové induktory (Roh et al. 2007, Menzel et al. 2007).

## **2.5.4 Stav výzkumu metabolismu u helmintů se zaměřením na benzimidazoly**

Málokteré anthelmintikum má kompletně prozkoumaný metabolismus u červů, které má ničit. Většinou je metabolismus známý jen pro určitý druh červa a určitý typ enzymu. S pokračujícím výzkumem genomu helmintů bylo odhaleno mnoho genů pro enzymy metabolizující xenobiotika u různých druhů. Co do počtu těchto enzymů jsou nejlépe vybavena nematoda, u *H. contortus* se podle WormBase nachází například až 42 různých genů pro CYP, 34 pro UGT nebo 46 genů pro ABC transportéry (Matoušková et al. 2016). Byla prokázána řada metabolitů anthelmintik vznikající oxidací nebo redukcí původních látek, není však jasné, které specifické enzymy dané metabolity produkují. Nebyly zaznamenány metabolity vzniklé konjugací s glutathionem, přestože GST jsou u helmintů relativně lépe prozkoumané v porovnání s jinými enzymy (Matoušková et al. 2016). GST především chrání helminta před oxidačním poškozením a mohly by také vázat molekuly některých anthelmintik, jako jsou benzimidazoly nebo klosantel, které tak inhibují aktivitu GST (Harispe et al. 2010).

### **2.5.4.1 Albendazol**

U albendazolu je zdokumentována jeho přeměna na albendazol-sulfoxid u několika druhů parazitických červů. Albendazol-sulfoxid (rikobendazol) je však anthelminticky aktivní. Za méně aktivní metabolit je považován albendazol-sulfon, u vlasovek však sulfony benzimidazolových anthelmintik identifikovány nebyly (Cvilink et al. 2008b). Vlasovky albendazol metabolizují na albendazol-sulfoxid a tři různé glykosidy albendazolu (Vokřál et al. 2013).

#### **metabolizace hostitelem**

V těle hostitele je albendazol rychle a výrazně metabolizován na albendazol-sulfoxid, dále na albendazol-sulfon a albendazol-2-aminosulfon. Albendazol-sulfoxid je považován za aktivní metabolit zprostředkující největší podíl účinku (Dayan 2003). Samotný albendazol se metabolizuje tak rychle, že v plazmě není kvantifikovatelný. Albendazol však může do těla *H. contortus* pronikat i difúzí v rumen. Při intraruminální aplikaci se v gastrointestinálních nematodách prokazatelně hromadí jak albendazol-sulfoxid, tak samotný albendazol (Alvarez et al. 2000).

Biologickou dostupnost albendazolu lze u lidí zvýšit podáním s tučným jídlem, kvůli jeho špatné rozpustnosti ve vodě. U přežvýkavců naopak pomáhá nechat zvíře před podáním chvíli bez jídla, na účinnosti se to však příliš neprojeví (Lifschitz et al. 2017). Na parazitické červy vyskytující se jinde než v gastrointestinálním traktu působí především ABZ-SO, přenášený k parazitu krví. To by mohlo být důvodem faktu, že například na *F. hepatica* je nutné použít vyšší dávky ABZ než na gastrointestinální nematoda (Alvarez et al. 2000).

Albendazol-sulfoxid vzniká extenzivním first-pass metabolismem v játrech a pravděpodobně i ve střevní stěně hostitele. Metabolismus je zprostředkován cytochromy P450 a flavinovými oxidasami (Rawden et al. 2000).

Účinnou látku albendazol-sulfoxid lze do těla podat jako netobimin, prekurzor albendazolu, jako albendazol nebo přímo jako albendazol-sulfoxid (Dayan 2003).

Albendazol se podává kravám ve vyšších dávkách než ovcím, kvůli vyšší aktivitě jejich oxidačních enzymů (European Medicines Agency 2004).

#### **2.5.4.2 Flubendazol**

U vlasovky slezové byly prokázány 4 metabolity flubendazolu – redukovaný flubendazol, glukosový konjugát redukovaného flubendazolu a dva glukosové konjugáty flubendazolu. Tvorba těchto metabolitů je u rezistentních kmenů výrazně vyšší než u citlivých vlasovek (Vokřál et al. 2012). Předpokládá se, že redukovaný flubendazol je farmakologicky neaktivní, protože jemu velmi podobná molekula, redukovaný mebendazol, neaktivní je (Dayan 2003).

Redukce flubendazolu je NADPH-dependentní a stereospecifická, u hlístic vzniká především (-) enantiomer, zatímco například u prasat a bažantů je reakce rychlejší a vzniká přednostně (+) enantiomer (Nobilis et al. 2007).

Použití flubendazolu na haemonchózu drobných přežvýkavců je off-label, jeho metabolismus v těchto hostitelích tedy není detailně prozkoumán.

## **2.6 Metody stanovení metabolitů v biologickém materiálu**

Studium metabolismu naráží zpravidla na zásadní překážku v tom, že metabolity se v biologickém materiálu nachází obvykle ve velmi nízkých koncentracích. Na jejich identifikaci a případnou kvantifikaci jsou nutné velmi sofistikované metody. V současnosti je nejpoužívanější chromatografie a to často ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Stanovení metabolitů komplikuje jejich množství a také řada endogenních látek, které mohou interferovat s analýzou.

### **2.6.1 Kapalinová chromatografie**

#### **2.6.1.1 HPLC**

Vysokoúčinná, neboli také vysokotlaká kapalinová chromatografie je v současnosti jeden z nejpoužívanějších způsobů separace komplexních vzorků. Tato metoda je schopna nejen separace, ale také identifikace a kvantifikace složek analytu. Metoda je založena na použití dvou fází opačné polaritě, jedné kapalně, proháněné pod vysokým tlakem druhou, pevnou fází. Afinita k pevné fázi určuje retenční čas, kvalitativní charakteristiku dané látky (Malviya et al. 2010). HPLC se dá využít na potvrzení identity látek, stanovení jejich množství, stanovení nečistot či pro pročištění vzorku.

HPLC se skládá z injektoru, pumpy, mobilní fáze, stacionární fáze a detektoru. Vzorek se obvykle nastříkuje pomocí dávkovací smyčky, zpravidla automaticky (autosampler). Pokud je objem vzorku menší než objem smyčky, je nutné použít interní standard (Ardrey 2003).

#### **Základní parametry HPLC**

Základní kvalitativní veličinou v HPLC je retenční čas ( $t_R$ ), neboli doba od nástřiku vzorku po maximum chromatografického píku. Identifikace látky se provede porovnáním s  $t_R$  standardu, naměřeném na stejném přístroji za totožných podmínek (Meyer 2004). Jako kvantitativní charakteristika se používá plocha chromatografického píku, jako méně přesná charakteristika se dá použít i jeho výška (Robards et al. 2004).

Vnitřní průměr HPLC kolony ovlivňuje maximální množství vzorku a citlivost. Velikost částic ovlivňuje separační schopnost. Čím větší je povrch pevné fáze, tím lepší

separace je možné dosáhnout, avšak je nutné použít vyšší tlak mobilní fáze. Tlak mobilní fáze musí být poměrně vysoký a především konzistentní v průběhu měření.

Eluce může být isokratická, kdy se složení mobilní fáze nemění, nebo gradientová, kdy se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění podle předem určeného plánu. Gradientová eluce je zvláště výhodná tehdy, potřebujeme-li analyzovat nepolární parentní látku spolu s jejími polárními metabolity (Ardrey 2003).

Detektor je obvykle UV spektrometr, který může detekovat všechny organické sloučeniny. Nejčastěji je nastaven na měření při 254 nm. Ve speciálních případech lze použít i jiné detektory, poskytuje-li to výhodu vyšší citlivosti či specifity (Malviya et al. 2010). Výhodné je například použití fluorescenčního detektoru v případech, kdy je analyty možné takto detekovat (Ardrey 2003).

### **2.6.1.2 UHPLC**

Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) je novější variantou HPLC. Proti tradiční HPLC je rychlejší a citlivější. Využívá menších částic, obvykle 1,7  $\mu\text{m}$ , zatímco klasická HPLC většinou 3-5  $\mu\text{m}$ . Rychlejší průtok mobilní fáze takto malými částicemi nezhoršuje citlivost, je tedy možné celou analýzu zrychlit. Hlavním problémem této metody je obrovský zpětný tlak. Přístroje pro HPLC jsou stavěny na tlak do cca 40 MPa, UHPLC zvládne i více než 100 MPa. Kolony pro UHPLC jsou i užší, protože v široké koloně vzniká přílišné tření, které generuje teplo, přenášené do kapalné fáze, což může ovlivnit stanovení až rozložit některé molekuly (Nováková et al. 2006).

### **2.6.2 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika schopná určit chemické složení molekuly nebo vzorku podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) nabitě částice (Patel et al. 2012).

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí, ionizačního zdroje, analyzátoru a detektoru. Pomocí ionizačního zdroje se analyzované molekuly převedou na ionty, se kterými se lépe manipuluje. Ty jsou převedeny do analyzátoru, kde jsou rozděleny podle poměru své hmotnosti vůči náboji ( $m/z$ ). Tyto ionty jsou následně detekovány. Celý systém je obvykle pod plnou kontrolou počítače a uzavřen ve vakuu,



aby nedocházelo k interferencím kolizemi s molekulami ve vzduchu (Ashcroft et al. 1997).

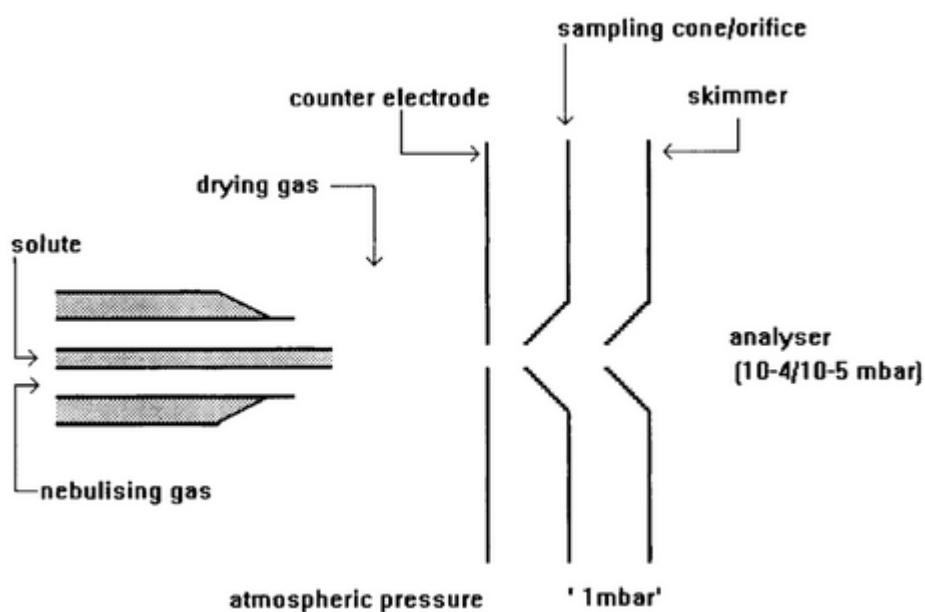
Výsledky jsou značně závislé na způsobu měření. Typ použitého iontového zdroje a to, zda je použit negativní nebo pozitivní mód je třeba brát v úvahu při analýze výsledků (Patel et al. 2012).

Vzorek se může analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie přímo pouze tehdy, je-li jednosložkový. Jindy se hmotnostní spektrometr zařazuje za chromatografickou nebo elektroforetickou metodu.

### 2.6.2.1 Ionizační zdroje

#### Elektrosprejová ionizace - ESI

Ionty se produkují při odpařování kapky z roztoku. Kapalína se vzorkem prochází tenkou kapilárou, jejíž konec je pod napětím 3-4 kV. To způsobí e젝ci malých, vysoce nabitých kapiček z kapiláry. Hnací plyn pomáhá usměrnit proud částic a vysušovací plyn (který může být stejný jako hnací, nejčastěji se jedná o dusík) odpařuje tekutinu z kapiček, takže zůstanou jen ionty (Ashcroft et al. 1997).



Obr. 3. Schematický náčrt elektrosprejového ionizačního zdroje.

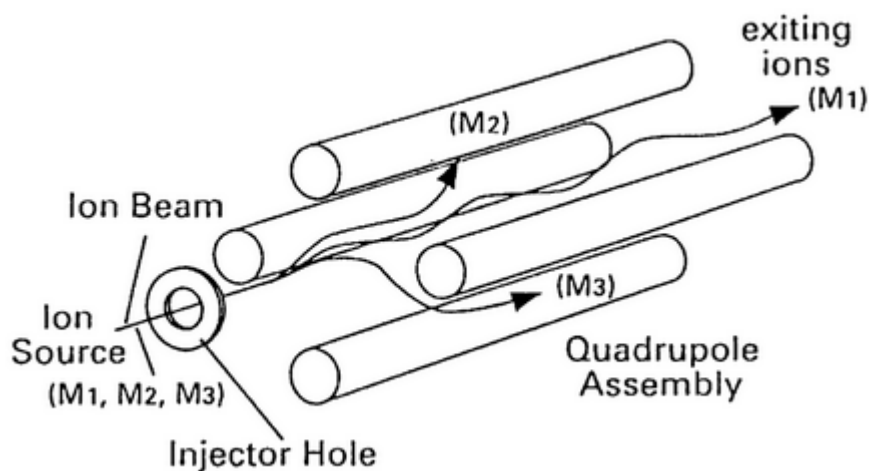
## Ostatní zdroje

Dalšími metodami jsou elektronová (EI) nebo chemická ionizace (CI), které se používají hlavně pro analýzu plynů. Ostatní metody používané na tekuté vzorky jsou MALDI (ionizace laserem za účasti matrice), desorpce polem (FD), ionizace urychlenými atomy (FAB), termosprej (TSP), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a další (Patel et al. 2012).

### 2.6.2.2 Analyzátoři – typy hmotnostních spektrometrů

#### Kvadrupólový hmotnostní spektrometr

Tento analyzátor je oblíbený pro svou univerzálnost, spolehlivost a robustnost. Kombinace s LC je výhodná, protože kvadrupóly jsou schopny rychlého skenování a nepoužívají příliš vysoká napětí, což je činí tolerantnější k vysokým tlakům z HPLC (Ardrey 2003).



Obr. 4. Kvadrupólový analyzátor, pouze ionty určité hmotnosti ( $M_1$ ) při určité frekvenci oscilují stabilně, ostatní ( $M_2$ ,  $M_3$ ) jsou rozptýleny na tyče kvadrupólu.

Ze zdroje iontů (obvykle vzniklých ESI) procházejí ionty o poměrně nízké energii směrem k detektoru mezi čtyřmi tyčemi uspořádanými do čtverce (viz Obr. 4). Protilehlé tyče jsou shodně nabitě, sousední opačně nabitě. Napětí na tyčích má dvě komponenty – stejnosměrnou a střídavou. Střídavé napětí rozkmitává ionty vstupující mezi tyče kvadrupólu. Ionty určité hmotnosti při určité frekvenci oscilují stabilně, všechny ostatní nestabilně a rozptýlí se na tyčích kvadrupólu. Aby se takto dalo naměřit hmotnostní spektrum, mění se hodnota střídavého i stejnosměrného napětí, přičemž poměr těchto hodnot zůstává stejný. Hmotnost detekovaného iontu je přímo úměrná

střídavému napětí, při kterém byl detekován. Čím vyšší je stejnosměrné napětí, tím vyšší je rozlišení, avšak na úkor citlivosti.

### **TOF hmotnostní spektrometr**

Analýza doby letu iontů je založena na vyslání iontů, kterým je udělena stejná kinetická energie, na trasu definované délky, přičemž se měří, za jak dlouho ji urazí. Jestliže mají všechny stejný náboj, jejich rychlost je závislá pouze na jejich hmotnosti. Rychlost iontu je nepřímo úměrná druhé odmocnině jeho  $m/z$ . Výhodná je kombinace s ionizačním zdrojem MALDI. Výhodou této metody je prakticky neomezená škála hmotností, které může měřit, je proto vhodná i pro makromolekuly (Ashcroft et al. 1997, Patel et al. 2012).

### **Iontová past**

Kvadrupólová iontová past funguje podobně jako kvadrupól s tím rozdílem, že ionty jsou zachycovány a postupně propouštěny dále (Patel et al. 2012).

### **2.6.2.3 Detektory**

Detektory identifikují náboj nebo proud produkovaný ionty, které prochází kolem nebo naráží na povrch detektoru. Často je nutné zesílení, protože počet iontů procházející hmotnostním spektrometrem je relativně malý.

### **2.6.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie**

Používá se na zjišťování struktury neznámých vzorků a pro detekci známých molekul ve složité matrix, když je potřeba velká specifita. Mezi oběma analyzátoři se obvykle nachází kolizní cela, což je v podstatě kvadrupól bez aplikace stejnosměrného napětí. V této cele se ionty sráží s molekulami inertního plynu, což vede k fragmentaci.

Jako zlatý standard se používá hmotnostní spektrometrie za použití trojitého kvadrupólu, která není příliš drahá nebo náročná na prostor. Široce používaná je i hmotnostní spektrometrie s pomocí iontové pasti, která umožňuje detailní fragmentační analýzu (Xie et al. 2012). Iontová past umožňuje tandemové měření, aniž by vyžadovala několik za sebou zapojených analyzátorů. Ve stejné iontové pasti nejprve proběhne selekce iontů, následně fragmentace a poté analýza produktových iontů.

Hybridní Q-TOF analyzátor je vhodný pro analýzu pomocí hmotnostních defektů, protože TOF analyzátor je schopný měřit s odchylkami menšími než 2 mDa, zatímco běžný kvadrupól většinou dosahuje dostatečné přesnosti jen v řádu Daltonů a tento typ analýzy proto nelze použít (Ardrey 2003).

#### **2.6.2.5 Možnosti interpretace hmotnostních spekter**

Interpretaci by vždy měl provádět zkušený odborník. Spektrum je často nutné pročistit odečtením šumu pozadí. Neexistují dostatečně bohaté knihovny spekter iontů vytvořených pomocí ESI. Je nutné vybrat správný hlavní pík a tuto hypotézu potvrdit podle přítomnosti charakteristických aduktů, např.  $[M+Na]^+$ . Různé chemické skupiny přítomné v molekule mají často pro ně typické fragmentační chování. Některé prvky, například Cl a Br lze relativně snadno identifikovat díky přítomnosti jejich izotopů (Ardrey 2003). S analýzou také pomůže identifikace neutrálních ztrát typických pro určité funkční skupiny nebo části molekul (Xie et al. 2012).

## 8. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je identifikovat metabolity flubendazolu, albendazolu a rikobendazolu u *Haemonchus contortus* a porovnat rozdíly v tvorbě metabolitů mezi samci a samicemi a mezi citlivým ISE a rezistentním IRE kmenem.

- Izolace jedinců *H. contortus* z abomasu ovcí.
- Inkubace *H. contortus* s testovanými léčivými.
- SPE extrakce metabolitů ze vzorků.
- Měření metabolitů testovaných anthelmintik pomocí LC/MS.
- Analýza a vyhodnocení výsledků.

## 4. Experimentální část

### 4.1 Biologický materiál, přístrojové vybavení, reagentie a chemikálie

#### 4.1.1 Biologický materiál

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) – použity byly 2 různé kmeny:

- ISE (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3) – kmen citlivý na anthelmintika, podkmen kmene SE, izolovaný z terénu ještě před zavedením benzimidazolových anthelmintik.
- IRE (Inbred Resistant Edinburgh, MHco5) – kmen odvozený od ISE kmene vytvořením evolučního tlaku benzimidazolovými anthelmintiky (Yilmaz et al. 2017).

Materiál byl získán z ovcí (*Ovis aries*), mladých beranů, infikovaných ve 3. - 4. měsíci 5000 larvami 3. stadia (L<sub>3</sub>) vlasovky slezové na každé zvíře. Larvy byly získány z Výzkumného institutu v Moredunu. Extrakci z abomasa provedl prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Postup zacházení s ovci byl schválen etickou komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, podle protokolu MŠMT-25908/2014-9. Veškeré experimenty proběhly v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů.

#### 4.1.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius (CP225D)

Automatické pipety Eppendorf Research Plus

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 D

Eppendorf Thermomixer comfort

Homogenizátor Netz K2

Mraznička Zanussi

Koncentrátor Eppendorf Concentrator Plus

Lednička Electrolux

LC-MS-8030 hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem, Shimadzu

pH metr Inolab

SPE kolonky Phenomenex Strata X (3 ml, 30 mg, 33 µm)

Spektrofotometr TECAN Infinite M200  
Systém na získávání ultračisté vody Milli-Q RG  
UHPLC Nexera, Shimadzu  
Ultrazvukový homogenizátor Bandelin Sonopuls HD 2070  
Vortex MS2 Minishaker IKA  
Zařízení pro SPE extrakci Supelco Visiprep  
Zorbax RRHD Eclipse Plus 95Å C18 kolona, 150x 2,1 mm, 1,8 µm, Agilent Technologies

### **4.1.3 Reagencie a chemikálie**

Acetonitril, LC/MS čistota, VWR Chemicals  
Albendazol, Sigma Aldrich  
Albendazol-sulfoxid (ABZ-SO, RCB), Sigma Aldrich  
Dihydrogenfosforečnan sodný, Penta  
Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich  
Flubendazol, Janssen Pharmaceutica  
Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma Aldrich  
Hydrogenfosforečnan sodný, Penta  
Kit pro stanovení obsahu bílkoviny, Sigma Aldrich  
Kyselina mravenčí, LC/MS čistota, Sigma Aldrich  
Mebendazol, Sigma Aldrich  
Methanol, LC/MS čistota, VWR Chemicals  
Penicilin, Sigma Aldrich  
Streptomycin, Sigma Aldrich  
Tekuté sterilní RPMI-1640 médium, Sigma Aldrich  
Ultračistá voda

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava pracovních roztoků

#### sodno-fosfátový pufr (0,1 M; pH 7,4)

Byly připraveny dva zásobní roztoky rozpuštěním 17,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  v 500 ml redestilované vody a rozpuštěním 3,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 250 ml redestilované vody. Následně byly tyto roztoky smíseny na požadované pH 7,4.

#### 10% acetonitril:

Acetonitril LC/MS kvality byl smísen s redestilovanou vodou v poměru 9:1.

### 4.2.2 Sběr biologického materiálu

Šest předem odčervěných jehňat o stáří 3-4 měsíce bylo perorálně infikováno  $L_3$  larvami vlasovky slezové. Každé zvíře dostalo perorálně suspenzi 5000 larev. Po sedmi týdnech po infikování byla zvířata usmrcena. Dospělí červi byli extrahováni z abomasa ovčí pomocí agarové metody vyvinuté van Wykem (van Wyk et al. 1978, 1980) prof. RNDr. Jiřím Lamkou, CSc.

Obsah abomasa lačné ovce byl propláchnut fyziologickým roztokem a přelit do skleněné nádoby. Nádoba se umístila do vodní lázně při 40°C, dokud pevné části nesedimentovaly. Supernatant byl přelit do jiné nádoby. Obsah původní nádoby byl dolit do 810 ml fyziologickým roztokem a k tomu se přidalo 270 ml 2,6% agarové suspenze. Výsledná koncentrace agaru byla 0,65%. Tato směs gellovala v plátech, které byly posléze ponořeny do fyziologického roztoku ve speciální nádobě - Obr. 5 (Valát 2014, van Wyk et al. 1978).





Obr. 5. Provedení agarové metody izolace nematod z *abomasa* (foceno prof. RNDr. Jiřím Lamkou CSc. na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové).

Pláty byly inkubovány přes noc v puftru a obdélníky byly následně vyňaty a opláchnuty od přichycených červů. Nematoda migrovala z agarového gelu do roztoku, ze kterého byla snáze izolována (van Wyk et al. 1980).

#### **4.2.3 Rozdělení červů a jejich inkubace**

Vlasovky byly nejprve třikrát propláchnuty fosfátovým pufrem o pH 7,4. Červi jednotlivých kmenů byli rozděleni na samice a samce podle morfologických znaků a rozpočítáni po deseti do médií s testovanými anthelmintiky tak, aby každý vzorek byl vyhotoven ve třech opakováních. Hlavními použitými rozlišovacími znaky bylo žíhané zbarvení samic, způsobené propletenými střevy s pohlavními orgány, dále vulva u samic a spikuly u samců. Vlasovky byly identifikovány pod mikroskopem. Na každý

vzorek bylo použito 5 ml RPMI-640 média o pH 7,4, s 60 µg/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (Cvilink et al. 2008b).

Takto připravené vzorky byly inkubovány 4 hodiny při 37°C.

Následně bylo ze vzorků odebráno 2,5 ml čistého média a místo něj bylo ke vzorku přidáno 2,5 ml stejného média obsahujícího 10µM flubendazolu, albendazolu nebo rikobendazolu. Testovaná anthelmintika byla předem rozpuštěna v DMSO. Konečná koncentrace DMSO v médiu byla 0,1%, aby se zamezilo jeho případným toxickým účinkům. Vzorky byly následně inkubovány 24 hodin při 37 °C (Kotzea McClure 2001). Po uplynutí 24 hodin bylo médium přemístěno do plastových zkumavek a červi třikrát promyti fosfátovým pufrům. Oba typy materiálu byly analyzovány odděleně.

Byly vytvořeny 2 typy slepých vzorků. V prvním typu slepých vzorků bylo inkubováno médium s anthelmintikem bez červů. Druhý typ slepých vzorků obsahoval médium bez anthelmintika s 0,1% DMSO a vlasovkami.

Zkoumaný materiál byl do dalšího zpracování uchováván při – 80°C.

#### **4.2.4 Zpracování červů a médií, SPE extrakce**

##### **Zpracování červů**

Ke každému vzorku červů byl přidán 1,1 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru o pH 7,4 a vzorek byl zhomogenizován, celkem 6x po 10 s na nízký výkon ultrazvukového homogenizátoru Sonopuls. Vzorek byl zcentrifugován (3 min, 5000 rpm), 10 µl bylo odebráno na stanovení koncentrace proteinu ve vzorku. Jako vnitřní standard byl použit mebendazol o koncentraci 50 µM, ředěný ze zásobního roztoku 1mM. Vnitřní standard byl přidán ke každému vzorku po jeho homogenizaci, před extrakcí na pevných fázích.

Následně byla provedena extrakce na pevné fázi (SPE). Pro extrakci byly použity kolonky Phenomenex Strata X (3 ml, 60 mg, 33 µm) podle Stuchlíková et al. (2013).

Konečný extrakt v acetonitrilu byl odpařen v koncentrátoru po dobu 45 minut při 45°C. Všechny vzorky byly skladovány při -20°C do dalšího zpracování.

## Zpracování médií

Média byla zpracována stejnou metodou SPE jako vlasovky, bez předchozích úprav homogenizací a centrifugací. Před provedením SPE byl přidán interní standard pro HPLC – mebendazol o koncentraci 50  $\mu$ M. Acetonitrilový extrakt byl odpařen stejnou metodou.

### 4.2.5 Rozpuštění odparků v mobilní fázi

Odparky byly následně rozpuštěny v acetonitrilu a vodě tak, aby jejich poměr odpovídal počátečnímu složení mobilní fáze v UHPLC koloně, tedy acetonitril a voda LC/MS čistoty o výsledném poměru 30:70 (acetonitril:voda) a celkovém objemu 100  $\mu$ l. Rozpuštění probíhalo v ultrazvukové vodní lázni po dobu 10 minut. Takto zpracovaný vzorek byl před nastříknutím na kolonu ještě přefiltrován přes jednorázový filtr a převeden do insertu.

### 4.2.6 Stanovení bílkovin

Stanovení bílkovin proběhlo pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA, bicinchoninic acid) podle protokolu firmy Sigma Aldrich. Přítomné bílkoviny redukují  $\text{Cu}^{2+}$  z roztoku  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na  $\text{Cu}^+$ , které vytváří při pH kolem 10 stabilní modrofialový komplex s BCA. Kalibrační křivka byla zhotovena ze standardního roztoku 1% BSA, ředěného redestilovanou vodou. Kalibrační křivka pro každou destičku byla zhotovena podle schématu:

Tab. 1 Koncentrace roztoků použitých k sestavení kalibrační křivky pro stanovení množství bílkoviny ve vzorcích.

	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	roztok 1% BSA ( $\mu\text{l}$ )	destilovaná voda ( $\mu\text{l}$ )
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

Z každého vzorku bylo pro toto stanovení odebráno 10  $\mu\text{l}$ . Toto množství bylo naředěno sodno-fosfátovým pufrům (0,1M, pH 7,4) 5x, aby byla měřená koncentrace

bílkovin ve spolehlivém rozmezí kalibrační křivky. Každé stanovení včetně kalibrační křivky bylo provedeno ve čtyřech opakováních.

K 10  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku s bílkovinou bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku C, který byl připraven smícháním pracovních roztoků A a B z kitu v poměru 50:1.

Složení pracovního roztoku A je  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , BCA v 0,1 M NaOH. Pracovní roztok B je 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Vzorky byly inkubovány 30 minut při teplotě 37°C v termomixéru. Následně byla změřena jejich absorbance při 562 nm na spektrometru TECAN. Stanovení bylo provedeno na 96 jamkových destičkách gamma.

#### 4.2.7 LC/MS analýza

Analýza proběhla na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Nexera (Shimadzu), s kolonou Zorbax RRHD Eclipse Plus 95 Å C18 o rozměrech 150x 2,1 mm, a velikosti částic 1,8  $\mu\text{m}$  od společnosti Agilent Technologies. Podmínky analýzy byly následující: teplota 40°C, rychlost průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min a objem nastříkovaného vzorku 1  $\mu\text{l}$ .

Byla použita gradientová eluce mobilní fáze, která se skládala z ultračisté vody (fáze A) a acetonitrilu LC/MS kvality (fáze B), oboje s příměsí 0,1% kyseliny mravenčí LC/MS čistoty. Gradient byl použit následující: 0 min – 15% fáze B, 8 min – 40% fáze B, 10 min – 95% fáze B, a byl následován 1 minutou isokratické eluce.

Použitým ionizačním zdrojem byla elektrosprejová ionizace (ESI). Nastavení parametrů pro analýzu bylo následující: napětí na kapiláře 4,5 kV, teplota termobloku 400 °C, teplota DL 250 °C, průtok dusíku 12 l/min. Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozmezí m/z 50-1000 v pozitivním módu, který vykazuje pro studované metabolity vyšší senzitivitu. Metabolity byly identifikovány na základě jejich protonovaných iontů  $[\text{M} + \text{H}]^+$  a rozboru jejich produktových iontů. Podrobnosti jsou uvedeny v příloze. Použita byla kolizní energie 25 eV, která byla pro tento typ metabolitů zjištěna jako optimální. Jako kolizní plyn sloužil argon. Chemické standardy očekávaných metabolitů nebyly použity, protože naprostá většina z nich není komerčně dostupná a jejich laboratorní příprava je velmi náročná, nebylo proto možné provést přesnou kvantitativní analýzu metabolitů. Jejich množství bylo stanoveno semikvantitativně pomocí poměru ploch píku daného metabolitu vůči ploše píku interního standardu – mebendazolu (MBZ). V případě vzorků s červy byly tyto poměry dále normalizovány na 1 mg celkového proteinu ve vzorku.

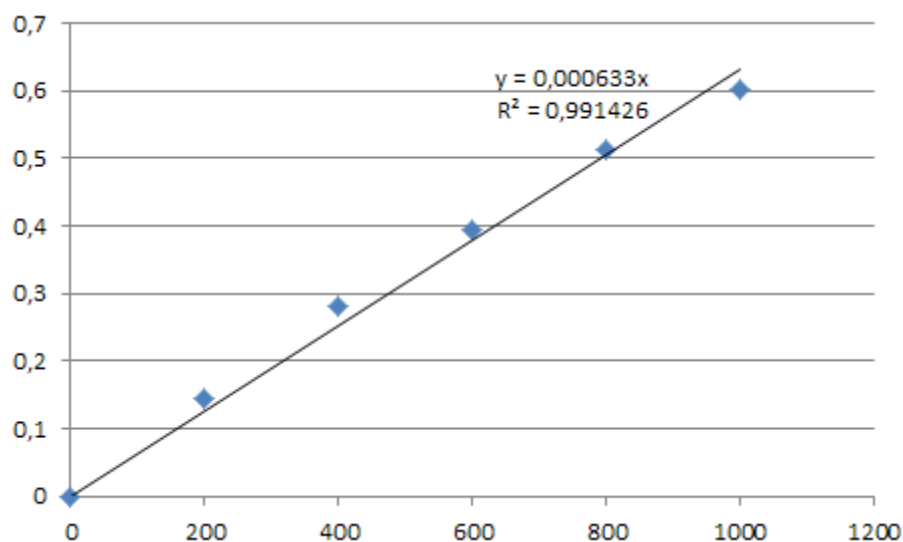
### **4.2.8 Statistická analýza**

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí Studentova t-testu (GraphPad Prism 7.0). Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou z 3-6 opakování. Rozdíly mezi výsledky byly považovány za signifikantní při  $P < 0,05$ .

## 5. Výsledky

Rozdíly v metabolické aktivitě vlasovek slezových podle kmenů a pohlaví byly stanovovány pro albendazol, albendazol-sulfoxid (rikobendazol) a flubendazol. Pro zpřesnění semikvantitativního stanovení metabolitů ve vzorcích červů byl stanoven obsah bílkoviny v každém vzorku. Dále byl porovnán poměr metabolizovaného léčiva vůči nemetabolizovaným parentním látkám ve vzorcích.

### 5.1 Stanovení bílkovin



Obr. 6. Příklad kalibrační křivky použité ke stanovení bílkoviny ve vzorcích.

Osa x – množství bílkoviny v kalibračních vzorcích. Osa y – naměřená absorbance při 562 nm, průměr ze čtyř stanovení pro každou hodnotu.

Tab. 2 Výsledky stanovení obsahu bílkoviny ve vzorcích [mg/ml] pro albendazol.

	<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylka</b>		<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylka</b>
ABZ IRE M 1	1,11584	0,115078	ABZ ISE M 1	0,482265	0,047562
ABZ IRE M 2	1,127947	0,134752	ABZ ISE M 2	0,710043	0,036319
ABZ IRE M 3	1,089572	0,040476	ABZ ISE M 3	0,36688	0,009645
ABZ IRE M 4	0,998565	0,139967	ABZ ISE F 1	1,058547	0,057013
ABZ IRE M 5	1,115073	0,109878	ABZ ISE F 2	0,988675	0,016403
ABZ IRE M 6	0,910852	0,108019	ABZ ISE F 3	1,051496	0,131507
ABZ IRE F 1	1,586377	0,58684			
ABZ IRE F 2	1,516426	0,154118			
ABZ IRE F 3	2,127811	0,32698			
ABZ IRE F 4	1,539839	0,390731			
ABZ IRE F 5	1,457473	0,034405			
ABZ IRE F 6	1,531594	0,156722			

Každá hodnota je průměrem ze 4-8 stanovení. ABZ = albendazol, IRE = rezistentní kmen, ISE = citlivý kmen, M = samci, F = samice

Tab. 3 Výsledky stanovení obsahu bílkoviny ve vzorcích [mg/ml] pro rikobendazol.

	<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylka</b>		<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylka</b>
RCB IRE M 1	1,092141	0,097171	RCB ISE M 1	0,377137	0,069803
RCB IRE M 2	1,087635	0,062755	RCB ISE M 2	0,581197	0,035194
RCB IRE M 3	1,209768	0,043832	RCB ISE M 3	0,689103	0,051457
RCB IRE M 4	1,29104	0,098694	RCB ISE F 1	0,938675	0,097393
RCB IRE M 5	1,159626	0,06611	RCB ISE F 2	1,025427	0,037272
RCB IRE M 6	1,287228	0,142555	RCB ISE F 3	0,929274	0,083245
RCB IRE F 1	1,287228	0,142555			
RCB IRE F 2	1,597317	0,229435			
RCB IRE F 3	1,353979	0,178613			
RCB IRE F 4	2,336255	0,066337			
RCB IRE F 5	1,65279	0,358019			
RCB IRE F 6	1,373825	0,09272			

Každá hodnota je průměrem ze 4-8 stanovení. RCB = rikobendazol, IRE = rezistentní kmen, ISE = citlivý kmen, M = samci, F = samice

Tab. 4 Výsledky stanovení obsahu bílkoviny ve vzorcích [mg/ml] pro flubendazol.

	<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylna</b>		<b>průměr</b>	<b>směrodatná odchylna</b>
FLU IRE M 1	0,780434	0,206834	FLU ISE M 1	0,760684	0,04214
FLU IRE M 2	0,938214	0,042502	FLU ISE M 2	0,766239	0,067827
FLU IRE M 3	1,111839	0,094359	FLU ISE M 3	0,534402	0,053508
FLU IRE M 4	1,125053	0,097232	FLU ISE F 1	0,997863	0,038832
FLU IRE M 5	1,214461	0,037518	FLU ISE F 2	0,85812	0,012761
FLU IRE M 6	1,153159	0,071343	FLU ISE F 3	0,810256	0,092853
FLU IRE F 1	1,203906	0,078405			
FLU IRE F 2	0,992211	0,093694			
FLU IRE F 3	1,830693	0,080201			
FLU IRE F 4	1,302701	0,435121			
FLU IRE F 5	1,036798	0,17898			

Každá hodnota je průměrem ze 4-8 stanovení. FLU = flubendazol, IRE = rezistentní kmen, ISE = citlivý kmen, M = samci, F = samice

## 5.2 Flubendazol

Protonovaný ion  $[M+H]^+$  parentní molekuly flubendazolu má  $m/z$  314, jeho retenční čas je 9,27 min a má typický produktový ion  $m/z$  282, který je produktem neutrální ztráty methanolu ( $\Delta m/z$  32). Byl zjištěn také fragmentační ion  $m/z$  123.

Bylo identifikováno 12 různých metabolitů flubendazolu, z toho šest doposud ve vlasovkách nenalezených (Vokřál et al. 2012). Vzorce odpovídajících iontů a fragmentů jsou uvedeny v doplňkové části práce.

### 5.2.1 Metabolity I. fáze

Redukovaný flubendazol (FLU-R,  $M_{8FLU}$ ), vzniklý redukcí karbonylu, je hlavním produktem metabolismu I. fáze. Jeho protonovaná molekula o  $m/z$  316 má hlavní produktový ion o  $m/z$  284, který stejně jako u parentní molekuly vzniká neutrální ztrátou methanolu. Redukovaný flubendazol byl nalezen ve všech testovaných vzorcích, avšak v rozdílném množství (Obr. 8). Samice tento metabolit produkují ve výrazně větší míře než samci, a rezistentní kmen více, než kmen citlivý.

Redukce karbonylu byla nejčastější reakcí I. fáze metabolismu, jejími produkty jsou metabolity  $M_{2FLU}$ ,  $M_{3FLU}$ ,  $M_{4FLU}$ , dále  $M_{6FLU}$ ,  $M_{7FLU}$ , zmíněný  $M_{8FLU}$  a  $M_{10FLU}$  (Tab. 5). Byly nalezeny i jiné produkty I. fáze metabolismu, vzniklé hydroxylací nebo



hydrolyzou karbamátu. Samotnou hydrolyzou v I. fázi vznikají metabolity M1<sub>FLU</sub> a M5<sub>FLU</sub>, metabolit M11<sub>FLU</sub> je produktem hydrolyzy a hydroxylace.

### 5.2.2 Metabolity II. fáze

Mezi metabolity flubendazolu byly identifikovány produkty N-glykosidace, O-glykosidace, methylace a O-acetylce. Byly nalezeny 2 N-glykosidy parentní molekuly flubendazolu (M9<sub>FLU</sub>, M12<sub>FLU</sub>), 2 N-glykosidy redukovaného flubendazolu FLU-R (M2<sub>FLU</sub>, M7<sub>FLU</sub>) a 2 N-glykosidy hydrolyzovaného flubendazolu (M1<sub>FLU</sub>, M5<sub>FLU</sub>). Dále byly identifikovány 3 O-glykosidy redukovaného flubendazolu (M3<sub>FLU</sub>, M4<sub>FLU</sub>, M6<sub>FLU</sub>). Při tandemové hmotnostní spektrometrii všech O-glykosidů byl nalezen charakteristický fragment neutrální ztráty hexosy  $\Delta m/z$  162 a vody  $\Delta m/z$  18. Stejná analýza N-glykosidů odhalila charakteristický fragment  $\Delta m/z$  162, vzniklý neutrální ztrátou hexosy. Tyto fragmenty potvrzují jejich strukturu. Metabolit M10<sub>FLU</sub> vznikl methylací redukovaného flubendazolu. Tato molekula také vykazuje typickou neutrální ztrátu methanolu ( $\Delta m/z$  32). Překvapením se ukázal metabolit M11<sub>FLU</sub>, který je O-acetylglukosidem hydrolyzovaného a hydroxylovaného flubendazolu. Při tandemové hmotnostní spektrometrii tato molekula vykazovala neutrální ztrátu  $\Delta m/z$  220, která odpovídá O-acetylglukosidu. Identifikace tohoto metabolitu prokázala schopnost vlasovek acetylovat xenobiotika.

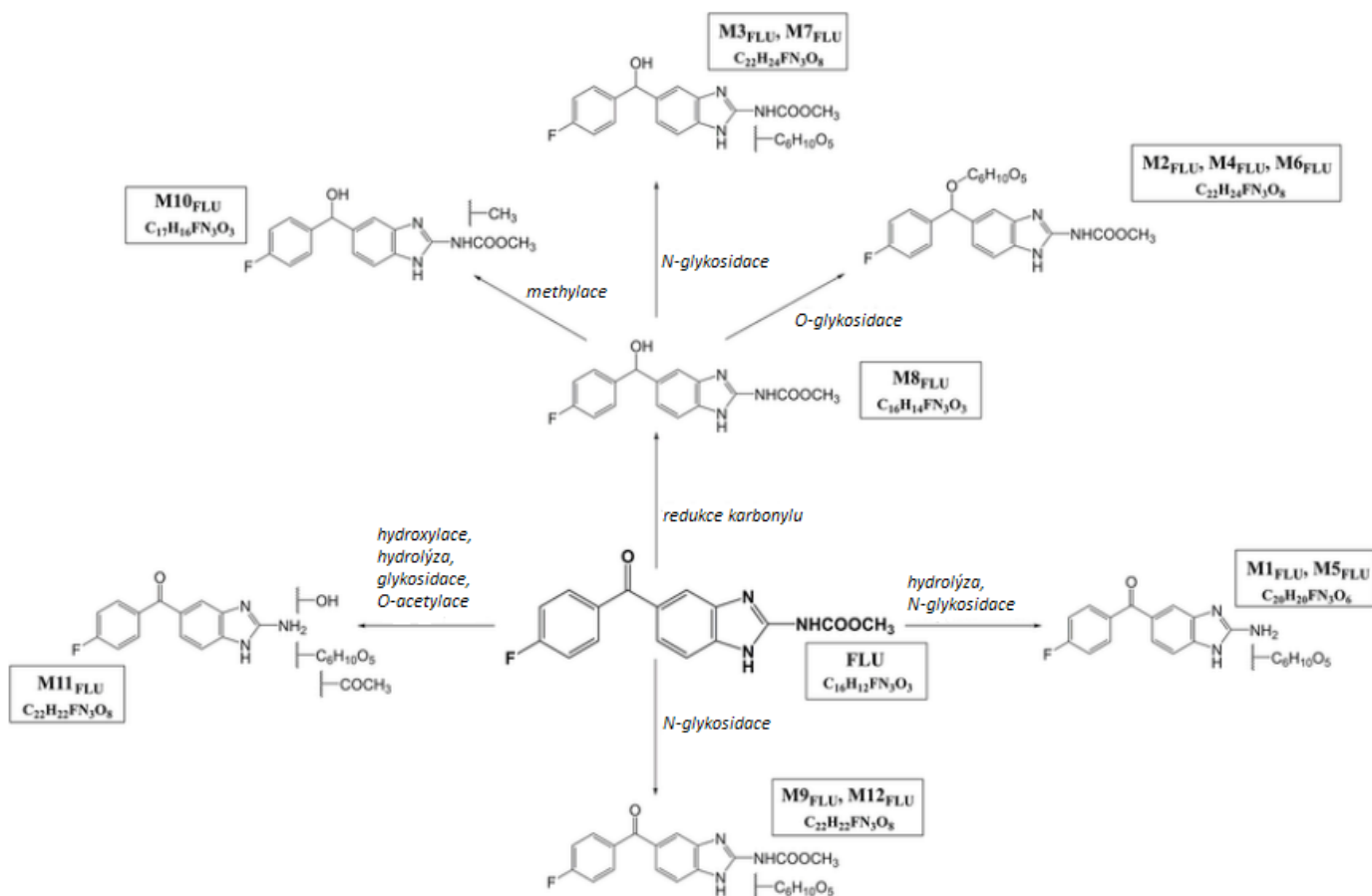
Hlavním metabolitem II. fáze biotransformace flubendazolu byl jeden z O-glykosidů flubendazolu, M4<sub>FLU</sub>. Ten byl detekován ve všech vzorcích, opět výrazně více ve vzorcích se samicemi. Samice rezistentního kmene tento metabolit produkovaly ve větším množství než samice citlivého ISE kmene (Obr. 8b).

Tab. 5 Seznam hlavních metabolitů flubendazolu s jejich retenčními časy, teoretickými hodnotami  $[M+H]^+$ , sumárními vzorci, produktovými ionty a popisem proběhlých metabolických reakcí.

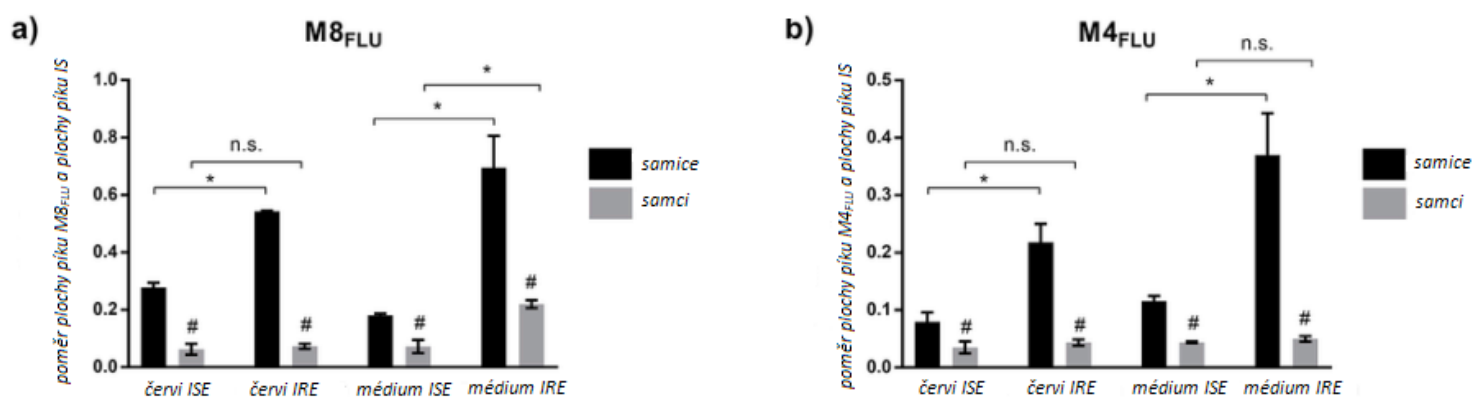
$t_r$ [min]	označení metabolitu	teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů	sumární vzorec	způsob vzniku metabolitu		m/z produktových iontů $[M+H]^+$
				I. fáze	II. fáze	
3,22	M1 <sub>FLU</sub>	418,14	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	hydrolyza	N-glykosidace	256, 123
3,31	M2 <sub>FLU</sub>	478,16	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	redukce karbonylu	N-glykosidace	316, 284
3,42	M3 <sub>FLU</sub>	478,16	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	redukce karbonylu	O-glykosidace	298, 266
3,58	M4 <sub>FLU</sub>	478,16	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	redukce karbonylu	O- glykosidace	298, 266
3,7	M5 <sub>FLU</sub>	418,14	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	hydrolyza	N- glykosidace	256
3,82	M6 <sub>FLU</sub>	478,16	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	redukce karbonylu	O- glykosidace	298, 266
4,04	M7 <sub>FLU</sub>	478,16	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	redukce karbonylu	N- glykosidace	316, 284
4,8	M8 <sub>FLU</sub>	316,1	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	redukce karbonylu	-	284, 238
5,33	M9 <sub>FLU</sub>	476,14	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-	N- glykosidace	314, 282, 123
5,44	M10 <sub>FLU</sub>	330,12	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	redukce karbonylu	methylace	298, 174
5,52	M11 <sub>FLU</sub>	476,14	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	hydrolyza, hydroxylace	glykosidace, O- acetylace	256
5,62	M12 <sub>FLU</sub>	476,14	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	-	N- glykosidace	314, 282, 123
8,27	FLU (parentní látka)	314,09	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-	-	282, 123

Tab. 6 Přítomnost (+) nebo nepřítomnost (-) metabolitů flubendazolu v homogenátech vlasovek a inkubačních médiích podle pohlaví a příslušnosti ke kmeni ISE nebo IRE.

označení metabolitu	homogenát <i>H. contortus</i>				médiium			
	ISE		IRE		ISE		IRE	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci	samice	samci
M1 <sub>FLU</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-
M2 <sub>FLU</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-
M3 <sub>FLU</sub>	-	-	+	-	-	-	+	+
M4 <sub>FLU</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M5 <sub>FLU</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+
M6 <sub>FLU</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-
M7 <sub>FLU</sub>	-	-	+	-	+	-	+	-
M8 <sub>FLU</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M9 <sub>FLU</sub>	-	-	+	-	-	-	+	-
M10 <sub>FLU</sub>	-	-	+	-	-	-	+	+
M11 <sub>FLU</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M12 <sub>FLU</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU (parentní látka)	+	+	+	+	+	+	+	+



Obr. 7. Schéma metabolismu flubendazolu u dospělčů *H. contortus*.



Obr. 8. Semikvantitativní stanovení flubendazolu – Rozdílné relativní množství hlavních metabolitů I. a II. fáze metabolismu flubendazolu u červů a médií jednotlivých pohlaví a kmenů. Každá naměřená hodnota představuje průměr ze tří stanovení. IS = interní standard.

n.s. – rozdíl nebyl statisticky signifikantní, \* - naměřený rozdíl je statisticky signifikantní.

## 5.3 Albendazol

Molekula albendazolu (ABZ) měla při uvedených podmínkách stanovení retenční čas 7,5 minuty a v pozitivním módu poskytovala ion  $[M+H]^+$  o  $m/z$  266. Tandemová hmotnostní spektrometrie vedla především k produktovému iontu  $m/z$  234.

Bylo identifikováno 9 metabolitů albendazolu, z toho čtyři doposud jinde nepublikované (Vokřál et al. 2013).

### 5.3.1 Metabolity I. fáze

Identifikovány byly převážně produkty S-oxidace. Albendazol-sulfoxid (ABZ-SO,  $M3_{ABZ}$ ) při  $m/z$  282  $[M+H]^+$  byl v největším množství nalezen ve vzorcích samic IRE kmene (množství však bylo vyšší v médiu samců než samic). Tento metabolit se druhou S-oxidací přeměňuje na albendazol-sulfon (ABZ-SO<sub>2</sub>,  $M6_{ABZ}$ ),  $m/z$  298  $[M+H]^+$ . Tandemová hmotnostní spektra dávala typickou neutrální ztrátu methanolu a dále  $\Delta m/z$  42 odpovídající propenu. S-oxidací vznikly také metabolity  $M1_{ABZ}$  a  $M2_{ABZ}$ . Kromě S-oxidace byly identifikovány i produkty hydrolyzy karbamátového postranního řetězce ( $M4_{ABZ}$  a  $M5_{ABZ}$ ).

### 5.3.2 Metabolity II. fáze

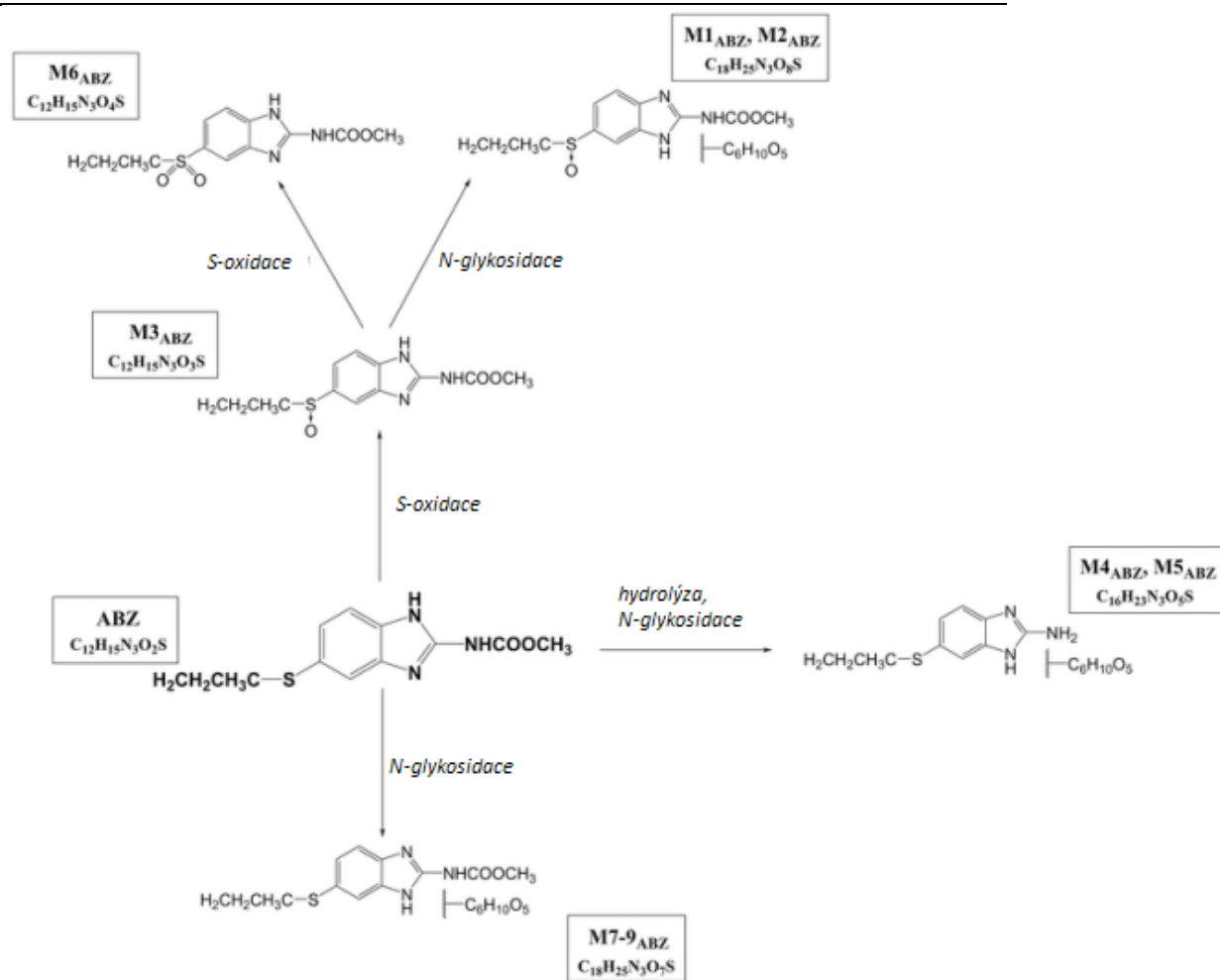
Jedinou reakcí, která byla u metabolitů albendazolu zaznamenána, byla N-glykosidace. Byly identifikovány tři různé N-glykosidy albendazolu ( $M7_{ABZ}$ - $M9_{ABZ}$ ), dva N-glykosidy albendazol-sulfoxidu ( $M1_{ABZ}$ ,  $M2_{ABZ}$ ) a dva N-glykosidy hydrolyzovaného albendazolu ( $M4_{ABZ}$ ,  $M5_{ABZ}$ ). Při MS/MS byla u všech těchto metabolitů identifikována neutrální ztráta hexosy  $\Delta m/z$  162. Hlavním metabolitem II. fáze je N-glykosid ABZ  $M8_{ABZ}$ , který byl nalezen ve všech vzorcích. Tento glykosid byl výrazně více produkován IRE kmenem než ISE kmenem, ale pouze v případě samic. V případě ISE kmene bylo tohoto metabolitu překvapivě nalezeno více u samců než u samic.

Tab. 7 Seznam hlavních metabolitů albendazolu s jejich retenčními časy, teoretickými hodnotami  $[M+H]^+$ , sumárními vzorci, produktovými ionty a popisem proběhlých metabolických reakcí.

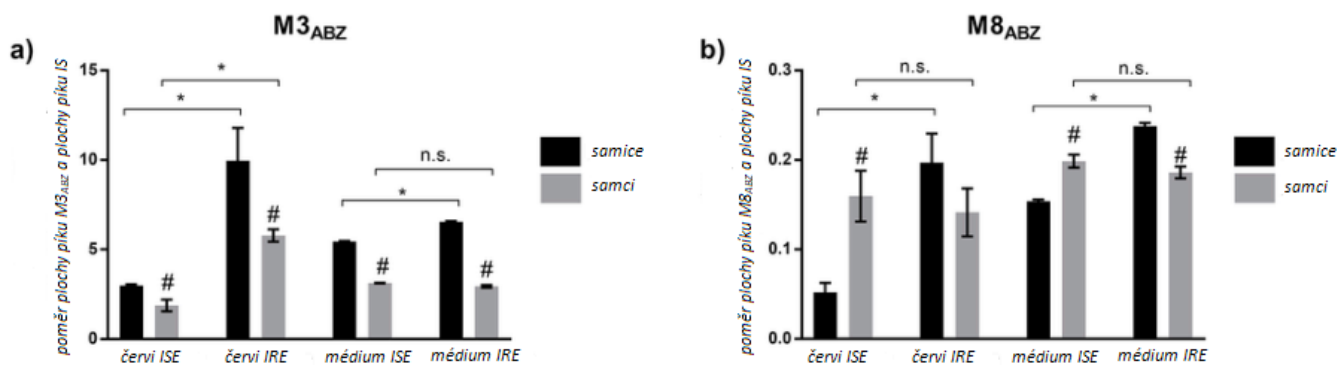
$t_r$ [min]	označení metabo- litu	teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů	sumární vzorec	způsob vzniku metabolitu		m/z produktových iontů $[M+H]^+$
				I. fáze	II. fáze	
1,83	M1 <sub>ABZ</sub>	444,14	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	S-oxidace	N-glykosidace	282, 240, 208, 191, 159
2,33	M2 <sub>ABZ</sub>	444,14	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	S-oxidace	N-glykosidace	282, 240, 208
3,32	M3 <sub>ABZ</sub>	282,09	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	S-oxidace	-	240, 208, 191, 159, 208
3,56	M4 <sub>ABZ</sub>	370,14	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	hydrolýza	N-glykosidace	208
4,53	M5 <sub>ABZ</sub>	370,14	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	hydrolýza	N-glykosidace	208
5,22	M6 <sub>ABZ</sub>	298,09	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	2x S- oxidace	-	266, 224, 159
5,65	M7 <sub>ABZ</sub>	428,15	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	-	N-glykosidace	266, 234, 191
6,16	M8 <sub>ABZ</sub>	428,15	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	-	N-glykosidace	266, 234
6,71	M9 <sub>ABZ</sub>	428,15	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	-	N-glykosidace	266, 234
7,50	ABZ (parentní látka)	266,1	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	-	-	234

Tab. 8 Přítomnost (+) nebo nepřítomnost (-) metabolitů albendazolu v homogenátech vlasovek a inkubačních médií podle pohlaví a příslušnosti ke kmeni ISE nebo IRE.

označení metabolitu	homogenát <i>H. contortus</i>				médium			
	ISE		IRE		ISE		IRE	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci	samice	samci
M1 <sub>ABZ</sub>	-	-	+	+	-	-	-	-
M2 <sub>ABZ</sub>	-	-	+	+	-	+	+	+
M3 <sub>ABZ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M4 <sub>ABZ</sub>	-	-	-	-	+	+	+	+
M5 <sub>ABZ</sub>	-	-	+	-	-	-	+	-
M6 <sub>ABZ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M7 <sub>ABZ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M8 <sub>ABZ</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M9 <sub>ABZ</sub>	+	+	+	+	-	-	-	-
ABZ (parentní látka)	+	+	+	+	+	+	+	+



Obr. 9. Schéma metabolismu albendazolu u dospělců *H. contortus*.



Obr. 10. Semikvantitativní stanovení hlavních metabolitů albendazolu. Rozdílné relativní množství hlavních metabolitů I. a II. fáze metabolismu albendazolu u červů a médií jednotlivých pohlaví a kmenů. Každá naměřená hodnota představuje průměr ze tří stanovení. IS = interní standard.

n.s. – rozdíl nebyl statisticky signifikantní, \* - naměřený rozdíl je statisticky signifikantní.

## 5.4 Rikobendazol (Albendazol-sulfoxid)

Rikobendazol (RCB) neboli albendazol-sulfoxid je aktivní metabolit albendazolu, na který se albendazol v tělech hostitelských zvířat přeměňuje tak intenzivně, že samotný albendazol není v plazmě detekovatelný. Jeho retenční čas za námi použitých podmínek byl 3,32 min, jeho protonovaný ion  $[M+H]^+$  má  $m/z$  282. Bylo identifikováno sedm různých metabolitů RCB. V I. fázi biotransformace se RCB přeměňuje S-oxidací (M4<sub>RCB</sub>) nebo S-redukcí (M7<sub>RCB</sub>), ve druhé fázi N-glykosidací. Byly identifikovány 2 N-glykosidy rikobendazolu (M1<sub>RCB</sub>, M2<sub>RCB</sub>), jeden N-glykosid albendazol-sulfonu (M3<sub>RCB</sub>) a 2 N-glykosidy albendazolu (M5<sub>RCB</sub>, M6<sub>RCB</sub>). U všech N-glykosidů byla pozorována neutrální ztráta hexosy. Větší množství hlavních metabolitů M5<sub>RCB</sub> a M7<sub>RCB</sub> bylo nalezeno u samic než u samců a více u rezistentního IRE než u citlivého ISE kmene.

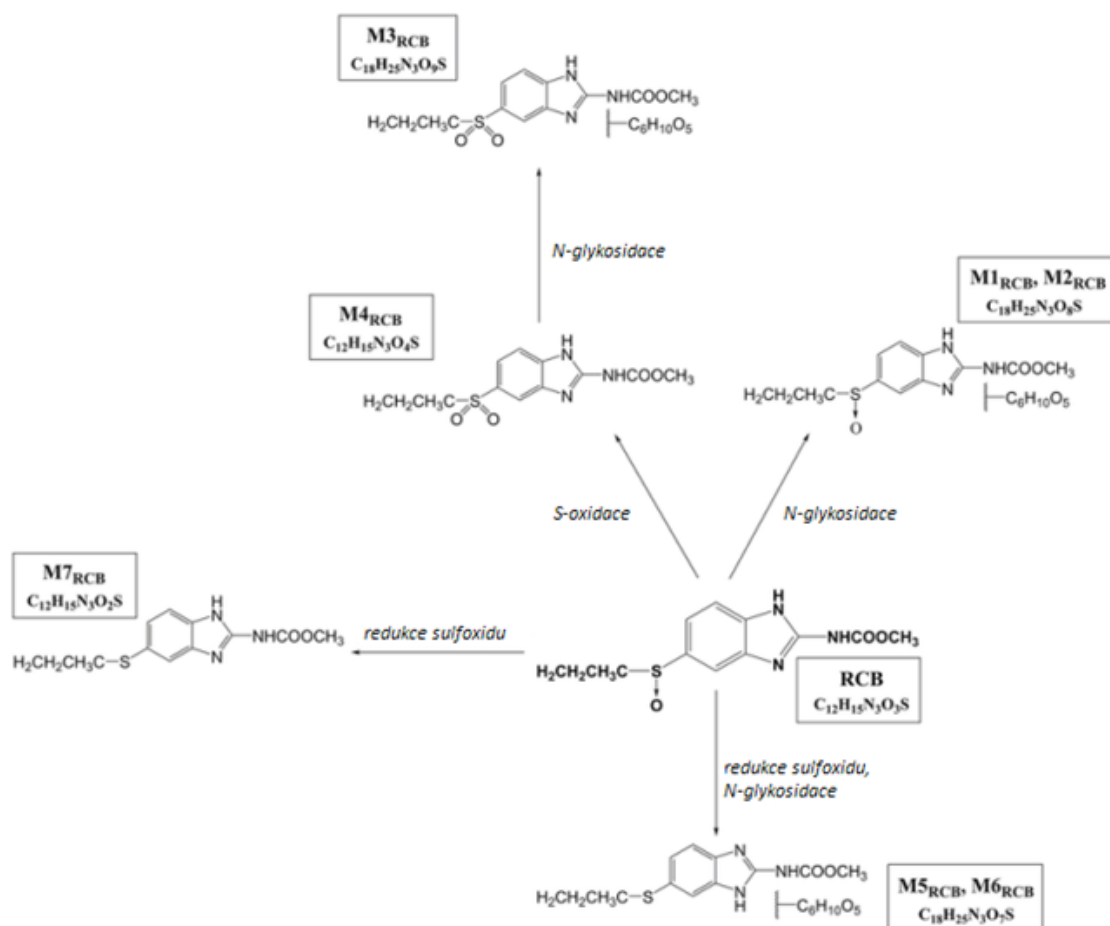


Tab. 9 Seznam hlavních metabolitů rikobendazolu s jejich retenčními časy, teoretickými hodnotami  $[M+H]^+$ , sumárními vzorci, produktovými ionty a popisem proběhlých metabolických reakcí.

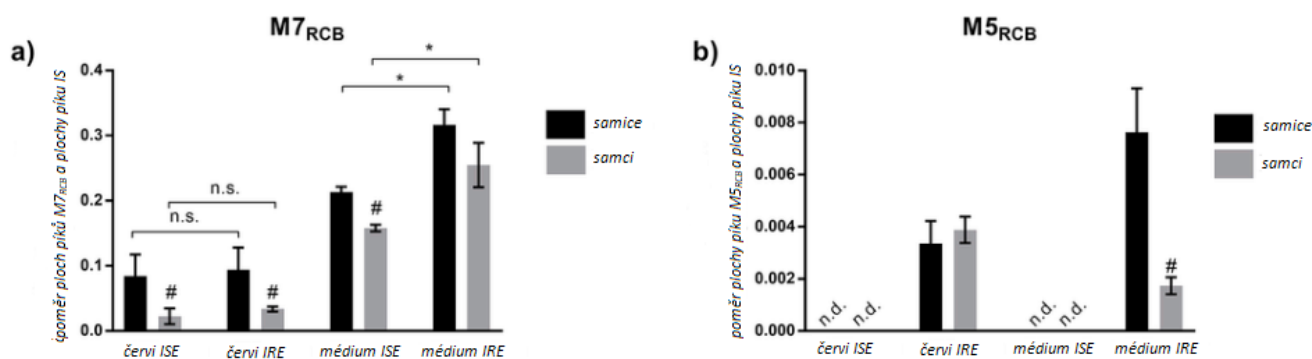
$t_r$ [min]	označení metabolitu	teoretické m/z hodnoty $[M+H]^+$ iontů	sumární vzorec	způsob vzniku metabolitu		m/z produktových iontů $[M+H]^+$
				I. fáze	II. fáze	
1,83	M1 <sub>RCB</sub>	444,1435	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	-	N-glykosidace	282, 240, 208, 191, 159
2,33	M2 <sub>RCB</sub>	444,1435	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	-	N-glykosidace	282, 240, 208
2,88	M3 <sub>RCB</sub>	460,1384	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	S-oxidace	N-glykosidace	240, 208, 191, 159, 208
5,22	M4 <sub>RCB</sub>	298,0856	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	S-oxidace	-	208
5,65	M5 <sub>RCB</sub>	428,1486	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	redukce sulfoxidu (-O)	N-glykosidace	208
6,16	M6 <sub>RCB</sub>	428,1486	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	redukce sulfoxidu (-O)	N-glykosidace	266, 224, 159
7,5	M7 <sub>RCB</sub>	266,1	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	redukce sulfoxidu (-O)	-	266, 234, 191
3,32	RCB (parentní látka)	282,09	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	-	N-glykosidace	266, 234

Tab. 10 Přítomnost (+) nebo nepřítomnost (-) metabolitů rikobendazolu v homogenátech vlasovek a inkubačních médií podle pohlaví a příslušnosti ke kmeni ISE nebo IRE.

označení metabolitu	homogenát <i>H. contortus</i>				médiu			
	ISE		IRE		ISE		IRE	
	samice	samci	samice	samci	samice	samci	samice	samci
M1 <sub>RCB</sub>	-	-	+	+	-	-	-	-
M2 <sub>RCB</sub>	-	-	+	+	-	-	+	-
M3 <sub>RCB</sub>	-	-	-	-	-	-	+	-
M4 <sub>RCB</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
M5 <sub>RCB</sub>	-	-	+	+	-	-	+	+
M6 <sub>RCB</sub>	-	-	+	+	-	-	-	-
M7 <sub>RCB</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+
RCB (parentní látka)	+	+	+	+	+	+	+	+



Obr. 11. Schéma metabolismu rikobendazolu u dospělčů *H. contortus*.



Obr. 12. Semikvantitativní stanovení hlavních metabolitů rikobendazolu. Rozdílné relativní množství hlavních metabolitů I. a II. fáze metabolismu rikobendazolu u červů a médií jednotlivých pohlaví a kmenů. Každá naměřená hodnota představuje průměr ze tří stanovení. IS = interní standard.

n.s. – naměřený rozdíl není statisticky signifikantní, \* - naměřený rozdíl je statisticky signifikantní, n. d. – metabolit nebyl detekován.

## 6. Diskuze

Rezistence gastrointestinálních parazitických červů na anthelmintika je významným celosvětovým problémem, ohrožujícím v budoucnu celou existenci chovů malých přežvýkavců. Mechanismy této rezistence nejsou vždy detailně prozkoumány. Nejvíce je známo o mechanismu rezistence na benzimidazolové preparáty, u nichž jsou jako hlavní mechanismus rezistence identifikovány změny v jednotlivých aminokyselinách jejich cílové molekuly,  $\beta$ -tubulinu (Prichard 2001, Ghisi et al. 2007, von Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Barrère et al. 2013). Změny aminokyselin v kodonech 167, 198, nebo nejčastěji 200, způsobují změnu konformace  $\beta$ -tubulinu tak, že benzimidazol se na něj již nemůže navázat (Robinson et al. 2004a).

Diskutuje se však i o dalších mechanismech rezistence na benzimidazoly. Náznaky zkřížené rezistence na benzimidazoly a makrocyclické laktony by ukazovaly na zvýšenou aktivitu P-glykoproteinu jako společný mechanismus podporující rezistenci, toto se však nepodařilo prokázat (Mottier a Prichard 2008, Sargison et al. 2007, Bártíková et al. 2012).

Jiné studie ukazují, že metabolismus by mohl výrazně přispívat k rezistenci na benzimidazoly. Tento mechanismus je prokázán pro rezistenci motolice jaterní na triklabendazol (Robinson et al. 2004b), jelikož motolice jsou schopné jej metabolizovat na výrazně méně anthelminticky aktivní metabolit sulfon. Stejná reakce však nebyla prokázána u nematod (Cvilink et al. 2008b). Metabolismus by se však mohl podílet i na rezistenci vlasovek na benzimidazoly (Vokřál et al. 2012, 2013, Cvilink et al. 2008a, 2008b, 2009).

Konečná koncentrace anthelmintika v místě jeho účinku závisí na mnoha faktorech. Těmi jsou farmakokinetika léčiva v hostitelském zvířeti, metabolismus tímto zvířetem, metabolismus a eflux molekul léčiva parazitem (Lifschitz et al. 2017, Matoušková et al., 2016, Dayan, 2003). Například albendazol v krvi hostitelského zvířete není detekovatelný, protože podléhá velmi rychlé přeměně na jeho aktivní metabolit, albendazol-sulfoxid (rikobendazol). Při studiích metabolismu anthelmintik parazity byly identifikovány výrazné rozdíly vůči metabolismu stejné látky v hostiteli, a také rozdíly mezi jednotlivými druhy helmintů. Nematoda jsou lépe vybavena k metabolismu xenobiotik než trematoda a cestoda (Matoušková et al. 2016).

## Kvalitativní analýza metabolismu studovaných benzimidazolů

V předchozích studiích metabolismu benzimidazolových anthelmintik u *Haemonchus contortus* byly identifikovány čtyři metabolity flubendazolu: FLU-R – flubendazol s redukovanou karbonylovou skupinou, O-glukosid FLU-R a dva N-glykosidy flubendazolu (Vokřál et al. 2012). Tato práce identifikovala celkem osm doposud nedetekovaných metabolitů: N-glykosid FLU s hydrolyzovaným karbamátovým postranním řetězcem, dva N-glykosidy FLU-R, methylovaný FLU-R, acetylglykosid hydroxylovaného FLU s hydrolýzou karbamátového postranního řetězce a dva další O-glykosidy FLU-R. Většina z těchto metabolitů byla překvapivým zjištěním, protože některé z nich vznikly metabolickými reakcemi, které u nematod doposud nebyly prokázány. Hydrolýza karbamátu v postranních řetězců flubendazolu byla zjištěna u prasat a v menší míře i u drůbeže (European Medicines Agency 1997). Hydrolýza karbamátu albendazolu za vzniku aminu probíhá u ovcí a skotu (European Medicines Agency 2004). Methylace byla dříve popsána u motolic (Cvilink et al. 2009). Acetylglykosidy benzimidazolových anthelmintik byly doposud identifikovány pouze u rostlin. U rostlin byly identifikovány i produkty karbamátové hydrolýzy (Podlipná et al. 2013, Stuchlíková et al. 2016).

V této studii byly identifikovány tři různé O-glykosidy FLU-R, což je zajímavé zjištění, protože molekula redukováného flubendazolu má jen jedno místo, na které se může vázat hexosa. Tyto metabolity měly i stejné fragmentační spektrum, což naznačuje, že jediné, v čem se lišily, bylo prostorové uspořádání navázaného cukru. S největší pravděpodobností se tedy na FLU-R ve II. fázi biotransformace váží tři různé hexosy. Takové metabolity jsou známy u rostlin, u helmintů však dosud nebyly popsány. Toto zjištění má dalekosáhlejší důsledky, musíme si totiž také položit otázku, zda ostatní doposud identifikované metabolity jsou skutečně glukosidy, nebo může jít o konjugáty s jiným monosacharidem. Ověření struktury pomocí NMR spektroskopie bohužel nebylo proveditelné, protože se metabolity nepodařilo izolovat v dostatečné koncentraci. Z tohoto důvodu jsou zde všechny konjugáty s cukry popsány jako glykosidy, nikoli glukosidy.

V předchozích studiích metabolismu albendazolu u *Haemonchus contortus* byly identifikovány čtyři různé metabolity. Jedná se o albendazol-sulfoxid (ABZ-SO, RCB) a tři N-glukosidy albendazolu (Cvilink et al. 2008b). Výše zmíněné metabolity u flubendazolu však dávají podnět k diskusi o tom, jedná-li se nutně o glukosid. Je možné, že se na ABZ také váží jiné hexosy. N-glykosidy albendazolu byly identifikovány také

v modelovém organismu pro studium nematod, *C. elegans* (Laing et al. 2010). Vzhledem k vyšší citlivosti metody použité pro tuto práci byly i u albendazolu identifikovány doposud neznámé metabolity. Jedná se o albendazol-sulfon, metabolit běžný u motolic, který však dosud nebyl nalezen u nematod. Dále dva N-glykosidy albendazolu s proběhlou hydrolyzou karbamátového postranního řetězce a dva N-glykosidy ABZ-SO.

Metabolismus rikobendazolu ve vlasovkách dosud nebyl studován. Identifikovali jsme sedm různých metabolitů, vzniklých S-oxidací nebo S-redukcí, a N-glykosidací. Byly nalezeny N-glykosidy ABZ-SO, ABZ i ABZ-SO<sub>2</sub>.

### **Rozdíly v metabolismu samců a samic**

Dalším cílem bylo porovnat metabolismus vybraných anthelmintik u samců a samic. Různá intenzita tvorby jednotlivých metabolitů v závislosti na pohlaví je dobře popsána u lidí, na myších a potkaních modelech (Waxmann a Holloway 2009). U prasat byl zjištěn výraznější polymorfismus mezi jednotlivými plemeny než mezi samci a samicemi (Howard et al. 2015). U *H. contortus* však dosud tato závislost zkoumána nebyla. Množství metabolitů bylo přepočítáváno na mg bílkoviny ve vzorku i proto, aby výsledek nebyl ovlivněn rozdílem velikosti samců a samic. I po odstranění tohoto parametru byly prokázány velké rozdíly v metabolismu samců a samic. Několik metabolitů, detekovaných u samic, nebylo u samců vůbec nalezeno (M7<sub>FLU</sub>, M9<sub>FLU</sub>, M5<sub>ABZ</sub>). Samice většinou produkovaly výrazně vyšší množství každého metabolitu, s výjimkou jednoho z N-glykosidů albendazolu M8<sub>ABZ</sub>, kterého bylo u samců nalezeno více, než u samic. Tyto výsledky poukazují především na významné rozdíly mezi samci a samicemi, proto by bylo vhodné při všech metabolických studiích na vlasovkách brát ohled na pohlaví zkoumaných červů.

### **Rozdíly v metabolismu citlivých a rezistentních kmenů *H. contortus***

Dále jsme studovali rozdíly v metabolismu benzimidazolů u vlasovek na ně citlivých a rezistentních. Předchozí studie (Vokřál et al. 2012, 2013) prokázaly, že rezistentní vlasovky metabolizují anthelmintika intenzivněji. V těchto studiích byly však použity jiné rezistentní kmeny, které pochází ze zcela jiné oblasti a mají odlišný genom (Redman et al. 2012), proto v této práci použity nebyly, aby se minimalizovaly ostatní vlivy na metabolismus. Pro co nepřesnější porovnání vztahu stavu rezistence na danou

skupinu anthelmintik a intenzitu jejich metabolismu byly použity dva blízce příbuzné kmeny *H. contortus*. Kmen ISE (MHco3) je inbrední variantou populace izolované ještě před zavedením rutinního používání benzimidazolů v terénu a je plně citlivý na všechna anthelmintika. Tento kmen byl také vybrán pro sestavení plného genomu tohoto parazita (Laing et al. 2013). Druhý použitý kmen, IRE (MHco5) je vytvořen přímo z ISE kmene aplikací selektivního evolučního tlaku na vznik rezistence vystavením červů rostoucím dávkám benzimidazolů (Yilmaz et al. 2017).

Přímým porovnáním těchto kmenů jsme se pokusili eliminovat jiné faktory, které mohou ovlivňovat intenzitu metabolismu, jako je odlišný genom a geografický původ parazita. Toto je velmi výhodné pro zjištění podílu metabolismu, pro komplexní zhodnocení by však také bylo prospěšné zjistit přítomnost a podíl jednotlivých SNP mutací genu pro  $\beta$ -tubulin. Tato analýza u tohoto nového kmene prozatím provedena nebyla.

Srovnání použitých kmenů prokázalo, že dospělci rezistentního kmene byli schopni deaktivovat použitá léčiva lépe než dospělci kmene citlivého. Celkem 10 metabolitů bylo identifikováno výhradně v rezistentním IRE kmeni. Většina ostatních metabolitů byla u rezistentního kmene produkována ve větší míře než u ISE kmene. Kmen IRE vykazuje vyšší aktivitu enzymů jak první, tak druhé fáze metabolismu. Enzymy obou fází se tedy mohou podílet na rezistenci na anthelmintika. Vyšší intenzita metabolismu první fáze by mohla souviset s dříve zjištěnou zvýšenou konstitutivní expresí enzymu rodiny CYP34/35 u IRE kmene (Yilmaz et al. 2017).

### **Další faktory, které mohou ovlivnit rezistenci na benzimidazoly**

Doposud nebylo s jistotou prokázáno, že by u vlasovek sehrávaly roli v rezistenci na anthelmintika také efluxní mechanismy (Bártíková et al. 2012). Benzimidazolová anthelmintika celkově nejsou považována za dobré substráty P-glykoproteinu, s výjimkou triklabendazolu (Dupuy et al. 2010). Albendazol-sulfoxid a oxfendazol jsou substráty BCRP *in vitro*, případné další rozbory podílu efluxních mechanismů na eliminaci škodlivého vlivu benzimidazolových anthelmintik na parazitické červy by tedy bylo vhodné vést spíše tímto směrem, než studiem P-glykoproteinu (Merino et al. 2005).

U *Giardia duodenalis* nebyly identifikovány změny genu pro  $\beta$ -tubulin, přesto existují kmeny rezistentní na albendazol, který je na giardiózy používán. Tato rezistence by mohla být způsobena zvýšenou aktivitou antioxidantních enzymů prvoka, albendazol

totiž mimo jiné způsobuje oxidativní poškození buněk (Argüello-Garcia et al. 2015). Stejná studie zjistila větší akumulaci ABZSO a ABZSO<sub>2</sub> v citlivých, než v rezistentních kmenech. Toto může být způsobeno pomalejší tvorbou těchto metabolitů, rychlejší eliminací z těla parazita, nebo zrychlenou přeměnou na inaktivní produkty 2. fáze metabolismu. V důsledku toto umožňuje, aby se parazit vyhnul cytotoxickým hladinám ABZSO/ ABZSO<sub>2</sub>.

Podobný trend byl pozorován také u *H. contortus*, kde S-oxidace byla *in vitro* méně intenzivní u rezistentního BR kmene, než u citlivého ISE kmene (Vokřál et al. 2013). Tento fakt není zcela v souladu s výsledky *ex vivo* experimentu stejné studie, která odhalila u rezistentních kmenů nižší hladiny ABZ a vyšší hladiny ABZ-SO v médiu.

Tato diplomová práce potvrzuje závěr předchozích prací, že u rezistentních kmenů *H. contortus* jsou zvýšené aktivity enzymů 2. fáze biotransformace, které benzimidazoly efektivně deaktivují (Vokřál et al. 2012, 2013, Cvilink et al. 2008b). Hladiny antioxidantních enzymů jako jsou katalasy, superoxiddismutasa a glutathionperoxidasy, nebyly u rezistentních kmenů *H. contortus* zvýšené (Vokřál et al. 2013).

Výzkum Scarcella et al. (2012) ukazuje, že u *F. hepatica* rezistentních na triklabendazol by naopak mohly významnou roli hrát glutathion-S-transferasy a flavinmonooxygenasy.

Vztah metabolismu jednotlivých nematod a rezistence na různá anthelmintika je tedy velmi komplexní a hraje v něm roli velké množství faktorů, z nichž mnohé stále nejsou dostatečně detailně prozkoumány.

## 7. Závěr

- Všechna námi studovaná benzimidazolová anthelmintika – flubendazol, albendazol i rikobendazol jsou u dospělých vlasovek slezových intenzivně metabolizována. Byly identifikovány nové metabolity, některé z nich pocházející z metabolických reakcí, které doposud nikdy nebyly u helmintů zaznamenány.
- Byly nalezeny výrazné rozdíly v metabolismu samců a samic dospělých vlasovek. V jakýchkoli následných studiích metabolismu u *H. contortus* by bylo vhodné brát tento fakt v úvahu při tvorbě vzorků a vyhodnocování výsledků.
- Bylo prokázáno, že rezistentní kmen metabolizuje anthelmintika intenzivněji než citlivý, obzvláště v případě samic. To ukazuje, že metabolismus těchto léčiv by mohl mít svůj podíl ve vzniku rezistence u *H. contortus*. Přesto je pravděpodobné, že hlavním mechanismem rezistence na benzimidazoly jsou SNP v genu pro  $\beta$ -tubulin.
- Výsledky této práce byly také publikovány ve formě článku – <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005>.

IJP: Drugs and Drug Resistance 8 (2018) 50–58



### Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites



Lucie Raisová Stuchlíková<sup>a</sup>, Petra Matoušková<sup>a</sup>, Ivan Vokřál<sup>b</sup>, Jiří Lamka<sup>b</sup>, Barbora Szotáková<sup>a</sup>, Anna Sečkařová<sup>a</sup>, Diana Dimunová<sup>a</sup>, Linh Thuy Nguyen<sup>a</sup>, Marián Várady<sup>c</sup>, Lenka Skálová<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, Košice, Slovakia

Obr. 13. Článek Raisová Stuchlíková L., Matoušková P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Sečkařová A., Dimunová D., Nguyen L. T., Várady M., Skálová L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites, IJP: Drugs and Drug Resistance 8, str. 50-58.



## 8. Seznam zkratek

ABC – ATP-binding cassette

ABZ – albendazol

ABZ-SO – albendazol-sulfoxid, RCB

ABZ-SO<sub>2</sub> – albendazol-sulfon

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, zdroj iontů pro MS

APPI - fotoionizace za atmosférického tlaku, zdroj iontů pro MS

ATP – adenosin-trifosfát

AKR – aldo-keto reductasy

BCA – kyselina bicinchonininová

BCRP – breast cancer resistant protein, typ ABC transportéru

BSA – bovine serum albumin, albumin získaný ze séra skotu

CI – chemická ionizace, zdroj iontů pro MS

CYP – cytochrom P450

DMSO - dimethylsulfoxid

EC<sub>50</sub> – koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50% testovaných vzorků

EHA – egg-hatch assay

EI – elektronová ionizace, zdroj iontů pro MS

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

epg – eggs per gram, počet vajíček v 1 gramu trusu

ESA – elektrostatický analyzátor, používá se v MS v kombinaci s magnetickým analyzátozem

ESI – elektrosprejová ionizace, zdroj iontů pro MS

FAB – ionizace urychlenými atomy, zdroj iontů pro MS

FAMACHA – Faffa Malan chart

FD – desorpce polem, zdroj iontů pro MS

FEC – fecal egg count

FECRT – fecal egg count reduction test

FLU - flubendazol

FMO – flavinmonooxidasy

GABA – kyselina  $\gamma$ -aminomáselná

GC – gas chromatography, plynová chromatografie

GD – glow discharge, zdroj iontů pro MS

GluCl – glutamátem řízené chloridové kanály

GST – glutathion-S-transferasy

GTP – guanosin-trifosfát

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IRE – Inbred Resistant Edinburgh, rezistentní kmen *H. contortus*, MHco5

ISE – Inbred Susceptible Edinburgh, citlivý kmen *H. contortus*, MHco3

LC – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

LC/MS – liquid chromatography/ mass spektrometry – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

MALDI – ionizace laserem za účasti matrice, zdroj iontů pro MS

MAO – monoaminoxidasa

MAPEG - membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism, třída GST vázaná na membránu

MBZ - mebendazol

MDR – medium-chain dehydrogenases

MDR – multi drug resistant, typ ABC transportéru

MHco3 – citlivý kmen *H. contortus*, ISE

MHco5 - rezistentní kmen *H. contortus*, IRE

MRP - multidrug resistance protein, typ ABC transportéru

nAChR – nikotinový acetylcholinový receptor

NBD – doména vážící nukleotid, součást ABC transportéru

NMR spektroskopie – spektroskopie nukleární magnetické rezonance

PCR – polymerasová řetězová reakce

PCV – packed cell volume, podíl sedimentovaných krvinek k celkovému objemu krve

P-gp – P-glykoprotein, efluxní transportér

Q-TOF – hybridní analyzátor pro MS, kvadrupól + analyzátor doby letu

RCB – rikobendazol, ABZ-SO

SDR – short-chain dehydrogenases

SNP – single nucleotide polymorphism

SOD – superoxiddismutasa

SPE – solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

TMD – transmembránová doména ABC transportéru

TOF – time of flight, analýza doby letu

TSP – termosprej, zdroj iontů pro MS

TST – target selective treatment

UDP – uridin difosfát

UGT - uridinglykosyltransferasy

UHPLC - ultra high-performance liquid chromatography, ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

UHPLC/MS – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

UV – ultrafialové záření

XO - xanthinoxidasa

## 9. Seznam použité literatury

Alvarez L. I., Imperiale F. A., Sánchez S. F., Murno G. A. a Lanusse C. E. (2000) Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep, *Veterinary Parasitology*, 94, str. 75-89

Ardrey R. E. (2003) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, 1st edition, Chichester: Wiley, str. xix, 263, Series: Analytical Techniques in the Sciences, ISBN: 0-471-49799-1

Argüello-García R., Cruz-Soto M., González-Trejo R., Paz-Maldonado L. M. T., Bazán-Tejeda M. L., Mendoza-Hernández G. a Ortega-Pierres G. (2015) An antioxidant response is involved in resistance of *Giardia duodenalis* to albendazole, *Frontiers in Microbiology*, Volume 6, Article 286

Ashcroft A. E. (1997) *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, 1st edition, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 186 stran, RSC Analytical Spectroscopy Series, ISBN: 184755119X

Barrère V., Keller K., von Samson-Himmelstjerna G. a Prichard R. K. (2013) Efficiency of a genetic test to detect benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* nematodes in sheep farms in Quebec, Canada, *Parasitology international*, 62, str. 464-470

Bártíková H., Křížová V., Lamka J., Kubíček V., Skálová L. a Szotáková, B. (2010) Flubendazole metabolism and biotransformation enzymes activities in healthy sheep and sheep with heamonchosis, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33, str. 56-62

Bártíková H., Vokřál I., Kubíček V., Szotáková B., Prchal. L., Lamka J., Várady M. a Skálová L. (2012) Import and efflux of flubendazole in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics, *Veterinary Parasitology*, 187, str. 473-473

Besier R. B., Love R. A., Lyon J. a van Burgel A., J. (2010) A targeted selective treatment approach for effective and sustainable sheep worm management: investigations in Western Australia, *Animal Production Science*, 50, str. 1034-1042

Blake N. a Coles G. (2007) Flock cull due to anthelmintic-resistant nematodes, *Veterinary Record*, 161, str. 36

Blouin M., Yowell Ch., Courtney Ch. a Dame J. (1995) Host Movement and the Genetic Structure of Populations of Parasitic Nematodes, *Genetics*, vol. 141 iss. 3 str. 1007 -1014

Borgers M., De Nollin S., De Brabander M. a Thienpont D. (1975) Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells, *American Journal of Veterinary Research* 36 (08), str. 1153-66

Bott N. J., Campbell B. E., Beveridge I., Chilton N. B., Rees D., Hunt P. W. a Gasser R. B. (2009) A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep, *International Journal for Parasitology* 39, str. 1277-1287

Burke J. M., Miller J. E. a Terrill T. H. (2009) Impact of rotational grazing on management of gastrointestinal nematodes in weaned lambs, *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), str. 67-72

Colditz I. G., Le Jambre L. F. a Hosse R. (2002) Use of lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces, *Veterinary Parasitology*, 105(3), str. 219-227

Coles G. C., East J. M. a Jenkins S. N. (1975) The mechanism of action of the anthelmintic levamisole, *General Pharmacology: The Vascular System*, Vol. 6, Iss. 4, str. 309-313

Coles G., Bauer C., Borgsteede F., Geerts S., Klei T., Taylor M. a Waller P. (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, *Veterinary Parasitology*, 44, str. 35–44

Cvilink V., Kubíček V., Nobilis M., Křížová V., Szotáková B., Lamka J., Várady M., Kuběnová M., Novotná R., Gavelová M. a Skálová L. (2008a) Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 151, str. 242-248

Cvilink V., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Kostianen R. a Ketola R. A. (2008b) LC-MS-MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed *ex vivo* by *Haemonchus contortus*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, str. 337-343

Cvilink V., Lamka J. a Skálová L. (2009) Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths, *Drug Metabolism Reviews*, 41(1), str. 8-26

Dayan A. D. (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Tropica* 86, str. 141-159

Demeler J., Krüger N., Krücken J., von der Heyden V. C., Ramünke S., Küttler U., Miltsch S., López Cepeda M., Knox M., Vercruyse J., Geldhof P., Harder A. a von Samson-Himmelstjerna G. (2013) Phylogenetic Characterization of  $\beta$ -Tubulins and Development of Pyrosequencing Assays for Benzimidazole Resistance in Cattle Nematodes, *PLoS One*, 8(8):e70212

Dobson R. J., Hosking B. C., Besier R. B., Love S., Larsen J. W. A., Rolfe P. F. a Balley J. N. (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, *Australian Veterinary Journal*, 89, str. 160-166

Dupuy J., Alvinerie M., Ménez C. a Lespine A. (2010) Interaction of anthelmintic drugs with P-glycoprotein in recombinant LLC-PK1-mdr1a cells, *Chemico-Biological Interactions* 186, str. 280-286

European Medicines Agency, Committee for veterinary medicinal products, *Flubendazole. Summary report* [online], 1997, c. 2018 [cit. 2018-05-04], url=<[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500014288.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014288.pdf)>

European Medicines Agency, Committee for medical products for veterinary use, *Albendazole. Summary report*, [online], 2004, c. 2018 [cit. 2018-05-04], url=<[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500009638.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500009638.pdf)>

Gasser R. B. a von Samson-Himmelstjerna G. (2016) *Advances in Parasitology, Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*, 1st edition, Amsterdam: Academic Press, 666 str., ISBN: 978-0-12-810395-1

Geary T. G., Sakanari J. A. a Caffrey C. R. (2015) Anthelmintic Drug Discovery: Into the Future, *Journal of Parasitology*, 101 (2), str. 125-133

Greer A. W., Kenyon F., Bartley D. J., Jackson E. B., Gordon Y. a Donnan A. A. (2009) Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of a targeted selected treatment (TST) regime in lambs, *Veterinary Parasitology*, 164, str. 12-20

Harispe L., García G., Arbildi P., Pascovich L., Chalar C., Zaha A. a Fernandez V. (2010) Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*, *Acta Tropica*, 114, str. 31-36

Higgins Ch. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview, *Research in Microbiology*, 152, str. 205-210

Howard J. T., O’nan A. T., Maltecca Ch., Baynes R. E. a Ashwell M. S. (2015) Differential gene expression across breed and sex in commercial pigs administered fenbendazole and flunixin meglumine, *PLoS One*, 10 (9), e01378830

Choe K. P., Leung Ch. K. a Miyamoto M. M. (2012) Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance, *Drug Metabolism Reviews*, 44(3), str. 209-223

Churcher T. S., Filipe J. A. N. a Basáñez M. (2006) Density dependence and the control of helminth parasites, *Journal of Animal Ecology*, 75, str. 1313-1320

Jackson F., Varady M. a Bartley D. J. (2012) Managing anthelmintic resistance in goats – Can we learn lessons from sheep?, *Small Ruminant Research*, 103, str. 3-9

Jacobs D., Fox. M., Gibbons L. a Hermosilla C. (2016) *Principles of Veterinary Parasitology*, 1st edition, Chichester: Wiley, 312 str., ISBN: 978-0470670422

Kaminsky R., Ducray P., Jung. M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Schorderet, Weber S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A. a Mäser P. (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes, *Nature*, 452(7184), str. 176-80

Kaplan R. M., Burke J. M., Terrill T. H., Miller J. E., Getz W. R., Mobini S., Valencia E., Williams M. J., Williamson L. H., Larsen. M. a Vatta A. F. (2004) Validation of the FAMACHA<sup>©</sup> eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States, *Veterinary Parasitology*, 123, str. 105-120

Kaplan R. M. a Vidyashankar A. N. (2012) An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance, *Veterinary Parasitology*, 186, str. 70-78

Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminsky R. a von Samson-Himmelstjerna G. (2003) P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, str. 332-346



Kotze A. C. a McClure S. J. (2001) *Haemonchus contortus* utilises catalase in defence against exogenous hydrogen peroxide in vitro., *International Journal for Parasitology*, 31, str. 1563-1571

Kotze A. C., Hunt P. W., Skuce P., von Samson-Himmelstjerna G., Martin R. J., Sager H., Krücken J., Hodgkinson J., Lespine A., Jex A. R., Gilleard J. S., Beech R. N., Wolstenholme A. J., Demeler J., Robertson A. P., Charvet C. L., Neveu C., Kaminsky R., Rufener L., Alberich M., Menez C. a Prichard R. K. (2014) Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, str. 164-184

Kuchai J. A., Ahmad F., Chishti M. Z., Tak H., Ahmad J., Ahmad S. a Rasool M. (2012) A Study on Morphology and Morphometry of *Haemonchus Contortus*, *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 44 (6), str. 1737-1741

Laing S. T., Ivens A., Laing R., Ravikumar S., Butler V., Woods D. J. a Gilleard J. S. (2010) Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites, *Biochemical Journal*, 432 (3), str. 505-516

Laing R., Kikuchi T., Martinelli A., Tsai I. J., Beech R. N., Redman E., Holroyd N., Bartley D. J., Beasley H., Britton C., Curran D., Devaney E., Gilabert A., Hunt M., Jackson F., Jonhston S. L., Kruykov I., Li K., Morrison A. A., Reid A. J., Sargison N., Saunders G. I., Wasmuth J. D., Wolstenholme A., Berriman M., Gilleard J. S. a Cotton J. A. (2013) The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery, *Genome Biology*, 14:R88

Lamka J., Nevole Z., Ducháček L., Velík J. a Zavřel S. (2000) The comparison of mebendazole and flubendazole anthelmintic efficacy in experimental treatment of mouflon (*Ovis musimon*) muelleriosis, *Veterinary Medicine-Czech*, 45, str. 45–48

Lamka J. a Ducháček L. (2006) *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*, Vydání třetí, Praha: Karolinum, 151 str., ISBN 00-000-0000-0

Lifschitz A., Lanusse C. a Alvarez L. (2017) Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants, *New Zealand Veterinary Journal*, 65(4), str. 176-184

Little P. R., Hodge A., Maeder S. J., Wirtherle N. C., Nicholas D. R., Cox G. G. a Conder G. A. (2011) Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains, *Veterinary Parasitology*, 181, str. 180-193

Malviya R., Bansal V., Pal O. P. a Sharma P. K. (2010) High performance liquid chromatography: A short review, *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), str. 22-26

Matoušková P., Vokřál I., Lamka J. a Skálová L. (2016) The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths, *Trends in Parasitology*, Vol. 32, No. 6, str. 481-491

Menzel R., Yeo H. L., Rienau S., Li S., Steinberg Ch. E. W. a Stürzenbaum S. R. (2007) Cytochrome P450s and Short-chain Dehydrogenases Mediate the Toxicogenomic Response of PCB52 in the Nematode *Caenorhabditis elegans*, *Journal of Molecular Biology*, 370, str. 1-13

Merino G., Jonker J. W., Wagenaar E., Pulido M. M., Molina A. J., Alvarez A. I. a Schinkel A. H. (2005) Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Drug Metabolism & Disposition*, 33 (5), str. 614–618

Meyer V. R. (2004) *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th edition, Chichester: Wiley, 359 str., ISBN: 0-470-09378-1

Mottier M. D. a Prichard R. K. (2008) Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*, *Pharmacogenetics and Genomics*, 18, str. 129-140

Nobilis M., Jira T., Lída M., Holčápek M., Szotáková B., Lamka J. a Skálová L. (2007) Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 1149, str. 112-120

Nováková L., Matysová L. a Solich P. (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, 68, str. 908-918

Patel R. S., Roy M. a Dutta G. K. (2012) Mass spektrometry – A review, *Veterinary World*, 5 (3), str. 185-192

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

Preston S. J. M., Sandeman M., Gonzales J. a Piedrafita D. (2014) Current status for gastrointestinal nematode diagnosis in small ruminants: Where are we and where are we going?, *Journal of Immunology Research*, Vol. 2014, Article ID 210350

Prichard R. K., Hall C. A., Kelly J. D., Martin I. C. A. a Donald A. D. (1980) The problem of anthelmintik resistance in nematodes, *Australian Veterinary Journal*, Vol. 56, Iss. 5, str. 239-250

Prichard R. (2001) Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics, *Trends in Parasitology*, Vol. 17, No. 9, str. 445-453

Puttachary S., Trailovic S. M., Robertson A. P., Thompson D. P., Woods D. J. a Martin R. J. (2013) Derquantel and abamectin: Effects and interactions on isolated tissues of *Ascaris suum*, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 188, str. 79-86

Rawden H. C., Kokwaro G. O., Ward S. A. a Edwards S. (2000) Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the

metabolism of albendazole by human liver microsomes, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49 (4), str. 313-322

Redman E., Sargison N., Whiteclaw F., Jackson F., Morrison A., Bartley D. J. a Gilleard J. S. (2012) Introgression of ivermectin resistance genes into a susceptible *Haemonchus contortus* strain by multiple backcrossing, *PLoS Pathogens*, Vol. 8, Iss. 2, e1002534

Robards K., Haddad P. R., Jackson P. E. (1994) *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, 1st edition, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 495 str., ISBN: 0-12-589570-4

Robinson M. W., McFerran N., Trudgett A., Hoey L. a Fairweather I. (2004a) A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an interdomain movement, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, str. 275–284.

Robinson M. W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E. M. a Fairweather I. (2004b) The comparative metabolism of triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*, *Parasitology Research*, 92, str. 205-210

Roh J., Jung I., Lee J. a Choi J. (2007) Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, *Toxicology*, 237, str. 126-133

Santos M. C., Xavier J. K., Amarante M. R. V., Bassetto C. C. a Amarante A. F. T. (2014) Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity, *Veterinary Parasitology*, 203, str. 127-138

Sargison N. D., Jackson F., Bartley D. J., Wilson D. J., Stenhouse L. J. a Penny C. D. (2007) Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland, *Veterinary Parasitology*, 145, str. 65-76

Sargison N. D. (2012) Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep – future of anthelmintic drugs, *Veterinary Parasitology*, 189, str. 79–84

Saunders G. I., Wasmuth J. D., Beech R., Laing R., Hunt M., Naghra H., Cotton J. A., Berriman M., Britton C. a Gilleard J. S. (2013) Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* b-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes, *International Journal for Parasitology*, 43, str. 465-475

Scott I., Pomroy W., Kenyon P., Smith G., Adlington B. a Moss A. (2013) Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* nad *Trichostrongylus colubriformis*, *Veterinary Parasitology*, 198, str. 166-171

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

Stuchlíková L., Jirásko R., Skálová L., Pavlík F., Szotáková B., Holčapek T. a Podlipná R. (2016) Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*), *Chemosphere*, 157, str. 10-17

Swales W. E. (1939) Tests of phenothiazine, a highly efficient anthelmintic: On a means of administration and the indicated uses for the control of parasitic diseases of sheep, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Vol. III, No. 7, str. 188-194

Tak I. R., Dar J. S., Ganai B. A. a Chishti M. Z. (2014) A brief study of morphology of *Haemonchus contortus* and its hematophagous behaviour, *Global Veterinaria*, 13 (6), str. 960-965

Terril T. H., Miller J. E., Burke J. M., Mosjidis J. A. a Kaplan R. M. (2012) Experiences with integrated concepts for the control of *Haemonchus contortus* in sheep and goats in the United States, *Veterinary Parasitology*, 186, str. 28-37

Turner M. J. a Schaeffer J. M. (1989) Mode of Action of Ivermectin, In: *Ivermectin and Abamectin*, 1st edition, New York: Springer, Chapter 5, str. 73 – 85, ISBN: 978-1-4612-8184-9

Urquhart G. M., Armour J., Duncan J. L., Dunn A. M., Jennings F. W. (1987) *Veterinary Parasitology*, 2nd edition, Glasgow: Blackwell, 314 str., ISBN: 978-0582229808

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, *Detail VLP* [online], Flimabend 100 mg/g, Suspenze pro podání v pitné vodě, Datum registrace: 11. 7. 2013, poslední revize: Srpen 2016 [cit. 2018-05-04], url= <[www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780164eb5.doc](http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780164eb5.doc)>

Valát M. (2014) *Metabolismus monepantelu u parazitů a jejich hostitelů*, Diplomová práce, Katedra biochemických věd na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy, Hradec Králové, str. 40

van Dijk J., Sargison N. D., Kenyon F. a Skuce P. J. (2010) Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions, *Animal*, 4, 3, str. 377-392

van Wyk J. A. a Gerber H. M. (1978) Recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta and mucosa gelled in agar: preliminary report, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 45, str. 29-38

van Wyk J. A., Gerber H. M. a Groeneveld H. T. (1980) A technique for the recovery of nematodes from ruminants by migration from gastro-intestinal ingesta gelled in agar: large-scale application. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 47, str. 147-58

van Wyk J. A. (2001) Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68(1), str. 55-67

Vercruysse J., Holdsworth P., Letonja T., Barth D., Conder G., Hamamoto K. a Okano K. (2001) International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines., *Veterinary Parasitology*, 96, str. 171-193

Veterinary Medicines Directorate, *Product Information Database* [online], Valbazen SC 2.5% Total Spectrum Wormer Oral Suspension SPC, last revision: January 2011 [cit. 2018-05-04], url= <[http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC\\_Documents/SPC\\_113082.doc](http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC_Documents/SPC_113082.doc)>

Veterinary Medicines Directorate, *Product Information Database* [online], Allverm 4% Oral Suspension for Sheep SPC, last revision: 23rd June 2010 [cit. 2018-05-04], url= <[http://www.vmd.defra.gov.uk/ProductInformationDatabase/SPC\\_Documents/SPC\\_123674.doc](http://www.vmd.defra.gov.uk/ProductInformationDatabase/SPC_Documents/SPC_123674.doc)>

Vokřál I., Bártíková H., Prchal L., Stuchlíková L., Skálová L., Szotáková B., Lamka J., Várady M. a 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, str. 1309-1316

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

von Samson-Himmelstjerna G., Blackhall W., McCarthy J. a Skuce P. (2007) Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes, *Parasitology*, 134, str. 1077-1086

von Samson-Himmelstjerna G., Coles G. C., Jackson F., Bauer Ch., Borgsteede F., Cirak V. Y., Demeler J., Donnan A., Dorny P., Epe Ch., Harder A., Höglund J., Kaminsky R., Kerboeuf D., Küttler U., Papadopoulos E., Posedi J., Small J., Várady M., Vercruysse J. a Witherle N. (2009) Standardization of the egg hatch test for the

detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes, *Parasitology Research*, 105, str. 825-834

Waghorn G. (2008a) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – Progress and challenges, *Animal Feed Science and Technology*, 147, str. 116-139

Waghorn T. S., Leathwick D. M., Miller C. M. a Atkinson D. S. (2008b) Brave or gullible: Testing the concept that leaving susceptible parasites in refugia will slow the development of anthelmintic resistance, *New Zealand Veterinary Journal*, 56, 4, str. 158-163

Waller P. J., Rudby-Martin L., Ljungström B. L. a Rydzik A. (2004) The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies, *Veterinary Parasitology*, 122, str. 207-220

Waxman D. J. a Holloway M. G. (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes, *Molecular Pharmacology*, 76, str. 215-228

Xie C., Zhong D., Yu K. a Chen X. (2012) Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC-Q-TOF MS, *Bioanalysis*, 4(8), str. 937-959

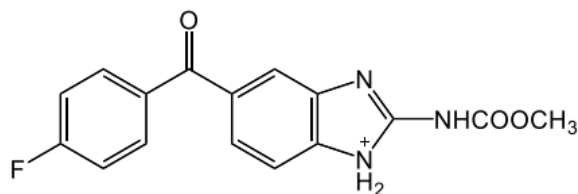
Yilmaz E., Ramücke S., Demeler J. a Krücken J. (2017) Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7, str. 362-369



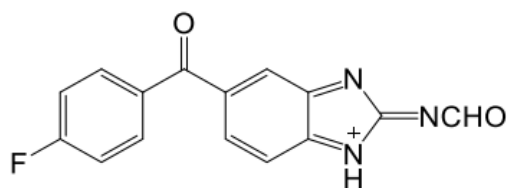
## 10. Příloha - Chemické vzorce iontů identifikovaných při tandemové hmotnostní spektrometrii

### Metabolity flubendazolu

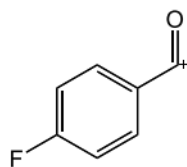
Flubendazol (parentní molekula) –  $m/z$  314



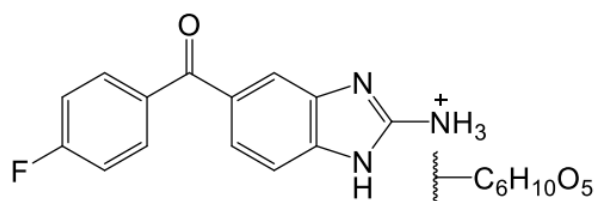
$m/z$  282, vzniklý z  $m/z$  314 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



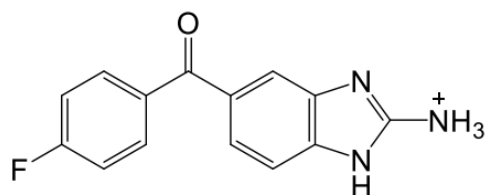
$m/z$  123, produkt fragmentace flubendazolu



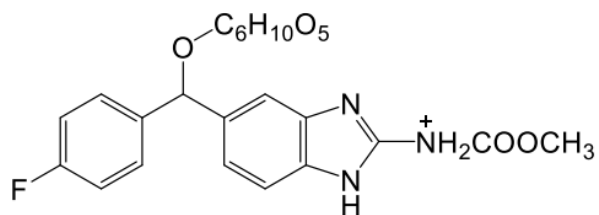
Metabolity **M1<sub>FLU</sub>** a **M5<sub>FLU</sub>** – produkty hydrolyzy a následné N-glykosidace flubendazolu,  $m/z$  418



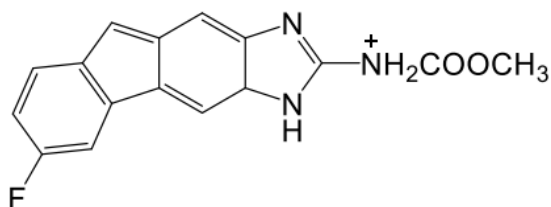
$m/z$  256, vzniklý z  $m/z$  418 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



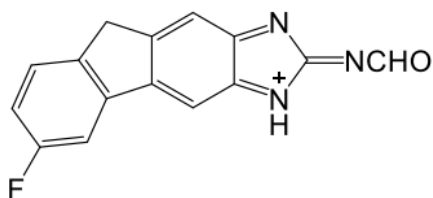
**Metabolity M3<sub>FLU</sub>, M4<sub>FLU</sub> a M6<sub>FLU</sub>** – produkty redukce karbonylové skupiny a následné O-glykosidace flubendazolu, **m/z 478**



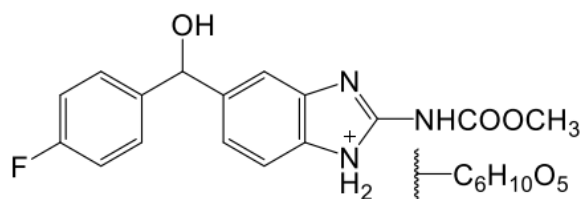
**m/z 298**, vzniklý z m/z 478 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162 a vody  $\Delta m/z$  18



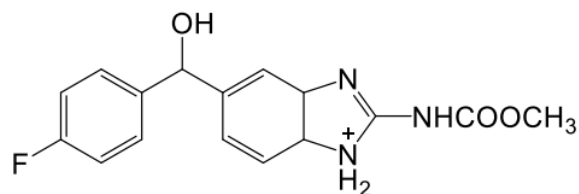
**m/z 266**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



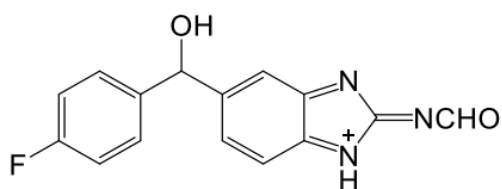
**metabolity M2<sub>FLU</sub> a M7<sub>FLU</sub>** – produkty redukce karbonylové skupiny flubendazolu a následné N-glykosidace, **m/z 478**



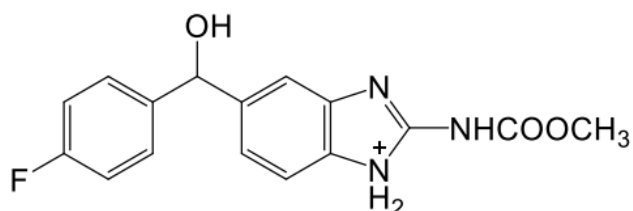
**m/z 316**, vzniklý z m/z 478 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



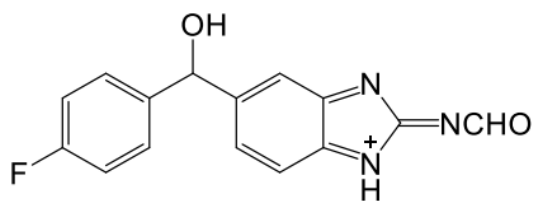
**m/z 284**, vzniklý z m/z 316 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



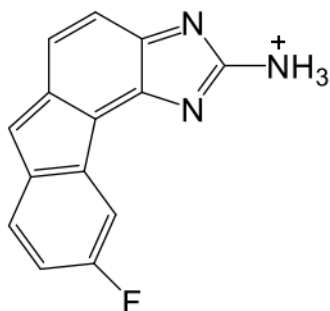
**Metabolit M8<sub>FLU</sub>** - flubendazol po redukci karbonylové skupiny, **m/z 316**



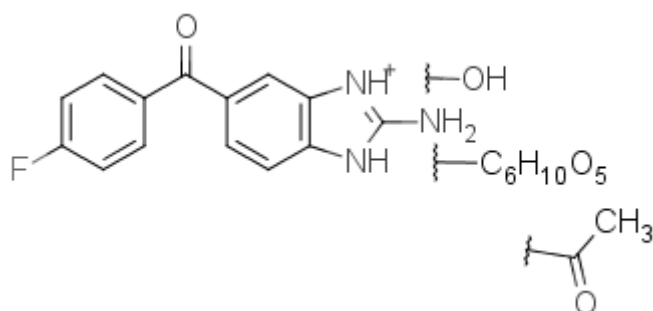
**m/z 284**, vzniklý z m/z 316 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



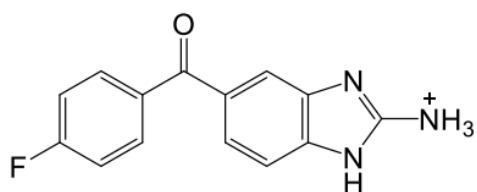
**m/z 238**, vzniklý z m/z 284 neutrální ztrátou vody  $\Delta m/z$  18 a oxidu uhelnatého  $\Delta m/z$  28



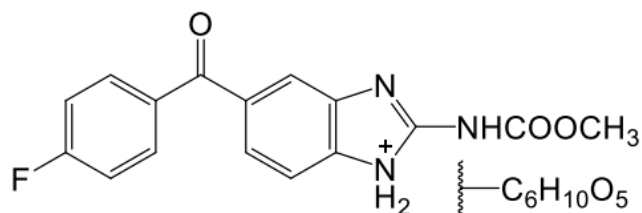
**Metabolit M11<sub>FLU</sub>** – produkt hydrolyzy a hydroxylace flubendazolu s následnou glykosidací a acetylací, **m/z 476**



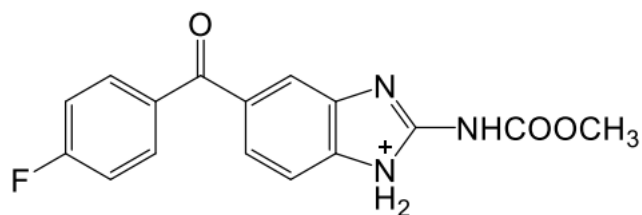
**m/z 256**, vzniklý z m/z 476 neutrální ztrátou O-acetylhexosy  $\Delta m/z$  220



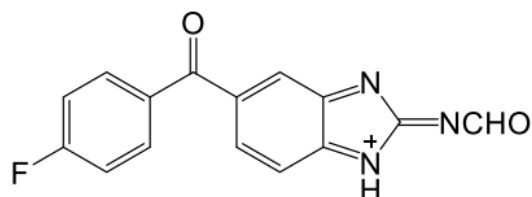
**Metabolity M9<sub>FLU</sub> a M12<sub>FLU</sub>** – N-glykosidovaný flubendazol, **m/z 476**



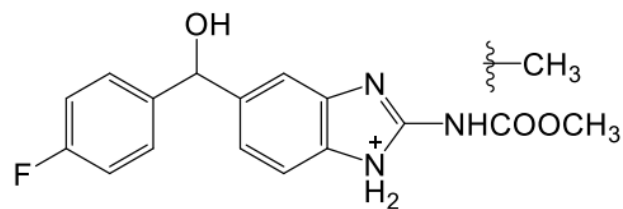
**m/z 314**, vzniklý z m/z 476 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



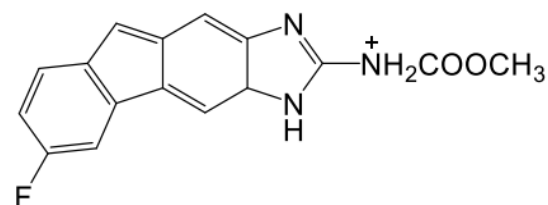
**m/z 282**, vzniklý z m/z 314 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



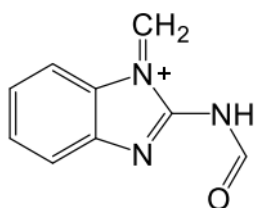
**Metabolit M10<sub>FLU</sub>** – produkt methylace a redukce karbonylové skupiny flubendazolu, **m/z 330**



**m/z 298**, vzniklý z m/z 330 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32

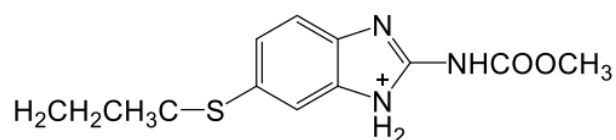


fragment **m/z 174**

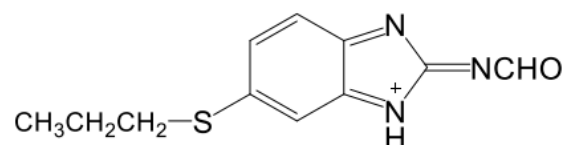


## Metabolity albendazolu

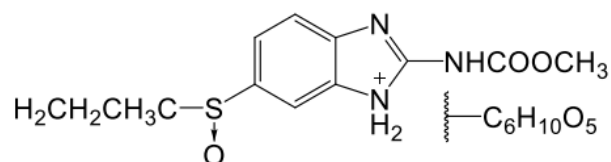
**Albendazol – parentní molekula, m/z 266**



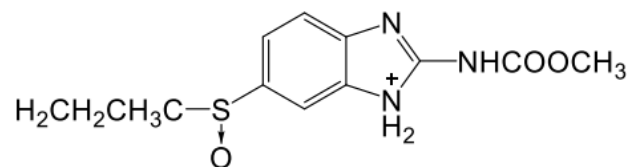
**m/z 234**, vzniklý z m/z 266 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



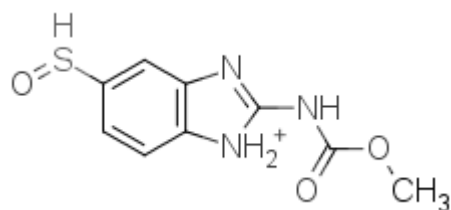
**Metabolity M1<sub>ABZ</sub>, M2<sub>ABZ</sub>** – N-glykosidovaný albendazol-sulfoxid (produkt S-oxidace), **m/z 444**



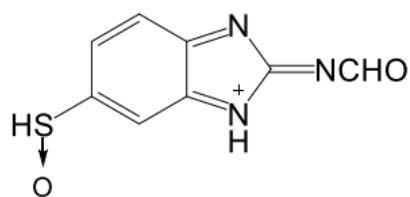
**m/z 282**, vzniklý z m/z 444 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



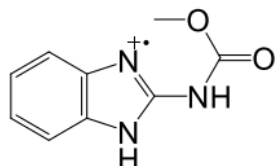
**m/z 240**, vzniklý z m/z 282 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42



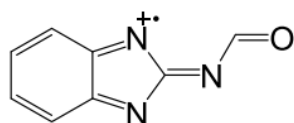
**m/z 208**, vzniklý z m/z 240 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



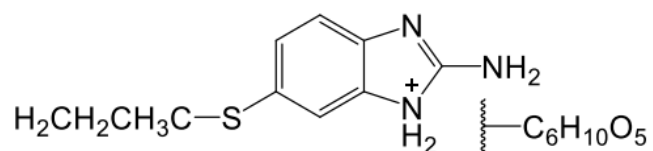
radikálový ion **m/z 191**



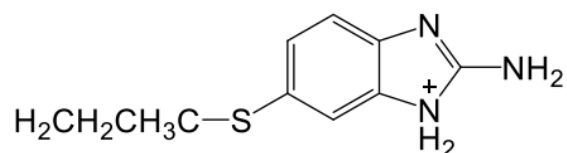
radikálový ion **m/z 159**



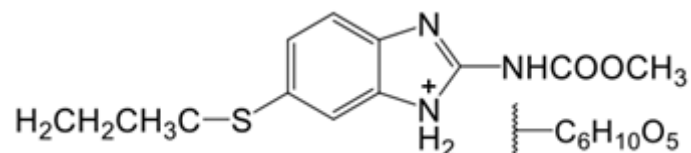
**Metabolity M4<sub>ABZ</sub> a M5<sub>ABZ</sub>**, vzniklé hydrolyzou karbamátové skupiny albendazolu a jeho N-glykosidací, **m/z 370**



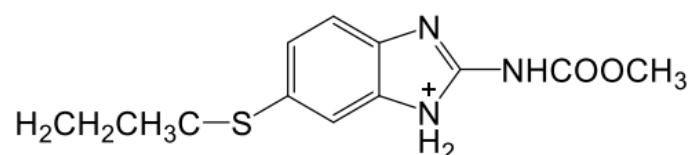
**m/z 208**, vzniklý z m/z 370 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



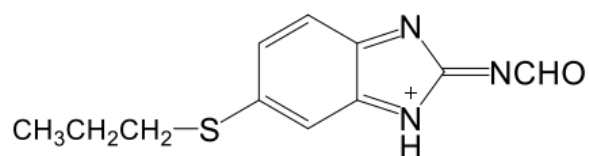
**Metabolity M7<sub>ABZ</sub>, M8<sub>ABZ</sub> a M9<sub>ABZ</sub>**, produkty N-glykosidace albendazolu, **m/z 428**



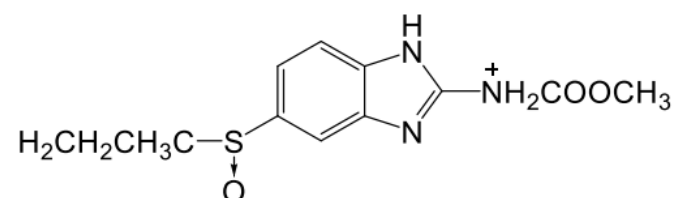
**m/z 266**, vzniklý z m/z 428 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



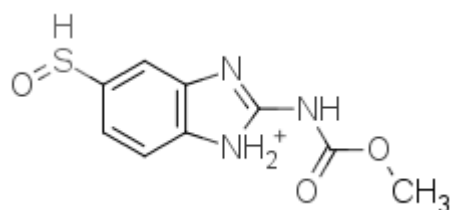
**m/z 234**, vzniklý z m/z 266 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



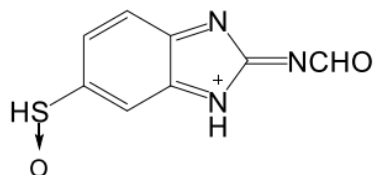
**Metabolit M3<sub>ABZ</sub>** – produkt sulfoxidace albendazolu, **m/z 282**



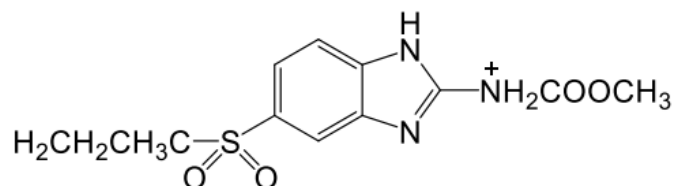
**m/z 240**, vzniklý z m/z 282 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42



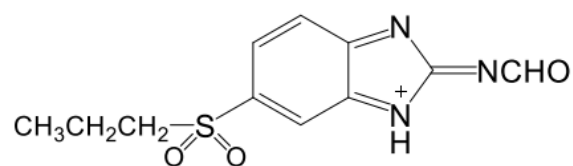
**m/z 208**, vzniklý z m/z 240 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



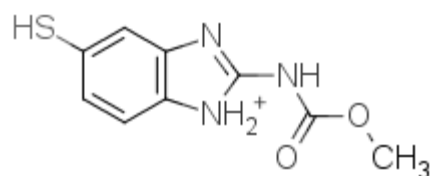
**Metabolit M6<sub>ABZ</sub>**, produkt dvojnásobné S-oxidace albendazolu, albendazol-sulfon, **m/z 298**



**m/z 266**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32

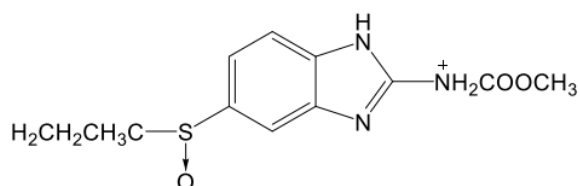


fragment **m/z 224**

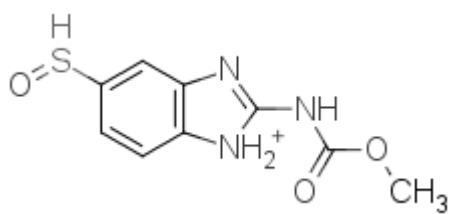


## Metabolismus rikobendazolu

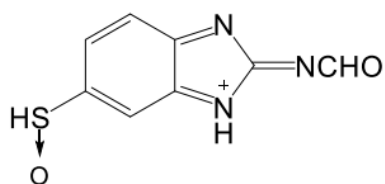
**Rikobendazol, parentní molekula, m/z 282**



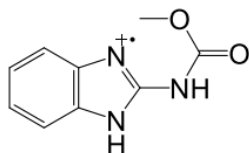
**m/z 240**, vzniklý z m/z 282 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42



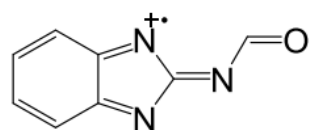
**m/z 208**, vzniklý z m/z 240 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



radikálový ion **m/z 191**

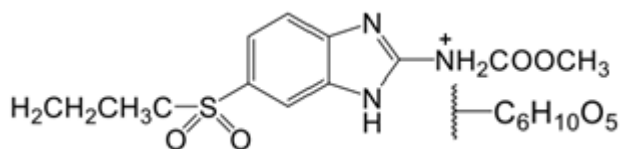


radikálový ion **m/z 159**

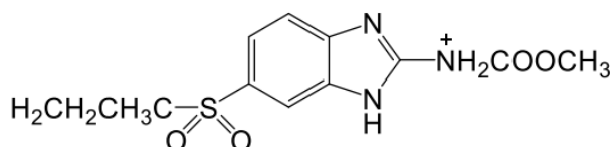




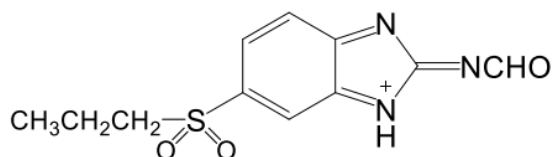
**Metabolit M3<sub>RCB</sub>**, vzniklý S-oxidací rikobendazolu a následnou N-glykosidací, **m/z 460**



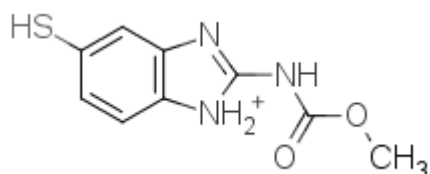
**m/z 298**, vzniklý z m/z 460 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



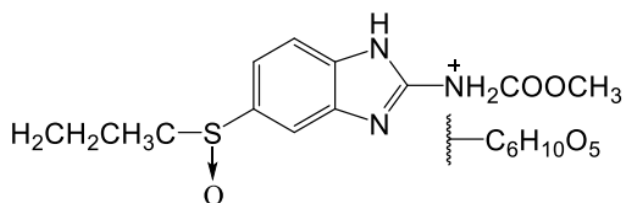
**m/z 266**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



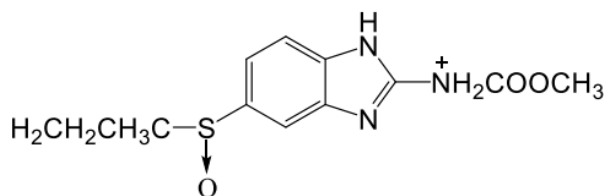
**m/z 224**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42 a molekuly kyslíku  $\Delta m/z$  32



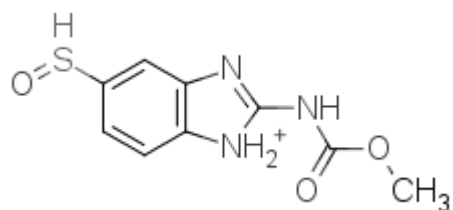
**metabolity M1<sub>RCB</sub> a M2<sub>RCB</sub>** – N-glykosidovaný rikobendazol, **m/z 444**



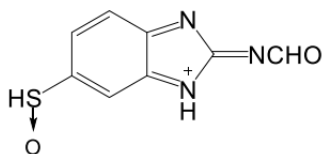
**m/z 282**, vzniklý z m/z 444 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



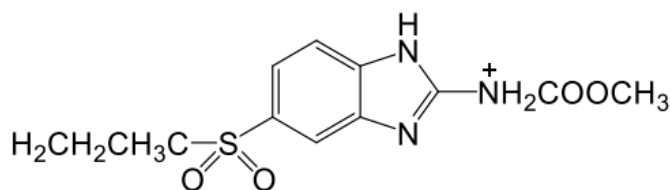
**m/z 240**, vzniklý z m/z 282 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42



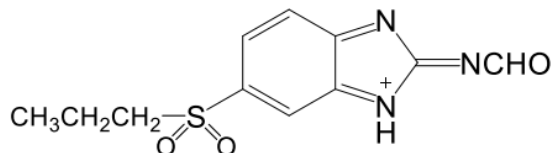
**m/z 208**, vzniklý z m/z 240 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



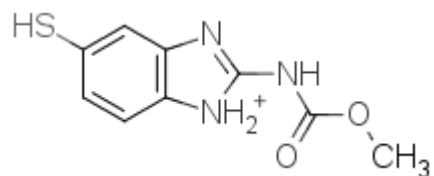
**metabolit M4<sub>RCB</sub>**, produkt S-oxidace rikobendazolu, **m/z 298**



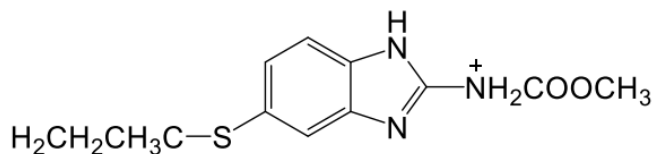
**m/z 266**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



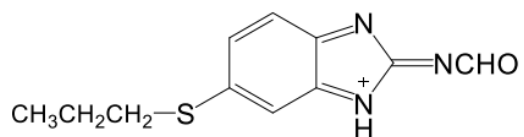
**m/z 224**, vzniklý z m/z 298 neutrální ztrátou propenu  $\Delta m/z$  42 a molekuly kyslíku  $\Delta m/z$  32



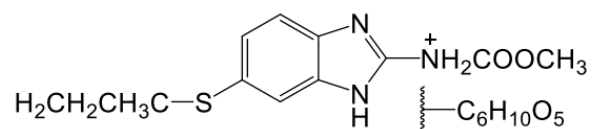
**Metabolit M7<sub>RCB</sub>**, vzniklý redukcí sulfoxidu rikobendazolu, **m/z 266**



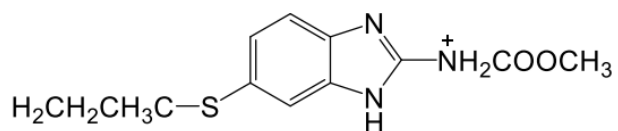
**m/z 234**, vzniklý z m/z 266 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32



**Metabolity M5<sub>RCB</sub> a M6<sub>RCB</sub>**, vzniklé redukcí sulfoxidu rikobendazolu a následnou N-glykosidací, **m/z 428**



**m/z 266**, vzniklý z m/z 428 neutrální ztrátou hexosy  $\Delta m/z$  162



**m/z 234**, vzniklý z m/z 266 neutrální ztrátou methanolu  $\Delta m/z$  32

