

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**FARMAKOKINETIKA IVERMEKTINU
V TRUSU OVCE DOMÁCÍ**

Mgr. Kateřina Lokvencová

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

Konzultant: PharmDr. Hana Bártíková, Ph.D. a Mgr. Lukáš Prchal

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat RNDr. Lucii Raisové Stuchlíkové Ph.D.; PharmDr. Haně Bártíkové, Ph.D.; Mgr. Lukáši Prchalovi a PharmDr. Ivanu Vokřálovi Ph.D. za jejich ochotu, cenné rady a důležitou pomoc při získávání informací a dat pro tuto rigorózní práci. Dále děkuji ostatním pracovníkům Katedry Biochemických věd za pomoc a příjemné pracovní prostředí. Za podporu děkuji i svým rodičům.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....
Mgr. Kateřina Lokvencová

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 Zařazení ovce domácí (<i>Ovis ammon</i>)	11
3.2 Fyziologie trávicího systému ovce.....	11
3.2.1 Fyziologie předžaludku.....	12
3.2.2 Fyziologie pravého žaludku.....	13
3.2.3 Fyziologie dalších částí trávicího traktu	14
3.2.4 Ruminace (přežvýkování)	14
3.3 Nákaza vnitřními parazity u ovce domácí a vznik rezistence	14
3.3.1 Vlasovka slezová (<i>Haemonchus contortus</i>)	14
3.3.2 Rezistence <i>H. contortus</i> na anthelmintika	16
3.4 Ivermektin	20
3.4.1 Chemická struktura ivermektinu.....	20
3.4.2 Farmakodynamika ivermektinu	22
3.4.3 Farmakokinetika a metabolismus ivermektinu.....	22
3.5 Analytické přístupy.....	26
3.5.1 Příprava vzorků.....	27
3.5.2 Chromatografie	27
3.5.3 Hmotnostní spektrometrie	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 Zvířata	37
4.2 Reagencie a chemikálie	37
4.3 Přístrojové vybavení.....	38
4.4 Léčba ovcí ivermektinem	38
4.5 Extrakce ivermektinu z trusu.....	38
4.6 Příprava vzorku k LC/MS analýze	39
4.7 UHPLC/MS analýza.....	39

5.	VÝSLEDKY.....	42
5.1	Optimalizace metodiky	42
5.2	Farmakokinetika IVE v trusu.....	42
6.	DISKUZE	52
7.	ZÁVĚR	56
8.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	57
9.	POUŽITÁ LETERATURA.....	59

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Biochemických věd

Kandidát: Mgr. Kateřina Lokvencová

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

Název rigorózní práce: **Farmakokinetika ivermektinu v trusu ovce domácí**

Klíčová slova: Anthelmintika, ivermektin, ovce domácí, farmakokinetika, exkrece

Nákaza vnitřními parazity patří mezi nejčastější onemocnění u ovcí po celém světě a způsobuje významné ekonomické ztráty. Mezi obzvláště problematické zástupce patří hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*). Pro léčbu helmintóz se používají anthelmintika, která se rozdělují do několika tříd. Do třídy makrocyclických laktonů patří ivermektin (IVE), který je oblíbený hlavně pro široké spektrum účinnosti a nízkou toxicitu. Studium farmakokinetiky IVE je však obtížné, protože závisí na mnoha faktorech. Značná pozornost je zaměřena na eliminaci IVE, protože jeho rezidua v trusu mohou negativně ovlivňovat životní prostředí a podporovat tak vznik rezistence. Cílem této práce bylo studium eliminace IVE u ovce domácí, zejména studium exkrečního profilu. Skupině ovcí byl subkutánně aplikován IVE v dávce 0,2 mg/kg živé hmotnosti a následně byly odebrány vzorky trusu ve stanovených intervalech. K analýze vzorků byla použita ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Z výsledků vyplývá, že se eliminace IVE řídí kinetikou prvního řádu. Přestože se vyznačuje značnými interindividuálními rozdíly, trend křivky závislosti koncentrace IVE na čase je u všech ovcí podobný. Interindividuální rozdíly mohou pravděpodobně vznikat na základě fyziologických odlišností jednotlivých ovcí.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mgr. Kateřina Lokvencová

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

Title of Thesis: The pharmacokinetics of ivermectin in the feces of *Ovis ammon*

Keywords: Anthelmintics, ivermectin, sheep, pharmacokinetics, excretion

Infection with internal parasites is one of the most common diseases in sheep worldwide and causes significant economic losses. The nematode (*Haemonchus contortus*) is among to the particularly problematic representatives. Anthelmintics are used to treat helminthoses and they are divided into the several classes. The class of macrocyclic lactones includes ivermectin (IVE), which is especially popular for wide range of efficacy and low toxicity. However, the study of IVE pharmacokinetics is difficult, because it depends on many factors. Considerable attention is directed to the elimination of IVE, because its residuals in dung can adversely affect the environment and thus promote the emergence of resistance. The aim of this study was study of the elimination of IVE in sheep, especially the study of excretion profile. IVE (dose 0.2 mg/kg of body weight) was subcutaneously administered to sheep, followed by sampling of faeces at specified intervals. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) was used for analyze of the samples. The results show that the elimination of IVE is governed by first-order kinetics. The curve trend of dependence of the IVE concentration and time is similar for all sheep with characterized interindividual differences. The interindividual differences may occur on the based physiological differences of the individual sheep.

1. ÚVOD

Nákaza vnitřními parazity je jedním z nejvýznamnějších onemocnění postihující ovce po celém světě. Konkrétní druhy hlístic napadající ovce se liší podle regionu, protože důležitou roli pro životní cyklus hlístice a její transmise hrají klimatické podmínky. Jedním z nejvýznamnějších zástupců, který způsobuje u ovcí velké škody, je hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) (Pugh a Baird 2012).

Látky, které se používají k léčbě helmintóz, se nazývají anthelmintika a rozdělují se do několika skupin. Mezi nejdůležitější anthelmintika dnešní doby patří makrocyclické laktony (ML). ML se dělí do dvou skupin podle druhu plísně, ze které jsou extrahovány. Avermektiny (ivermektin, abamektin, doramektin a eprinomektin) jsou extrahovány z druhu *Streptomyces avermitilis*, zatímco milbemyciny (moxidektin) vznikají fermentací více druhů výše uvedené plísně (Vadlejch a Langrová 2014).

Jedním z nejdůležitějších zástupců ML je ivermektin (IVE). Ten byl na trh uveden již v roce 1981 a od té doby patří mezi nejběžněji používaná anthelmintika (Campbell 1989). Mezi výhodné vlastnosti IVE patří výrazný účinek proti endoparazitům i ektoparazitům, a to i ve velmi nízkých dávkách ($\mu\text{g}/\text{kg}$), což přispívá k jeho bezpečnosti napříč různými zvířecími druhy. Další výhodou je jeho vysoká účinnost proti širokému spektru různých druhů hlístic, včetně většiny larválních, dospělých i hypobiózních forem. Farmakokinetika IVE se však vyznačuje výraznými mezidruhovými rozdíly, což způsobuje problémy v její charakterizaci a vytváří potřebu dalších měření. Dalšími významnými faktory, které ji významně ovlivňují, jsou např.: velikost dávky, cesta podání, formulace léčiva, tělesná konstituce, věk a fyziologický stav organismu. Znalost farmakokinetiky IVE může být využita k předpovězení a optimalizaci antiparazitického účinku IVE, na základě čehož pak mohou být vytvořeny vhodné léčebné programy (González Canga et al. 2009; Molento et al. 2004; Cerkvenik et al. 2002). Úskalím při léčbě ML je fakt, že ML a jejich metabolity vylučované trusem mohou negativně ovlivňovat životní prostředí, zejména život některých členovců, přičemž mají i schopnost perzistovat ve vodě, sedimentu, půdě nebo potravních produktech (Bai a Ogbourne 2016; Vadlejch a Langrová 2014). Přestože anthelmintický účinek ML byl poměrně detailně prostudován, míra jejich vlivu na znečištění životního prostředí ještě není přesně známa. K dispozici jsou zatím velmi limitované informace o jejich koncentraci v přírodě, s ohledem na jejich časté a široké využití však existuje předpoklad, že budou ovlivňovat terestrické i vodní ekosystémy (Bártíková et al. 2016). Navíc bylo zjištěno, že

koncentrace IVE v trusu některých domácích zvířat může přesahovat hranici letální nebo subletální koncentrace pro mnoho bezobratlých živočichů živících se trusem (Lumaret a Errouissi 2002). Bylo např. demonstrováno, že IVE už při koncentraci 0,001 $\mu\text{g/g}$ mokré váhy trusu je toxický pro některé druhy hmyzu (Strong a James 1993). Existuje i předpoklad, že by ML mohly působit fyto toxicky, na toto téma však zatím nevzniklo mnoho studií a znalost této problematiky je velmi omezená (Bártíková et al. 2016). Je však jisté, že v některých rostlinách se vyvinul velmi sofistikovaný detoxikační systém včetně enzymů metabolizujících xenobiotika, přičemž některé se podobají těm lidským a zvířecím, ale existuje i několik enzymů metabolizujících xenobiotika, které jsou specifické jen pro rostliny. Rostliny jsou schopné absorbovat, transformovat léčiva na netoxické nebo méně toxické sloučeniny a uskladnit je ve vakuolách nebo buněčných stěnách. Tato schopnost může ochránit je samotné, ale i jiné organismy (Bártíková et al. 2015).

Výskyt potenciálně ekotoxického efektu IVE významně zvýšil zájem o objasnění osudu ML v trusu léčených zvířat. Pozornost byla zaměřena hlavně na studium škodlivosti ML a jejich metabolitů pro konkrétní živočišné i rostlinné druhy, množství aktivní látky vyloučené trusem, způsob exkrece těchto látek a stabilitu jejich ekotoxických reziduí (Lumaret a Errouissi 2002).

Dalším velkým problémem při léčbě ML, IVE nevyjímaje, je rozvoj rezistence, který snižuje produktivitu chovů a ohrožuje i úspěšnost léčby u lidí. Intenzivní a neregulované používání anthelmintik v chovatelství vedlo k tvorbě rozsáhlé rezistence na anthelmintika. Výrazně se problém rezistence, na všechny hlavní skupiny používaných léčiv, projevuje u hlístice *H. contortus*, kde došlo k rychlé selekci rezistentních jedinců (Fleming et al. 2006). Trusem vyloučený IVE by také mohl podporovat rozvoj rezistence helmintů, protože expozice nižších vývojových stadií parazitických helmintů subterapeutickým dávkám IVE a jeho metabolitů perzistujících v hnojivu a půdě by pravděpodobně mohla vytvářet vhodné prostředí pro tento proces (Wolstenholme et al. 2004).

2. CÍL PRÁCE

- 1) Sepsání literární rešerše, ve které bude zpracována problematika farmakokinetiky IVE u ovce domácí.
- 2) Zpracování vzorků trusu a jejich příprava pro hmotnostní spektrometrii.
- 3) Analýza vzorků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.
- 4) Optimalizace metodiky.
- 5) Vyhodnocení farmakokinetických parametrů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Zařazení ovce domácí (Ovis ammon)*

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: strunatci (Chordata)

Třída: savci (Mammalia)

Řád: sudokopytníci (Artiodactyla)

Podřád: přežvýkaví (Ruminantia)

Čeleď: turovití (Bovidae)

Podčeleď: kozy a ovce (Caprinae)

Rod: ovce (*Ovis*)

Druh: Argalí (*Ovis ammon*)

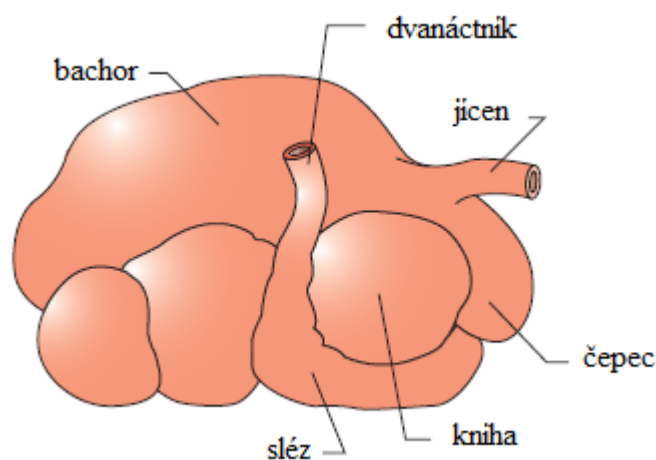
3.2 *Fyziologie trávicího systému ovce*

Trávicí trakt se u různých druhů živočichů významně liší. Jeho struktura odpovídá především tomu, zda se jedná o masožravce, býložravce nebo všežravce (Denbow a Akers 2013). Potrava býložravců je z velké části tvořena méně výživnými složkami, proto musí býložravci zkonzumovat mnohem větší množství potravy než masožravci. Významná část potravy je tvořena těžko štěpitelnými komplexními sacharidy, k jejichž degradaci je třeba důmyslnější trávicí systém než u masožravců (Colville a Bassert 2015). Proto mají býložraví přežvýkavci, mezi které patří i ovce domácí, složený žaludek. Ten se skládá z předžaludku a pravého žaludku slezu (abomasum). Předžaludek se dělí na tři oddíly, kterými jsou bachor (rumen), čepec (reticulum) a kniha (omasum) (Denbow a Akers 2013).

Mezi další výhody složeného žaludku patří schopnost využít i neproteinové zdroje dusíku, kterými jsou například močovina nebo kyselina močová. Činností mikrobů také vzniká komplex vitamínů B. Navzdory četným výhodám, představuje tento typ trávení i určité nevýhody. Přežvýkavci musí strávit značnou část dne přežvýkáváním, musí vyprodukovat velké množství alkalických slin a značné množství těkavých kyselin je uvolněno do okolí (Denbow a Akers 2013).

3.2.1 Fyziologie předžaludku

Ani přežvýkavci nedisponují takovým spektrem enzymů, aby dokázali rozložit všechny sacharidové složky. Mezi takto těžce štěpitelné sacharidy patří převážně ty, které tvoří strukturální části rostlin: celulóza, hemicelulóza a pektin (Colville a Bassert 2015). Proto je předžaludek přežvýkavců osídlen mikroby, kteří zajišťují rozklad těchto složek potravy (Denbow a Akers 2013). Předžaludek se nachází před vlastním žaludkem, je vystlán vrstevnatým rohovatějícím epitelem a neobsahuje žádné žlázy, které by produkovaly zaživací enzymy (Reece 2011). Každý z oddílů má svoji specifickou trávicí funkci, proto se liší jejich anatomické znaky (Colville a Bassert 2015).



Obrázek 1. Znárodnění stavby předžaludku a žaludku u přežvýkavců (Colville a Bassert 2015).

Nejobjemnější částí předžaludku u přežvýkavců je bachor. Od menšího čepce ho odděluje čepcobachorové ústí (Reece 2011). Jedná se o velký roztažitelný vak, který obsahuje mnoho mikroorganismů (bakterie, prvoci, houby). Zabírá většinu levé strany břišní dutiny, a když je plný, rozšiřuje se až k pánvi. Mukóza v bachoru je pokryta mnoha papilami, které zvětšují plochu potřebnou pro absorpci. Pomocí záhybů je rozdělen na dorsální, ventrální a dva kaudální vaky (Colville a Bassert 2015). Potrava je do bachoru přijímána přes nálevkovité česlo a bachorovou předsíň. Kontrakce dorzálního vaku posouvá potravu do čepce, odkud je pak vytlačován do česla a dále do ústní dutiny k přežvýkání. Potrava také může putovat do knihy čepcoknihovým otvorem (Reece 2011).

Čepce je lokalizován kraniálně od bachoru a napojuje se na jícn. Potrava se tedy dostává z jícnu do čepce (Denbow a Akers 2013). Obsah čepce může snadno vstupovat do bachoru nebo ho může snadno opouštět. Čepce a bachor tedy v podstatě jednají jako jedna funkční jednotka (Colville a Bassert 2015). Čepce je pumpou, která vyvolává pohyb

tekutiny z bachoru a zase zpět, díky čemuž je v bachoru zajištěna stálá vlhkost. Reguluje postup řídkého obsahu bachoru do knihy a vytlačuje bolus k česlu pro vyvržení a následnou ruminaci (Reece 2011).

Fermentací je označován anaerobní proces, při kterém bakterie a v menší míře i prvoci rozkládají savčími enzymy nerozložitelné složky potravy. Díky fermentaci získávají býložravci energii, která by se jiným způsobem získat nedala (Denbow a Akers 2013). Během fermentace jsou tedy komplexní sacharidy rozštěpeny na různé koncové produkty, například těkavé mastné kyseliny, které následně přežvýkavci absorbují a využijí pro tvorbu energie (Colville a Bassert 2015).

Knihy má ledvinovitý tvar a je umístěna na pravé straně břišní dutiny, propojuje předžaludek s pravým žaludkem. Obsahuje velké množství listů podobných záhybů s velkým povrchem, který je dále rozšířen pomocí mukózy s četnými papilami. Dochází zde k absorpci solí a vody. Potrava opouští knihu knihoslezovým ústím, přes který se dostává do vlastního žaludku (slezu) (Denbow a Akers 2013). Knihy vytváří podmínky pro další fermentaci a resorpci a reguluje transport potravy mezi čepcem a slezem (Reece 2011).

Předžaludek prochází třemi typy kontrakcí. Primární kontrakce zajišťují promíchávání jeho obsahu, díky čemuž dochází k separaci částic podle velikosti. Větší částice klesnou do spodních částí bachoru a menší částice zůstanou navrchu, aby se mohli posunout do knihy. Primární kontrakce dále zajišťují potřebnou sílu k přenesení natráveného bolusu do knihy. Druhý typ kontrakcí souvisí s procesem ruminace. Třetí typ kontrakcí je spojen s uvolňováním plynů (např. oxid uhličitý a metan), které vznikají při fermentaci (Colville a Bassert 2015).

3.2.2 Fyziologie pravého žaludku

Pravý žaludek funguje podobným způsobem jako žaludek monogastrických zvířat. Je pokryt žláznatým epitelem, jehož žlázy secernují pepsinogen, vodíkové a chloridové ionty. Přísun potravy do pravého žaludku je plynulý (Colville a Bassert 2015). Dochází zde k trávení zbytků fermentace, které se doposud neabsorbovaly. Jsou zde tráveni i mikrobi, kteří se namnožili v průběhu fermentace v předžaludku (Reece 2011).

3.2.3 Fyziologie dalších částí trávicího traktu

Další část trávicího systému tvoří tenké střevo, kde dochází k dalšímu promíchávání a propulzi střevního obsahu, trávení sacharidů, tuků, bílkovin a následné absorpci koncových produktů trávení. V tlustém střevě probíhá další bakteriální rozklad a zpětná absorpce elektrolytů a vody (Denbow a Akers 2013; Reece 2011). Kálení (defekace) je reflexně řízený proces. Frekvence se u různých druhů domácích zvířat liší (Reece 2011).

3.2.4 Ruminace (přežvykování)

Ruminace je děj, při kterém je potrava transportována z batoru zpět do dutiny ústní. Je tvořena čtyřmi fázemi: rejekcí (vyvržení sousta), remastikací (přežvykování sousta), prosliněním a opětovným spolknutím (Reece 2011).

Proces zažívání začíná klasicky. Přijatá potrava je rozžvýkána, promíchána se slinami a spolknuta (Colville a Bassert 2015). Dále je během pastvy skladována v batoru, kde dochází díky činnosti mikrobů k natrávení. Následně je bolus z předžaludku znovu vrácen do ústní dutiny, kde se opět promíchá se slinami a dalším přežvýkáním je ještě více rozrušen hrubý rostlinný materiál. Takto přežvýkaný bolus je opět polknut. Sliny u přežvýkavců jsou isotonické, obsahují vysokou koncentraci bikarbonátů a fosfátů a vykazují tedy zásadité pH. Díky tomu fungují jako pufr, který neutralizuje kyseliny vzniklé v batoru (Denbow a Akers 2013).

3.3 *Nákaza vnitřními parazity u ovce domácí a vznik rezistence*

3.3.1 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Říše: živočichové (Animalia)

Kmen: hlístice (Nematoda)

Třída: Secernentea

Řád: Strongylida

Čeleď: Trichostrongylidae

Rod: *Haemonchus*

Druh: *Haemonchus contortus*

Haemonchus je primárně parazitem tropických a subtropických regionů. Přesto se už ale dostal i do chladnějších regionů (např. Velká Británie, Kanada). *H. contortus*

parazituje na menších přežvýkavcích, hlavně ovcích a kozách, zatímco *H. placei* je ekvivalent pro hovězí dobytek. *H. contortus* významně snižuje produktivitu chovů, obzvláště v teplých a vlhkých regionech (Jacobs et al. 2015).

Většina hlístic *H. contortus* infikuje slez (abomasum) a způsobuje tím závažné klinické stavy zejména u mladých a rostoucích zvířat. Přestože dospělá zvířata mohou být také infikována, průběh u nich vzhledem k rozvinutému imunitnímu systému nebývá tak vážný (Pugh a Baird 2012).

Tento gastrointestinální parazit je nitkovitého tvaru a měří 1 až 3 cm (Jacobs et al. 2015). Žije ve slezu přežvýkavců a živí se jejich krví (Ballweber 2000). Nejvýraznější patogenní vliv mají larva ve čtvrtém stadiu (L4) a dospělý jedinec. V ústní kapsli má kyjovitý zub, který mu pomáhá narušovat cévu, odkud pak saje krev definitivního hostitele. Při rozsáhlé infekci může parazit způsobit potenciálně fatální hemoragickou anemii, a to zejména u jehňat a kůzlat (Jacobs et al. 2015). Jeden parazit může odsát svému hostiteli až 50 µl krve denně, což při průměrné intenzitě infekce 5 000 parazitů vede k úbytku 250 ml krve (Vadlejch a Langrová 2014).

Samičky jsou pruhované, protože jejich střevo je naplněné krví hostitele a je propleteno s bíle zbarveným pohlavním ústrojím (Jacobs et al. 2015). Samičky jsou velmi plodné, nakladou až 10 000 vajíček za den, což velmi ovlivňuje epizootologii hemonchózy, protože trusem vyloučená vajíčka se dostanou do okolního prostředí a po přeměně do konkrétního larválního stadia jsou schopná nakazit další zvířata (Vadlejch a Langrová 2014).



Obrázek 2. Samička *H. contortus* – tmavě zbarvené střevo naplněné krví se stáčí okolo vajíčky naplněného pohlavního ústrojí (Jacobs et al. 2015).

Vývoj parazita je přímý, bez mezihostitele a závisí na okolních klimatických podmínkách. Vajíčka jsou přenášena trusem. Pokud mají vajíčka dostatek tepla a vlhkosti, vyvinou se nejprve do prvního larválního stadia (L1), následně do druhého larválního stadia (L2), přičemž vývoj pokračuje do třetího larválního stadia (L3). Až třetí larvální stadium je pro zvířata infekční. L3 se vyskytuje na pastvinách, kde je zvířaty spásán spolu s potravou. S ohledem na klimatické podmínky může L3 na pastvině přezimovat a být částečně zodpovědný za infekci příští jaro. Infekční larvy L3 migrují do slezu, kde se zavrtávají do sliznice a transformují se ve čtvrté stadium (L4), z něhož se následně vyvine dospělý jedinec schopný rozmnožování (Ballweber 2000).

3.3.2 Rezistence *H. contortus* na anthelmintika

Rezistence se objevuje tehdy, když je u původně citlivé populace prokázán pokles odpovědi na léčbu a je kompletní, když maximální dávka léčiva ještě tolerovaná hostitelem už nemá žádný efekt (James et al. 2009).

V Brazílii ve státě Paraná byl v letech 1996 až 2000 na 42 ovčích farmách proveden test na rezistenci helmintů na nejběžnější anthelmintika. Bylo zkoumáno pět léčiv a to samostatně i v kombinaci – IVE, oxfendazol, imidazothiazol, moxidectin a klosantel. Výsledky ukázaly, že prevalence rezistence na všechna anthelmintika je vysoká: 88,1 % pro oxfendazol, 78,6 % pro IVE, 56,4 % pro klosantel, 38 % pro levamisol a 23,6 % pro moxidectin. Na všech testovaných farmách se objevila mnohočetná léková rezistence. Nejvýznamnějšími parazity zde byli *H. contortus* a *Trichostrongylus colubriformis* (Thomaz-Soccol et al. 2004).

Pro úspěšné řešení rezistence je nezbytné pochopit mechanismus rozvoje rezistence. Jedině tak mohou být vyvinuty alternativní léčebné strategie. Díky tomu bude možno prodloužit účinnost současně podávaných anthelmintik a najít markery pro monitorování lékové rezistence, případně syntetizovat nová účinná léčiva. Změny genů nebo jejich exprese, jako reakce helminta na přítomnost léčiva, umožňují helmintovi přežít léčbu. Tyto změny pravděpodobně představují evoluční mechanismus, pomocí kterého se helmint přizpůsobuje toxickému prostředí (James et al. 2009). Často je jedná o nárůst počtu „rezistentních“ alel, které jsou výsledkem selekce při opakovaném používání anthelmintik (Fleming et al. 2006).

Rezistence může vzniknout dvěma způsoby, buď je zděděna, nebo postupně vytvořena u původně citlivého parazita pod tlakem léčby. Tyto změny mohou mít

genetický (mutace, delece, amplifikace genů) nebo epigenetický (metylace) původ. Léková rezistence může být u helmintů vytvořena podobnými mechanismy jako u bakterií, prvků a nádorových buněk. Opakované a neregulované působení anthelmintik tedy může vést k tvorbě vysoce rezistentních kmenů (James et al. 2009).

3.3.2.1 Mechanismy vzniku rezistence u helmintů

3.3.2.1.1 Genetické změny v cílových místech léčiva

V buňkách helmintů může docházet k alteraci cílových molekul pro léčivo, které souvisejí se změnami v genové sekvenci. Bylo popsáno několik bodových polymorfismů spojených s rezistencí. Přičemž bodové polymorfismy vytváří unikátní genetické odlišnosti mezi jedinci a jsou základem genetické rozmanitosti v populaci. Bodové polymorfismy mohou vzniknout mutací genů způsobenou působením léčiva. Jediná změna nukleotidu může vést k substituci aminokyseliny v proteinu cílové molekuly působení léčiva, a tím změnit afinitu léčiva pro cílové místo. Taková změna ovlivňuje odpověď na léčivo a může způsobovat nižší účinnost léčiva (James et al. 2009). Například mutace extracelulární domény glutamát-chloridových kanálů (GluCl) u *H. contortus* byla asociována se vznikem rezistence (Blackhall et al. 1998). Také se zjistilo, že makrocyclický lakton, IVE, aktivuje GluCl u *Caenorhabditis elegans*. Avšak v testech u *C. elegans* se ukázalo, že jednotlivá mutace není dostatečná k vyvolání rezistence a je třeba mnohonásobně více mutací na podjednotkách GluCl, aby se vytvořila rezistence (Dent et al. 2000). Z toho pravděpodobně vyplývá, že jediný bodový polymorfismus není dostatečný k vyvolání rezistence. Je tedy pravděpodobné, že i když mnoho bodových polymorfismů bylo asociováno se vznikem rezistence, v některých případech mohl být tento výsledek náhodný a je potřeba vynaložit ještě více úsilí, aby toto tvrzení bylo ověřeno (James et al. 2009).

3.3.2.1.2 Ovlivnění transportu léčiva

Rezistence na různá léčiva je často způsobena expresí membránového proteinu označovaného jako P-glykoprotein (P-gp), který exportuje některá léčiva z buňky, čímž dochází k poklesu jejich intracelulární koncentrace, čímž je snížen jejich účinek (Skálová et al. 2011). I u několika anthelmintik (IVE, benzimidazoly a imidazothiazoly) byl popsán transport prostřednictvím P-gp, z čehož by mohlo vyplývat, že tento efluxní mechanismus funguje i u rezistentních helmintů, kteří obsahují funkčně podobné transportní proteiny. P-gp patří do skupiny ABC transportních proteinů. Role ABC transportních proteinů

v souvislosti s lékovou rezistencí však zatím nebyla u helmintů příliš charakterizována. Avšak bylo zjištěno, že v případech, kdy se rezistence u helmintů objevila, byla současně popsána i přítomnost ABC transportních proteinů a v některých případech existují důkazy pro jejich spojitost s rezistencí (James et al. 2009). V případě *H. contortus* se mnohočetná léková rezistence (multi-drug resistance, MDR) například objevila společně se zvýšením exprese mRNA pro P-gp u IVE -rezistentních jedinců (Smith a Prichard 2002). Je důležité ověřit vliv ABC proteinových transportérů pro vznik MDR, protože existuje mnoho inhibitorů těchto transportérů, které by mohly poskytnout účinný prostředek pro překonání rezistence (James et al. 2009).

3.3.2.1.3 *Metabolismus léčiva*

Konstantní vliv toxických látek z okolí vedl k rozvoji buněčných mechanismů, které umožňují buňce vyhnout se efektu těchto sloučenin. Kromě efluxních pump si buňky dále vytvořily detoxikační systémy, které přeměňují pro buňku škodlivá xenobiotika na méně toxické látky. Zpočátku jsou toxiny oxidovány, redukovány nebo hydrolyzovány cytochromem P450. Tím je u nich vytvořena reaktivní funkční skupina, která pak dále může být konjugována s glutathionem, glukuronovou kyselinou nebo glukózou. Tyto chemicky modifikované toxiny jsou pak eliminovány z buňky speciální pumpou z rodiny ABC transportních proteinů (Skálová et al. 2011). U některých anthelmintik se prokázalo, že jsou pomocí těchto enzymů metabolizovány. Kerboeuf a Aycardi (1999) zjistili, že přidáním inhibitoru syntézy glutathionu je zvýšena citlivost rezistentních helmintů *H. contortus* na thiabendazol, z čehož by mohlo vyplývat, že glutathion je potřebný pro mechanismus rezistence na benzimidazoly. Dalším důležitým redoxním systémem je thioredoxinový systém, který má stejně jako glutathionový systém redukční schopnosti a podílí se na vylučování volných radikálů a ochraně proti oxidativnímu poškození. Protože helminti mají v dospělém stadiu nízkou expresi cytochromu P450, představuje pro ně glutathionový a thioredoxinový systém nezbytný mechanismus pro vylučování volných radikálů (James et al. 2009). Byla zjištěna zvýšená exprese několika thioredoxinů u IVE ovlivněných jedinců *H. contortus*, z čehož by mohlo vyplývat, že thioredoxinový systém je zahrnut do mechanismů rezistence u těchto helmintů (Sotirchos et al. 2008). *In vitro* a *ex vivo* studie zkoumající biotransformaci IVE u *H. contortus* však ukazují, že tento parazit nevytváří žádné metabolity IVE, z čehož vyplývá, že *H. contortus* není schopen deaktivovat IVE

biotransformací a že biotransformace nepřispívá k rozvoji jeho rezistence na IVE (Vokřál et al. 2013).

3.3.2.2 Léčebné a kontrolní programy

Z klinického hlediska je důležité si uvědomit, že rezistence sice vzniká na genetickém podkladě, ale fenotypově se projeví až když frekvence „rezistentních“ alel dosáhne docela vysoké úrovně. Prevence vzniku rezistence by tedy měla být zacílena na snížení míry akumulace „rezistentních“ alel (Fleming et al. 2006). Původně byly kontrolní programy založeny na pravidelném odčervení všech zvířat ve stádě. Určité množství parazitů však odčervení přežilo a ti se pak stali rezistentními. Tento typ programu se tedy neosvědčil.

Infekce hlísticemi není v populaci zvířat distribuována rovnoměrně; pouze přibližně 30 až 35 % zvířat v sobě přechovává většinu hlístic. Vajíčka hlístic v trusu těchto infikovaných zvířat pak způsobují kontaminaci pastvin (Pugh a Baird 2012). Z tohoto důvodu se pro zachování citlivosti helmintů na anthelmintika osvědčilo vytvoření tzv. refugia. Refugium označuje část populace parazitů, která nebyla vystavena působení anthelmintického léčiva. Jsou to tedy parazité, u kterých nemohlo dojít k rozvoji rezistence, protože se nacházejí ve zvířatech, která nebyla léčena anthelmintikem. Abychom dosáhli tohoto efektu, je nezbytné ponechat některá zvířata ve stádu neléčená (Fleming et al. 2006). Tento požadavek vyžaduje změnu léčebné metody směrem k cílené selektivní léčbě. Při takové léčbě jsou odčervena pouze ta zvířata, u kterých je infekce jasně diagnostikována, přičemž ostatní zvířata ze stáda léčena nejsou. Tento přístup pomůže zajistit dostatečné množství nerezistentních helmintů, protože část zvířat ze stáda není léčena, tudíž jejich helminté nejsou léčbou ovlivněni. Nerezistentní helminté jsou pak na pastvinách udržováni, aby „zředili“ „rezistentní“ alely léčbou ovlivněných helmintů (Wolstenholme et al. 2004).

Důležitým faktorem je také nastavení správných dávek anthelmintika. Pokud jsou zvoleny příliš nízké dávky léčiva, zvýší se pravděpodobnost, že částečně rezistentní helminti léčbu přežijí. Preferenční přežití heterozygotně rezistentních parazitů zase zvýší pravděpodobnost jejich vzájemného rozmnožení, což může dále vést k tvorbě homozygotní plně rezistentní formy parazita. Z toho vyplývá, že anthelmintika by měla být podávána takovým způsobem, aby bylo zaručeno zničení i částečně rezistentních parazitů (Fleming et al. 2006). Důležitá je i míra rezistence. Například u rezistence na

benzimidazoly se zjistilo, že není zděděna prostřednictvím zcela dominantní nebo zcela recesivní alely (Dobson et al. 1996). Heterozygotní parazité tak nejsou zcela rezistentní, tváří v tvář léčivu však mají oproti ostatním parazitům bez této „rezistentní“ alely výhodu, díky níž léčbu přežijí s vyšší pravděpodobností, obzvláště jsou-li koncentrace léčiva suboptimální. Navíc se předpokládá, že rezistence na IVE má multigenní povahu a za parazitární rezistenci je tedy zodpovědná množina hned několika alel. U parazitů s těmito „rezistentními“ alelami je tak sice zachována určitá citlivost na anthelmintikum, ale zároveň jsou schopni tolerovat vyšší dávky léčiva než ti parazité, kteří tyto „rezistentní“ alely nemají (Fleming et al. 2006). Tuto teorii potvrzuje experiment, při kterém byly ovcím nakaženým vysoce rezistentním kmenem *H. contortus* podávány subkutánně nebo intraruminálně různé dávky IVE (0,2 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg). Jednotliví parazité reagovali na léčbu různě. Někteří byli usmrceni již terapeutickou dávkou, jiní ji přežili a usmrtila je až dávka několikanásobně vyšší. Někteří dokonce přežili i působení dávky 2 mg/kg (Alvarez et al. 2015).

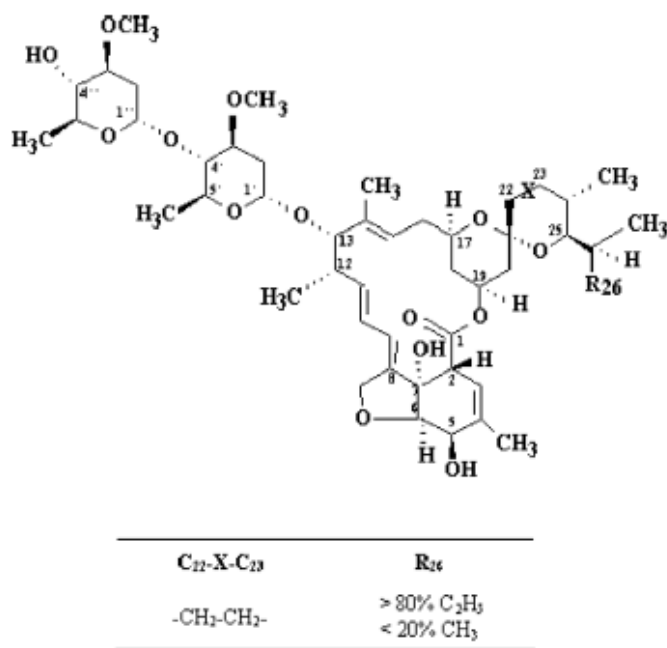
3.4 Ivermektin

3.4.1 Chemická struktura ivermektinu

Molekulární vzorec: $C_{48}H_{74}O_{14}$

Molekulární hmotnost: 875.106 g/mol

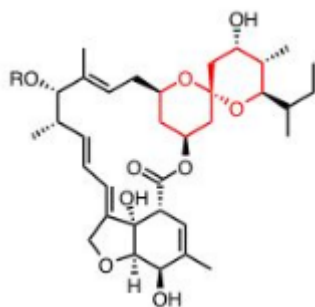
IVE je semisyntetickým derivátem nejdůležitějšího přirozeně produkovaného avermektinu – avermektinu B1 (abamektinu), ze kterého vzniká hydrogenací dvojná vazba mezi C_{22} a C_{23} . Jedná se o směs 22,23-dihydro-avermektinu B1a (nejméně 80 %) a 22,23-dihydro-avermektinu B1b (méně než 20 %) (Danaher et al. 2006). Při podrobnějším pohledu na názvosloví „B“ znamená, že v C_5 avermektinu je navázána hydroxylová skupina, „1“ pak vyjadřuje přítomnost dvojná vazby mezi C_{22} a C_{23} příslušného avermektinu, „a“ popisuje vazbu sekundárního butylu v C_{25} a „b“ vazbu isopropylu v C_{25} (Rew a Vercruyse 2002). Hydrogenace dvojná vazby mezi C_{22} a C_{23} udržuje molekulu IVE v židličkové konformaci, která je typická pro rodinu avermektinů B2. Díky všem těmto vlastnostem má IVE jak výbornou antiparazitickou aktivitu (typickou pro B1 avermektiny), tak i nízkou toxicitu (typickou pro B2 avermektiny) (Danaher et al. 2006).



Obrázek 3. Chemická struktura IVE (González Canga et al. 2009).

Jedná se o vysoce lipofilní látku, která je rozpustná ve většině organických rozpouštědel, ve vodě je však prakticky nerozpustná. Proto se IVE rychle transportuje přes biologické membrány (Dostálek et al. 2006; González Canga et al. 2009).

IVE obsahuje ve své molekule jedinečný farmakofor, který zodpovídá za jeho biologickou aktivitu. Tento farmakofor skládající se z 16 členné makrocyclické kostry, ke které jsou navázány benzofuran a spiroketal, vytváří unikátní trojrozměrnou strukturu, která se specificky váže na receptor konkrétních chloridových kanálů. Tento farmakofor je zodpovědný za mechanismus účinku IVE a jemu příbuzných látek, který charakterizuje tuto lékovou skupinu (Rew a Vercruysse 2002).



Obrázek 4. Chemická struktura spiroketalu (avermectin A1a) (Rew a Vercruysse 2002).

Stejný farmakofor obsahují ve své molekule i milbemyciny, liší se však některými substituenty, navíc avermektiny obsahují ve své molekule i disacharid na C₁₃, který u milbemycinů chybí (Rew a Vercruysse 2002).

3.4.2 Farmakodynamika ivermektinu

IVE se selektivně a s vysokou afinitou váže na glutamát-chloridové kanály (GluCl) svalových a nervových buněk, které jsou specifické pro bezobratlé živočichy. Ty následně otvírá a tím způsobuje hyperpolarizaci buněk. Hyperpolarizace následně vede k paralýze a smrti zasažených parazitů (James et al. 2009; Vadlejš a Langrová 2014).

IVE navíc pravděpodobně ovlivňuje GABA-receptorové chloridové kanály, což nejspíš přispívá k jeho celkovému antiparazitickému efektu (Rew a Vercruyssen 2002).

Pro efektivnost většiny anthelmintik je důležitá doba kontaktu mezi léčivem a helmintem. K zajištění dostatečně dlouhého kontaktu léčiva s helmintem je nutné zajistit, aby se k helmintovi dostalo dostatečné množství léčiva (Fleming et al. 2006).

3.4.3 Farmakokinetika a metabolismus ivermektinu

Obecně je farmakokinetika IVE charakterizována pomalou absorpcí, širokou distribucí, malým metabolismem a pomalou exkrecí (González Canga et al. 2009).

3.4.3.1 Absorpce

Na absorpci můžeme nahlížet z hlediska jejího rozsahu nebo její rychlosti. Oba parametry mají důležitý vliv na rychlost nástupu, délku trvání i celkový účinek podaného léčiva. Rozsahem absorpce rozumíme množství léčiva, které se dostane do systémové cirkulace a je definován biologickou dostupností. Biologická dostupnost léčiva se vyjadřuje jako plocha pod koncentrační křivkou léčiva v krvi (AUC). AUC je přímo úměrná celkovému množství léčiva v organismu a závisí na dávce léčiva, nikoliv na rychlosti, se kterou léčivo do organismu vstupuje (Dostálek et al. 2006).

Absorpce IVE závisí mimo jiné na cestě podání a formulaci přípravku. IVE bývá podáván různými způsoby: orálně, intramuskulárně, intraruminálně, subkutánně nebo topicky, záleží na druhu zvířete (González Canga et al. 2009; Rew a Vercruyssen 2002).

Faktory, které ovlivňují biologickou dostupnost extravaskulárně podávaného léčiva jsou: neúplná absorpce léčiva nebo presystémová eliminace. Tyto faktory snižují hodnotu AUC po extravaskulárním podání v porovnání s hodnotou AUC po intravenózní aplikaci, která je maximální (Dostálek et al. 2006).

Nejvyšší biologické dostupnosti je dosaženo po subkutánním podání, následuje podání orální a topické (González Canga et al. 2009; Rew a Vercruyssen 2002). Pokud je IVE podán orálně, téměř úplně (97 - 99 %) asociuje s částicemi tráveniny a jeho absorpce

je tím výrazně snížena. Vytváří komplex léčivo-trávenina, který není přímo přístupný pro absorpci hostitelem nebo parazitem, ale spíš funguje jako jakýsi rezervoár pro uvolňování léčiva do okolní tekutiny (Rew a Vercruyssen 2002). Intraruminální podání vede také k nižší systémové dostupnosti (Benz et al. 1989).

Alvarez et al. (2015) zkoumali biologickou dostupnost IVE po subkutánním podání u jehňat. U léčených jehňat narůstala se zvyšující se dávkou i hodnota $AUC_{(IVE)}$. Hodnota $AUC_{(IVE)}$ byla v tomto případě vztažena na časový interval 0 až 14 dní ($AUC_{(IVE)0-LOQ}$). Hodnoty $AUC_{(IVE)0-LOQ}$ stoupaly u dávek 0,2 mg/kg; 1 mg/kg a 2 mg/kg od 41,9 ng.den/ml, přes 221 ng.den/ml až k 287 ng.den/ml. ($AUC_{(IVE)0-LOQ}$) byla u dávek 1 mg/kg a 2 mg/kg signifikantně vyšší v porovnání s dávkou 0,2 mg/kg. Avšak hodnoty ($AUC_{(IVE)0-LOQ}$) mezi dávkami 1 mg/kg a 2 mg/kg se signifikantně nelišily. Tento rozporný jev je vysvětlen porovnáním hodnot $AUC_{(IVE)0-LOQ}$ s hodnotami $AUC_{(IVE)}$ extrapolovanými na nekonečno ($AUC_{(IVE)0-\infty}$). Hodnoty $AUC_{(IVE)0-LOQ}$ u dávky 1 mg/kg představují 80% hodnoty její $AUC_{(IVE)0-\infty}$, přičemž hodnota $AUC_{(IVE)0-LOQ}$ pro dávku 2 mg/kg představuje pouze 70 % její $AUC_{(IVE)0-\infty}$. Z toho vyplývá, že časový interval odebrání vzorků 0 - 14 dní nebyl u dávky 2 mg/kg dostatečně dlouhý pro správnou charakteristiku relativní plazmatické biodostupnosti IVM po subkutánním podání. Neznamena to tedy, že by se farmakokinetika IVE odchylovala od dávkové proporcionality.

Injekční depotní podání má však i určitá úskalí. Díky pozvolnému uvolňování IVE z depa sice dochází k prodloužení přítomnosti léčiva v krvi, avšak kromě terapeutické koncentrace je vlivem postupného uvolňování prodloužena i přítomnost subterapeutické koncentrace. Prodloužení doby působení nižších koncentrací léčiva je pak ideálním stavem pro tvorbu rezistence (Fleming et al. 2006).

Rychlost absorpce vyjadřuje, jak rychle je léčivo z místa podání vstřebáno do systémové cirkulace. Mírou rychlosti absorpce je absorpční konstanta, jenž je vyjádřena jako změna koncentrace léčiva za jednotku času (dc/dt). Rychlost absorpce může být ovlivněna koncentrací léčiva v místě aplikace, pak se jedná o absorpci podle prvního řádu. Pokud není rychlost absorpce závislá na koncentraci v místě aplikace, mluvíme o absorpci podle nultého řádu (Dostálek et al. 2006). Absorpce IVE po subkutánním podání je pomalejší ve srovnání s orální aplikací. IVE je totiž extrémně špatně rozpustný ve vodě a precipituje v podkožní tkáni, což způsobuje jeho pomalou absorpci z místa aplikace a delší setrvání v krevním oběhu (González Canga et al. 2009).

Absorpce při subkutánním podání je výraznější a rychlejší u vodného vehikula v porovnání s vehikulem propylenglykol:glycerolfomal (60:40 v/v), biologický poločas je také delší, díky tomu dochází k prodloužení klinického efektu (González Canga et al. 2009; Lifschitz et al. 1999; Lo et al. 1985). Po intravenózním podání se obecný biologický poločas IVE pohybuje v rozmezí 32 – 64 hodin. Přestože je dávkování u prasat (300 µg/kg) vyšší než u skotu (200 µg/kg), kratší biologický poločas způsobuje přibližně třetinové hodnoty $c_{\max(\text{IVE})}$ a $\text{AUC}_{(\text{IVE})}$ než u skotu. To může být způsobeno pomalejším posouváním tráveniny u přežvýkavců v porovnání s monogastričnými zvířaty, pomaleji se pohybující trávenina přežvýkavců vytváří vhodnější podmínky pro opakované vstřebání IVE a tedy tzv. recyklaci léčiva (Rew a Vercruyse 2002).

Protože IVE patří mezi substráty P-gp, jeho absorpce ze střeva je ovlivněna aktivitou tohoto efluxního transportéru. U léčby ovcí IVE v kombinaci s verapamilem došlo k nárůstu $c_{\max(\text{IVE})}$ v porovnání s hodnotou $c_{\max(\text{IVE})}$ u ovcí, jenž byly léčeny pouze IVE. K tomuto efektu dochází díky zvýšené absorpci IVE na základě kompetitivní inhibice střevního P-gp verapamilem (Molento et al. 2004). Aktivita P-gp tedy redukuje distribuci IVE do tkání i jeho biodostupnost a spíše podporuje jeho eliminaci. Omezuje také prostup IVE do potenciálně citlivých oblastí, jako je centrální nervový systém. Druhy zvířat se sníženou aktivitou P-gp vykazují vyšší biodostupnost IVE po orálním podání a v centrálním nervovém systému se u nich akumulují vyšší hladiny tohoto léčiva (Danaher et al. 2006).

3.4.3.2 Distribuce

Distribuce je proces, během něhož přestupuje léčivo ze systémového řečiště do tkání a orgánů. Díky svým vysoce lipofilním vlastnostem je IVE v těle široce distribuován a vyznačuje se velkým distribučním objemem (V_D). $V_{D(\text{IVE})}$ popisuje vztah mezi množstvím IVE v organismu a jeho koncentrací v plazmě. Jedná se o hypotetický objem tekutiny, ve kterém by IVE po rovnoměrném rozpuštění dosáhl stejné koncentrace jako je jeho koncentrace v plazmě. Jednotkou je litr nebo litr na kilogram tělesné hmotnosti. Distribuce léčiva v organismu nezávisí pouze na lipofilitě léčiva, ale odvíjí se také od celkového množství tuku v organismus a od jeho lokalizace. IVE má tendenci kumulovat se v tukové tkáni, která se následně chová jako rezervoár léčiva (Dostálek et al. 2006; González Canga et al. 2009). Nejvyšší hladiny IVE se proto nacházejí v játrech a tukové tkáni, nižší ve svalové tkáni a nejnižší pak v mozku (Chiu et al. 1990).

Mezidruhové rozdíly v $V_{D(IVE)}$ mohou významně ovlivnit $AUC_{(IVE)}$ a $c_{max(IVE)}$. Například prasata mají významně nižší hodnoty $AUC_{(IVE)}$ a $c_{max(IVE)}$ než skot a ovce, jedním z důvodů může být i větší $V_{D(IVE)}$. Důvodem většího $V_{D(IVE)}$ u prasat je více než dvojnásobek poměru tělesného tuku k celkové váze u prasat než u skotu. V_D u prasat je 6,6 l/kg, zatímco skot má V_D 2,2 l/kg. Dalším faktorem pro nižší $AUC_{(IVE)}$ a $c_{max(IVE)}$ u prasat je pravděpodobně jejich rychlejší metabolismus IVE v porovnání se skotem (Rew a Vercruysse 2002). Craven et al. (2001) potvrdili vliv množství tělesného tuku na farmakokinetiku ML, když zjistili, že u prasat s nižším obsahem tělesného tuku dochází oproti prasatům s vysokým obsahem tělesného tuku k výraznému zkrácení eliminačního poločasu ML.

Jednou z překážek distribuce IVE je vazba na plazmatický albumin a lipoproteiny. To má význam zvláště u podvyživených zvířat nebo zvířat s chorobou, která snižuje množství plazmatických proteinů, protože právě u nich se zvýší volná frakce IVE v plazmě (González Canga et al. 2009).

3.4.3.3 *Eliminace*

Eliminace zahrnuje dva farmakokinetické procesy: biotransformaci (metabolické reakce) a exkreci. Čas nutný k tomu, aby se plazmatická koncentrace léčiva snížila na polovinu jeho počáteční hodnoty, nazýváme poločas eliminace. Jeho jednotkou je hodina. Čím delší je poločas eliminace daného léčiva, tím větší je jeho V_D . Míru rychlosti eliminace léčiva z organismu popisuje eliminační konstanta, která je vyjádřena změnou koncentrace v závislosti na čase (dc/dt). Eliminace probíhá kinetikou prvního řádu, tzn. že rychlost poklesu koncentrace léčiva se vždy projeví nejvíce na začátku, kdy se v distribučním prostoru nachází plná dávka podaného léčiva. Postupně se pak rychlost eliminace léčiva, které postupně ubývá z distribučního prostoru, snižuje (Dostálek et al. 2006).

3.4.3.3.1 *Metabolismus*

IVE je jen málo metabolizován, většina IVE se vylučuje nezměněná, přičemž i rezidua ve tkáních se vyskytují hlavně ve formě mateřského léčiva (Campbell 1989). Hlavními metabolity izolovanými *in vivo* u ovce a skotu jsou jeho hydroxylované deriváty v poloze C_{24} (Chiu et al. 1990; Danaher et al. 2006).

Kromě těchto hlavních metabolitů bylo u ovcí nalezeno i menší množství dalších metabolitů a to metabolitů první i druhé fáze biotransformace. V první fázi

biotransformace podléhá molekula IVE hydroxylaci, demethylaci nebo kombinaci obou těchto procesů. V druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a kyselinou sírovou. Celkově bylo nalezeno sedm různých metabolitů první fáze a devět metabolitů druhé fáze (Vokřál et al. 2013).

3.4.3.3.2 Exkrece

Exkrece je proces, kterým jsou z těla vylučovány mateřské látky nebo jejich metabolity. IVE je eliminován hlavně trusem a to u všech druhů bez ohledu na cestu podání. Fekální exkrece představuje 90 % podané dávky, močí se vylučují méně než 2 % (Campbell 1989). Do střeva se IVE vylučuje převážně žlučí. Bogan a McKellar (1988) našli vysoké koncentrace IVE ve žluči při pitvě ovcí a skotu. Značná část IVE se recykluje enterohepatálním oběhem. Exkrece IVE do žluči je ovlivněna aktivitou P-gp. Ten je exprimován v játrech na apikální membráně lemující žlučové kanálky, kde se účastní transmembránového transportu. Verapamil mění na základě kompetitivní inhibice P-gp farmakokinetiku IVE snížením jeho vylučování do žluči, čímž je snížena jeho clearance. P-gp může mít vliv i na proces intestinální eliminace IVE (Molento et al. 2004).

IVE se také díky své vysoké lipofilitě vylučuje do mléka u laktujících krav, ovcí a koz. V experimentu, kam bylo zařazeno šest ovcí produkujících mléko, kterým byla subkutánně aplikována dávka 0,2 mg/kg IVE, se zjistilo, že koncentrace IVE v mléce vykazuje značnou variabilitu mezi jednotlivými ovcemi. Dále také, že průběh křivky popisující závislost koncentrace IVE v mléce na čase odpovídal průběhu křivky závislosti koncentrace IVE na čase v plazmě. Do mléka se vyloučilo průměrně 0,7 % podané dávky (Cerkvenik et al. 2002).

Exkrece je také ovlivněna formulací a je u skotu pomalejší u nevodných subkutánních roztoků v porovnání se subkutánními roztoky vodnými. Retence IVE v těle je zvyšována pomalou absorpcí z místa injekční aplikace (González Canga et al. 2009).

3.5 Analytické přístupy

Každé léčivo má specifické farmakokinetické vlastnosti. Abychom mohli tyto vlastnosti sledovat, musela být vyvinuta a validována řada analytických metod. Tyto metody většinou zahrnují přípravu vzorků, separaci léčiva a jeho metabolitů od interferujících endogenních sloučenin a následně detekci analytů. Už z chemické struktury léčiva je mnohdy možné předpovědět pravděpodobné chování léčiva při transferu přes různé biologické membrány a mezi různými tělními kompartmenty. Také

lze mnohdy z jeho struktury přibližně odhadnout strukturu metabolitů, které vznikají během první a druhé fáze biotransformace. Všechny tyto informace nám mohou pomoci při výběru vhodné metody přípravy vzorků, volbě vhodné instrumentální separační techniky a detekce (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008).

3.5.1 Příprava vzorků

Důležitým předpokladem pro přesnou analýzu je vhodný výběr metody přípravy vzorků. Kapalné vzorky (krev, moč, žluč) se analyzují poměrně snadno, avšak u pevných vzorků (výkaly, tkáně) bývá postup náročnější. Pevné vzorky obvykle musí být homogenizovány ve vhodném médiu (např. fosfátovém pufru).

Dalším úskalím je separace zkoumaného analytu od endogenních makromolekul v biologické matrici. Toho se obvykle docílí extrakcí zkoumaných analytů do vhodného roztoku, který obsahuje už jen minimální množství endogenních sloučenin. K tomuto účelu se využívá mnoho procesů, které pomáhají zvýšit výtěžnost finální extrakce zkoumaného analytu ze vzorku. Mezi tyto metody patří např. filtrace, centrifugace, derivatizace, odpařování rozpouštědla a úprava pH rozpouštědla (Nobilis et al. 2004).

Extrakce léčiva, jeho metabolitů a vnitřního standardu je obvykle závěrečnou fází procesu přípravy vzorků, která umožňuje zakoncentrování analytů do malého objemu před instrumentální analýzou. Nejčastěji se využívá extrakce kapalina-kapalina, extrakce na pevné fázi, mikroextrakce na pevné fázi, superkritická fluidní extrakce a specifická extrakce využívající molekulárně vtištěné polymery (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008).

3.5.2 Chromatografie

Pro separaci léčiv se velmi často používají chromatografické metody, které umožňují zkoumání samotných léčiv i jejich metabolitů první a druhé fáze biotransformace. Tyto metody jsou využitelné jak z kvantitativního, tak i z kvalitativního hlediska.

Chromatografická analýza využívá systém dělení zkoumaných analytů mezi pevnou stacionární fází a pohyblivou mobilní fází. Během chromatografické separace dochází k postupné a opakované tvorbě rovnovážných stavů analyzovaných látek mezi stacionární fází a mobilní fází, která s sebou nese dělené látky (Klimeš et al. 2011).

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina, která se výrazným způsobem podílí na separaci analyzovaných látek. Lze využít různé principy separace: adsorpce, rozdílná rozpustnost, iontová výměna, molekulově síťový efekt, rozdílná afinita.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) dosahuje své vyšší účinnosti využitím stacionárních fází, které jsou tvořeny malými částicemi pravidelného tvaru a stejné velikosti. Tyto částice vyplňují kolonu stejnorodým způsobem. Průtok mobilní fáze je proveden vysokým tlakem (Mendelova univerzita 2017b).

Srdcem HPLC je kolona, kde probíhá separace látek. Mobilní fáze je určitým tlakem pumpována do kolony ze zásobníků mobilní fáze skrz injektor a protéká kolonou až k detektoru. Vzorek rozpuštěný v mobilní fázi nebo podobném rozpouštědle je vstříkovan do tekoucí mobilní fáze v koloně, protéká kolonou a dochází k jeho separaci na jednotlivé složky v závislosti na typu kolony. Rozdělené složky jsou mobilní fází dále unášeny k detektoru, který je zaznamená a vhodně upraví signál, který pak přeneše do počítače (McMaster 2005).

Největší využití v HPLC mají chemicky vázané stacionární fáze, u kterých jsou na hydroxylové skupiny silikagelových zrn navázány různé radikály, nejčastěji uhlovodíkové řetězce složené z 18 uhlíkových atomů (C18). Tento typ patří mezi nepolární chemicky vázané fáze (reverzní fáze) (Klimeš et al. 2011). Jednotlivé složky směsi jsou v tomto případě rozdělovány mezi nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi, přičemž nejpolárnější látky vytékají z kolony jako první a nejméně polární látky jako poslední, protože jsou více zadržovány nepolární stacionární fází. HPLC analýza může být provedena při konstantním složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, pak se jedná o isokratickou eluci, nebo může být během separace složení mobilní fáze měněno, což je případ gradientové eluce (McMaster 2005). Gradientová eluce se často využívá při analýze léčiva a jeho polárních metabolitů, protože strukturní změny léčiva způsobené metabolickými reakcemi mají příslušný efekt na vlastnosti vzniklých metabolitů a způsobují rozdílné chování v chromatografickém systému. Ve většině případů vedou metabolické procesy ke zvýšení polaritě metabolitů, a tím ke snížené retenci k reverzní fázi HPLC v porovnání s mateřským léčivem. Zvýšení polaritě a s tím spojené snížení retence mohou být velmi výrazné pro metabolity druhé fáze vznikající např. glukuronidací nebo sulfatací. Aby bylo možné analyzovat takto rozdílně se chovající molekuly, je třeba během separace měnit složení mobilní fáze (Samuel et al. 2003).

Charakteristickou kvalitativní veličinou pro každou analyzovanou látku je retenční čas. Retenční čas popisuje dobu od nástřiku léčiva na kolonu po dosažení maxima eluční křivky. Kvantitativní charakteristikou v HPLC je pak plocha chromatografického píku (Klimeš et al. 2011).

Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) představuje jeden z nejmodernějších typů kapalinové chromatografie. Funguje na stejném principu jako HPLC, ale separace probíhá za vyšších tlaků (40 MPa a vyšší). Při UHPLC jsou využívány speciální sorbenty, které jsou charakterizovány mechanickou pevností a vysokou separační schopností. Výhodami UHPLC jsou: zkrácení doby analýzy, zvýšení citlivosti a separační účinnosti, snížení spotřeby analyzované látky a mobilní fáze. Citlivost a selektivita chromatografické metody souvisí s typem detektoru. Detektory identifikují látky, které vycházejí z kolony (Guillarme a Veuthey 2012).

Bylo zjištěno, že IVE může být snadno analyzován na reverzních fázích s C18 za použití organických modifikátorů v mobilní fázi, jako je metanol, acetonitril nebo jejich kombinace. Procento vody v mobilní fázi závisí na množství analyzovaných látek a typu detekce. Separace ML je obvykle prováděna na standardních LC kolonách 150 – 250 mm dlouhých s průměrem od 3,0 do 4,6 mm a s velikostí částic od 3,0 do 5,0 μm . Přidání pufru do mobilní fáze obvykle nebývá nutné (Danaher et al. 2006). I když v některých případech může být využití pufru výhodné např. pro podpoření ionizace v průběhu hmotnostní spektrometrie (MS) (Alvinerie et al. 1987). V analýze IVE se spíš používá gradientová eluce, která umožňuje lépe separovat a odstranit interference, které by mohly rušit následné stanovení, toho se obzvlášť využívá u detekce prostřednictvím MS. Gradientová eluce tak vede k vyšší robustnosti separace a lepšímu tvaru píků (Danaher et al. 2006).

3.5.3 Hmotnostní spektrometrie

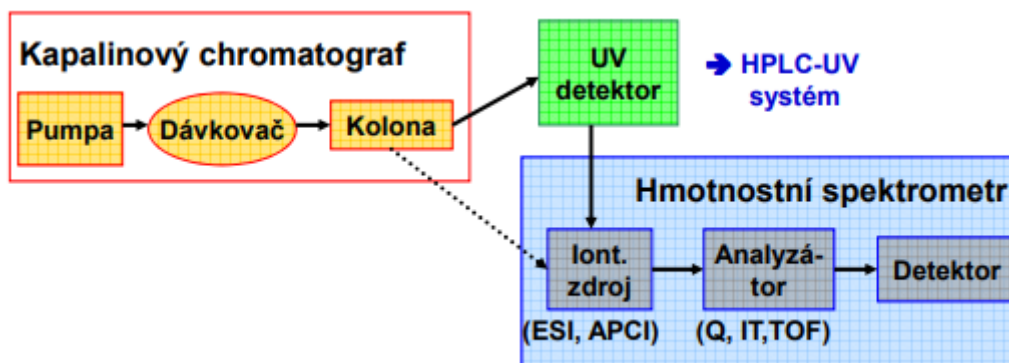
Pro zpřesnění analýzy chemických sloučenin se v dnešní době s oblibou používá spojení chromatografie s MS. Mezi významné výhody MS patří možnost kombinace s plynovými nebo kapalinovými separačními technikami při analýze komplexních biologických vzorků, extrémně vysoká senzitivita, potřeba malého množství vzorku a relativní snadnost provedení (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008). MS je založena na interakci iontů s elektrickým nebo magnetickým polem v prostředí vakua

(Friedecký a Lemr 2012). Výsledkem HPLC/MS analýzy je záznam intenzity vybraných poměrů hmoty/náboj (m/z) iontu v čase.

Z hlediska kvalitativní analýzy se zjišťuje identita, molekulární hmotnost a struktura léčiva. Používá se např. pro analýzu velkých molekul, jako jsou polypeptidy, polysacharidy a polynukleotidy. V těchto případech se často používá LC/MS s analyzátozem doby letu v kombinaci s gelovou elektroforézou. V neposlední řadě je důležitá i pro analýzu stopových nečistot a metabolitů. Obzvláště kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým uspořádáním spektrometru (LC/MS/MS) je vhodná pro analýzu stopových metabolitů, protože umožňuje vyhodnocením fragmentace iontů identifikovat neznámé komponenty a určit jejich strukturu (McMaster 2005).

Kvantitativní analýza vyjadřuje závislost odezvy na koncentraci léčiva. U kvantitativní analýzy je důležitá volba standardu. Aby se snížil vliv matrice a kontaminace na ionizaci analytu, používá se metoda vnitřního standardu. Využití vnějšího standardu není vhodné. Nejpřesnějších výsledků je dosaženo využitím izotopicky značeného standardu analytu. Pokud však není dostupný, dá se nahradit analogickou sloučeninou nebo příslušným homologem (Holčapek 2017a).

Hmotnostní spektrometr obsahuje několik důležitých částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor iontů. Iontový zdroj se využívá k zplynění mobilní fáze a k tvorbě iontů analytu (Paudel et al. 2007).



Obrázek 5. Schéma HPLC/MS. ESI - ionizace elektrosprejem, APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku, Q – kvadrupól, IT – iontová past, TOF – analyzátor doby letu, UV – ultrafialové záření (Holčapek 2017d).

3.5.3.1 Ionizace

K ionizaci molekul dochází odtržením valenčních elektronů a následným oddělení vytvořených elektricky nabitých částic. Analyzované látky, které opustí kolonu, jsou

transportovány do ionizační komory. Molekulární ion je částice, která vznikne z původní molekuly analytu odtržením jediného elektronu (Lázníčková a Kubíček 2008).

Protože existuje velká variabilita ve struktuře organických a bioorganických molekul, nelze používat pouze jednu univerzální techniku ionizace, která by byla vhodná k ionizaci všech léčiv a jejich metabolitů. Bylo tedy vyvinuto několik ionizačních technik, které zajišťují vhodný způsob ionizace podle vlastností konkrétních molekul. Ionizační techniky jsou voleny například podle struktury, polaritě nebo molekulové hmotnosti zkoumané molekuly (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008).

Ionizace může být prováděna při sníženém nebo atmosférickém tlaku. Ionizační techniky dělíme na tvrdé a měkké podle přebytku vnitřní energie molekul po ionizaci. Vysoká vnitřní energie ionizované molekuly, která vznikla tvrdou ionizací, často vede k její fragmentaci. U měkkých ionizačních technik dochází vlivem ion-molekulárních reakcí převážně k tvorbě iontů s nižší vnitřní energií. V těchto případech je pak relativní intenzita fragmentových iontů nízká (Holčapek 2017c).

Z analytů v iontovém zdroji vznikají kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty (M^+ a M^-), aduktové ionty ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$) nebo fragmenty ionizované molekuly u méně stabilních látek (Friedecký a Lemr 2012). Důležitou součástí hmotnostního spektrometru jsou také vakuové pumpy, které vytváří takové prostředí, ve kterém nedochází ke kolizi ionizovaných molekul analytu s molekulami vzduchu (McMaster 2005).

3.5.3.1.1 Ionizace za sníženého tlaku

1. Elektronová ionizace (EI)

Během EI dochází k emisi elektronů, která způsobí uvolnění valenčního elektronu, čímž vznikne radikál-kationt M^+ . EI je nejtvrděší ionizační technikou (Holčapek 2017c).

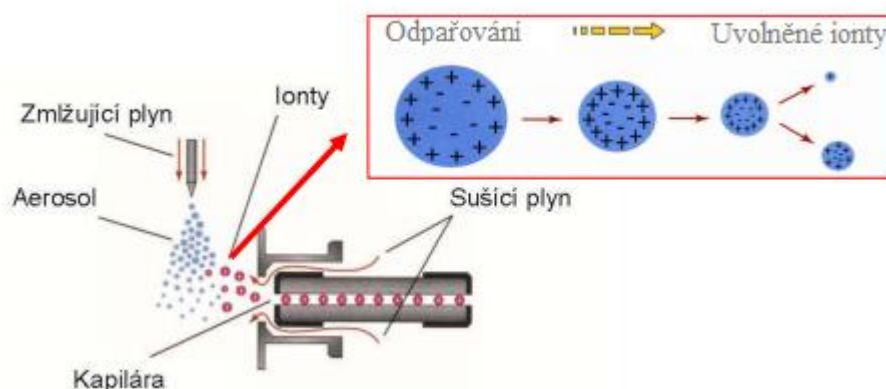
2. Chemická ionizace (CI)

CI se od EI liší přítomností reakčního plynu. Ionizující elektrony nejprve ionizují molekuly reakčního plynu, které následně ionizují molekuly analytu pomocí ion-molekulárních reakcí. Je to tedy měkkší technika než EI (Friedecký a Lemr 2012; Paudel et al. 2007).

3.5.3.1.2 Ionizace za atmosférického tlaku

1. Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI je nejběžněji používanou ionizační technikou pro spojení HPLC/MS. Eluent z HPLC protéká kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 4 kV). Na konci kapiláry je kapalina rozprášena za pomoci zmlžujícího plynu (McMaster 2005). Kapičky vzniklé tímto způsobem obsahují na svém povrchu velké množství nábojů. Rozpouštědlo je z nabitých kapiček rychle odpařováno, díky čemuž se zvyšuje hustota náboje na povrchu až do dosažení kritické hodnoty, kdy Coulombické odpuzování překoná povrchové napětí a dojde ke Coulombické explozi. Při Coulombické explozi se kapičky rozpadnou na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakováním tohoto procesu je dosaženo uvolnění iontů (Friedecký a Lemr 2012).



Obrázek 6. Popis ionizace elektrosprejem (Holčapek 2017c).

Vzniklé ionty jsou pak přeneseny z atmosférické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru (Holčapek 2017c). Tato technika umožňuje ionizaci látek středně polárních až iontových. Pro nepolární sloučeniny tato technika použít nelze. Jedná se o nejměkčí ionizační techniku, k fragmentaci iontů téměř nedochází (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008). Často se využívá pro ionizaci biomakromolekul (např. proteinů, sacharidů, nukleových kyselin, syntetických polymerů) a metabolitů (Paudel et al. 2007). Narozdíl od jiných technik poskytuje u metabolitů druhé fáze biotransformace spolehlivé informace o jejich relativní molekulové hmotnosti (Holčapek, M., Kolářová, L. and Nobilis 2008). Bylo zjištěno, že ESI při analýze ML pracuje nejlépe v pozitivním iontovém módu (Danaher et al. 2006).

2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Princip techniky se podobá konvenční CI, ale ionizace je prováděna za atmosférického tlaku. Kapičky eluátu jsou rychle odpařeny a ovlivněny výbojem z výbojové jehly. Patří mezi měkké ionizační techniky (Holčapek 2017c).

3. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

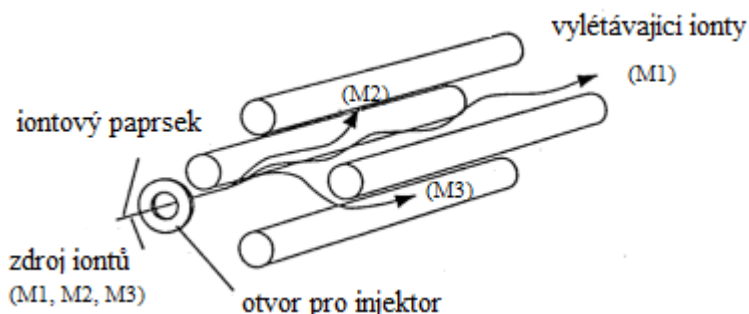
Uspořádání zdroje je podobné jako pro APCI, jen se pro ionizaci molekul nepoužívá jehla s vloženým napětím, ale používá se zdroj UV záření. Jedná se o měkkou ionizační techniku (Paudel et al. 2007).

3.5.3.2 *Hmotnostní analýza*

Klíčovou součástí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, který separuje ionty v plynné fázi za vakua podle jejich m/z . Analyzátor se nachází za iontovým zdrojem a před detektorem. Jeho funkcí je rozdělit ionty podle m/z před vstupem do detektoru. Analyzátoři se rozdělují na základě různých fyzikálních způsobů dělení iontů podle m/z (Friedecký a Lemr 2012). Existují i hmotnostní spektrometry, které kombinují dva hmotnostní analyzátoři (např. trojitý kvadrupól), jedná se o tzv. tandemové uspořádání (MS/MS). Tandemové uspořádání se používá pro zdokonalení analýzy jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Využití často nachází v kombinaci s měkkými ionizačními technikami při analýze struktury, protože u měkkých ionizačních technik je nízká míra fragmentace (Paudel et al. 2007).

3.5.3.2.1 *Kvadrupólový analyzátor*

Kvadrupólový analyzátor rozlišuje ionty podle různé stability oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Skládá se ze čtyřech stejných kovových tyčí kruhového průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě pak záporné stejnosměrné napětí. Všechny čtyři tyče jsou pak superponovány vysokofrekvenčním střídavým napětím (Holčapek 2017b).



Obrázek 7. Stavba kvadrupólu s vylétávajícími (M1) a zachycenými (M2, M3) ionty (Holčapek 2017b).

Podle velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v určitém okamžiku ionty s danou hodnotou m/z letí po stabilní trajektorii k detektoru, ostatní ionty se zachytí na tyčích kvadrupólu (Paudel et al. 2007). U tohoto analyzátoru se používají dva režimy. Skenovací režim, při kterém se mění elektrické pole, což dovoluje rychle proměřit všechny hodnoty m/z a tím sledovat všechny ionty vzniklé v iontovém zdroji. Nebo single ion monitoring režim, při kterém je nastaveno elektrické pole kvadrupólu takovým způsobem, aby procházely ionty pouze s příslušnou velikostí, čehož se s výhodou využívá pro přesnější kvantifikaci analyzovaných látek (Friedecký a Lemr 2012).

Trojité kvadrupólový analyzátor, který řadíme mezi hybridní analyzátor, se typicky používá pro kvantitativní analýzu. Výhodná je především jeho citlivost, rychlost a selektivita díky možnosti MS skenů. Má však omezený rozsah a rozlišovací schopnosti (Holčapek 2017a). Skládá se ze tří kvadrupólů řazených sériově za sebou. První (Q1) a třetí (Q3) kvadrupól fungují jako hmotnostní analyzátor. Prostřední kvadrupól (Q2) funguje jako kolizní cela, která obsahuje kolizní plyn (Holčapek 2017b). Zde dochází za vyššího tlaku a působení elektrického pole k srážkám iontů vyselektovaných prostřednictvím Q1 (prekurzorové ionty) s atomy kolizního plynu. Tyto srážky pak způsobují zvýšení vnitřní energie iontů, což pak vede k jejich fragmentaci (produktové ionty). Tímto způsobem vytvořené fragmenty jsou následně analyzovány prostřednictvím Q3 (McMaster 2005). U trojitého kvadrupólu je možné nastavit čtyři režimy:

- Sken produktových iontů. Často se používá ve spojení s LC, pro získání hmotnostního spektra fragmentů molekulárního iontu, a tedy informací o struktuře. Q1 propouští jen ionty s určitou hodnotou m/z , tyto propuštěné ionty jsou v Q2 fragmentovány, Q3 následně detekuje všechny takto vzniklé fragmenty (McMaster 2005).

- Sken prekurzorových iontů. Tato technika se používá pro analýzu molekul se stejnou funkční skupinou, které odpovídá i způsob fragmentace. Q1 propouští do Q2 ionty s různou hodnotou m/z , kde pak dochází k jejich fragmentaci. Q3 však propouští jen fragmenty s konkrétní hodnotou m/z (Friedecký a Lemr 2012).
- Sken neutrální ztráty. Využívá se pro analýzu molekul se stejnou strukturní částí. Q1 a Q3 skenují ionty s daným rozdílem hodnot m/z . Když primární fragment projde další fragmentací, rozpadne se na dvě části, nabitý sekundární fragment a neutrální molekulu. Q1 propustí určité primární fragmenty, Q3 pak propustí jen sekundární fragmenty, jejichž m/z je přesně o neutrální ztrátu nižší (McMaster 2005).
- Sledování rozpadu iontu. Používá se pro kvantifikaci látek ze složitějších směsí. Q1 vybere iont prekurzoru, který je dále v Q2 fragmentován působením optimální kolizní energie, aby vznikl nejintenzivnější produkt, jenž je jako jediný propuštěn prostřednictvím Q3. V tomto módu se tedy zjišťuje hmotnostní přechod, který je definovaný dvěma hodnotami m/z , jenž odpovídají prekurzoru a produktu (Friedecký a Lemr 2012).

Mortier et al. (2003) vyvinuli metodu pro stanovení reziduí ML v mléce za využití selamektinu jako vnitřního standardu. Použili trojitý kvadrupól v kombinaci s ESI, který nastavili na pozitivní iontový mód. Rezidua byla monitorována jako jejich $[M+Na]^+$ ionty. Tato metoda byla validována pro detekci reziduí IVE už o koncentraci 4 $\mu\text{g/kg}$.

3.5.3.2.2 *Další typy hmotnostních analyzátorů*

Mezi další typy hmotnostních analyzátorů patří např. magnetický sektorový analyzátor, který rozděluje ionty podle zakřivení dráhy jejich letu v magnetickém poli. Analyzátor doby letu, který vyhodnocuje dobu letu iontů. Orbitrap sledující různou frekvenci harmonických oscilací iontů. Dále ještě iontová past a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Friedecký a Lemr 2012; Holčapek 2017b; Paudel et al. 2007).

3.5.3.3 *Detekce*

Ionty vyselektované hmotnostním analyzátozem jsou zaznamenány detektorem, který převede signál do digitálního formátu a vygeneruje hmotnostní spektra. Existují dva typy detektorů: detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající

přímým dopadem analyzovaných iontů a násobičové detektory, které využívají princip násobení elektronů vznikajících na první konverzní dynodě po dopadu iontů (Friedecký a Lemr 2012; Paudel et al. 2007).

3.5.3.4 Využití při analýze ML

LC/MS/MS má v dnešní době široké uplatnění pro analýzu ML. Jako výhodné se jeví např. kombinace iontové pasti s APCI nastavené na negativní iontový mód při monitorování $[M-H]^-$ iontů nebo pozitivní mód při monitorování $[M+Na]^+$ iontů. Také pak kombinace trojitého kvadrupólu s ESI, kdy dochází k monitorování iontů $[M+Na]^+$ nebo $[M-H]^+$ (Danaher et al. 2006).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Zvířata

Experimenty byly provedeny v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. (Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání).

Tab. 1 Informace o pokusných jedincích ovce domácí (*Ovis ammon*). M – male (samec), F – female (samice).

Číslo zvířete	Datum narození	Pohlaví	Živá hmotnost (kg)
873	05. 4. 2013	F	31,0
768	16. 2. 2016	M	43,0
770	15. 2. 2016	M	44,5
784	15. 2. 2016	M	36,5
793	22. 3. 2016	M	36,4
796	01. 4. 2016	M	44,0
802	30. 4. 2016	M	31,5

4.2 Reagencie a chemikálie

Acetonitril – Sigma-Aldrich (Praha, ČR), LC/MS čistota

Amoniak – Lachema (Praha, ČR)

Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Doramektin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Ethylacetát – Prolabo (Brisbane, Austrálie)

Ivermektin – Merial (Lyon, Francie)

Název veterinárního léčivého přípravku: IVOMEK 1% injekční roztok

Kvantitativní složení: 10 mg v 1 ml

Léková forma: injekční roztok

Pomocné látky: glycerolfomal, propylenglykol (uskvbl 2011)

Octan amonný – Sigma-Aldrich (Praha, ČR), LC/MS čistota

4.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy – Sartorius CP225D

Automatické pipety - Eppendorf

Koncentrátor – Concentrator 5301 Eppendorf

Stolní centrifuga – Eppendorf 5810R

Systém čištění vody – Milipore-Milli-Q

Třepačka – Heidolph Multi Reax

UHPLC/MS systém - Shimadzu

Ultrazvukový homogenizátor – Manufacture Expert

Váhy – Sartorius

4.4 Léčba ovcí ivermektinem

IVE byl aplikován subkutánně v jednorázových dávkách 0,2 mg/kg živé hmotnosti. Následně byl ovcím odebírán trus v pravidelných intervalech: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, 192, 240, 288, 384, 480, 576 a 672 h. Odebrané vzorky byly uchovány při - 20 °C.

4.5 Extrakce ivermektinu z trusu

Bylo naváženo 0,5 g trusu, který byl dále zhomogenizován v třecí misce s 3 ml redestilované vody. K homogenátu bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (doramektin, 50µM, rozpuštěno v DMSO). Vzniklý obsah byl přelit do 15ml zkumavky a následně byla třecí miska ještě propláchnuta nejprve 1 ml redestilované vody a následně 8 ml ethylacetátu, jenž byly následně přidány do stejné zkumavky. Ke vzniklé směsi bylo napipetováno 130 µl koncentrovaného amoniaku a zkumavka se nechala protřepávat 5 min na třepačce. Protože IVE i doramektin jsou lipofilní molekuly, většina přešla z vodné fáze do ethylacetátové fáze. Následovala centrifugace (10 min, 4000 RPM). Organická vrstva byla po 3 ml napipetována do 5ml ependorfek. Odpaření organické vrstvy bylo provedeno v koncentrátoru (program 2, 45 °C). Extrakce pomocí ethylacetátu byla dvakrát opakována. Odpařené vzorky byly skladovány v mrazáku při - 20 °C.

4.6 Příprava vzorku k LC/MS analýze

Ke vzorkům bylo napipetováno 100 µl mobilní fáze (složení v poměru A:B = 1:1, voda:acetonitril) a to celé bylo následně vloženo do ultrazvukové lázně na 40 min. Následovala centrifugace (10 min, 10 000 RPM) a filtrace vzorků pomocí Syringe filtrů (0,22 µm) do kónických insertů.

4.7 UHPLC/MS analýza

Název metody: metabolicka-studie-ivm-dor.lcm

Chromatografická kolona: ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD 2.1x150mm, 1,8 µm (P.N. 959759-902)

Celková doba analýzy: 20 min

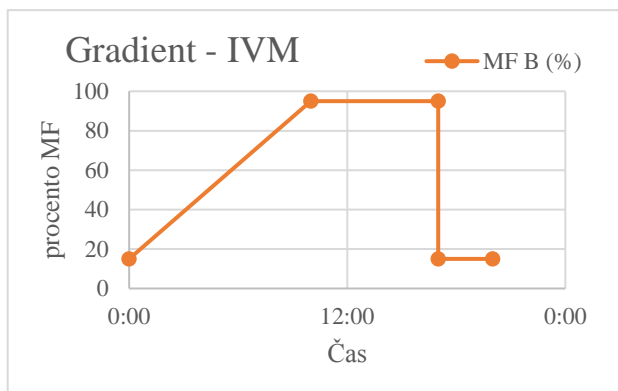
Ionizace: elektrosprejem

Hmotnostní analyzátor: trojitý kvadrupól, QqQ

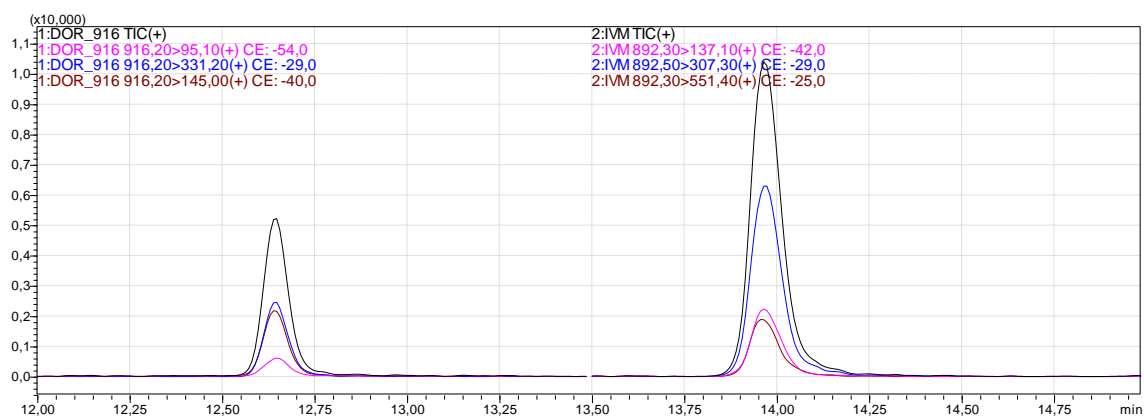
Objem nástřiku: 1 µl

Tab. 2 Informace o průběhu gradientu mobilní fáze: A – octan amonný 5 mM, pH = 6,5; B – acetonitril.

Čas (min)	A (%)	B (%)	Průtok (ml)
00:00	85	15	0,300
10:00	5	95	0,300
17:00	5	95	0,300
17:00	85	15	0,300
20:00	85	15	0,300



Obrázek 8. Popis gradientu IVM (ivermektinu): Graf procentuální závislosti MF - mobilní fáze B.



Obrázek 9. Příklad separace doramektinu ($r_t = 12,56$ min) a ivermektinu ($r_t = 14,00$ min) – reálný vzorek ovce 796, datum a čas odběru: 23.11.16 9:00.

Kalibrace:

Doramektin: 5 μ M – jedná se o interní standard

Ivermektin: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0 μ M

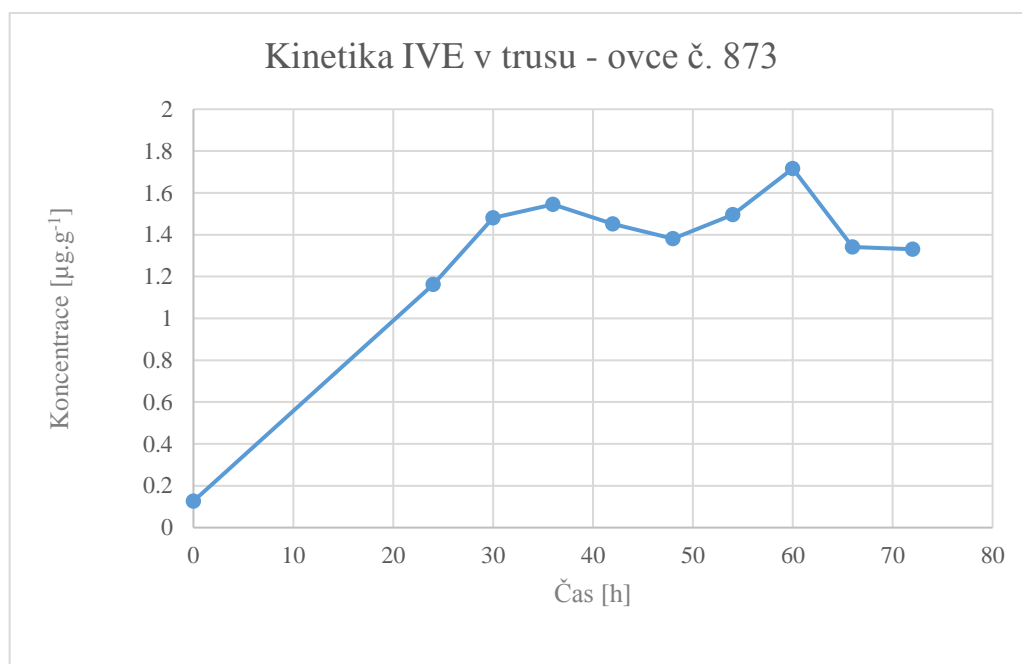
Tab. 3 MRM přechody. Q1 – kvadrupól 1, Q3 – kvadrupól 3, m/z – poměr hmota/náboj.

Prekurzorový ion m/z	Produktový ion m/z	Dwell time (msec)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
Doramektin – prekurzorový ion [M+NH ₄] ⁺					
916,20	95,10	163,0	-40,0	-54,0	-19,0
916,20	331,20	163,0	-40,0	-29,0	-25,0
916,20	145,00	163,0	-40,0	-40,0	-29,0
Ivermektin – prekurzorový ion [M+NH ₄] ⁺					
892,30	137,10	163,0	-26,0	-42,0	-29,0
892,50	307,30	163,0	-28,0	-29,0	-15,0
892,30	551,40	163,0	-26,0	-25,0	-30,0

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace metodiky

V prvním experimentu byly vzorky trusu od ovcí odebírány v intervalech 0, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 a 72 h po aplikaci. To se ale ukázalo pro hodnocení farmakokinetických parametrů jako nevýhodné, protože IVE se objevuje v trusu již dříve než po 24 h a významné koncentrace IVE jsou trusem eliminovány ještě dlouho po 72 h.



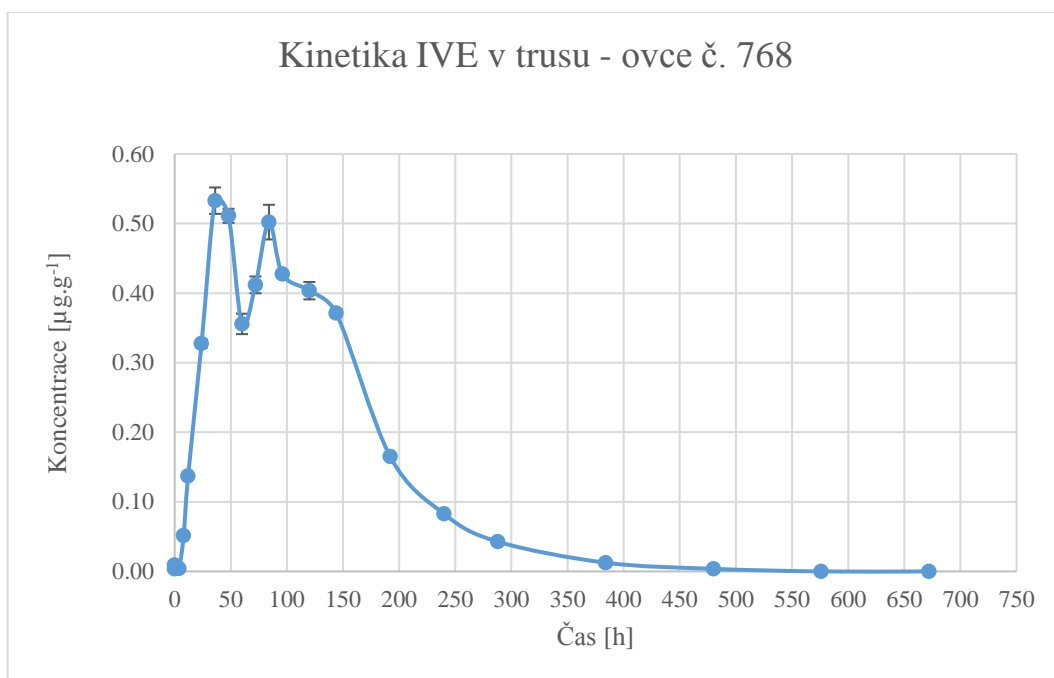
Obrázek 10. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 873 - první experiment.

Ve druhém experimentu byly proto zvoleny nové časové intervaly: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, 192, 240, 288, 384, 480, 576 a 672 h, díky kterým je možné zachytit kinetiku IVE v trusu přesněji.

5.2 Farmakokinetika IVE v trusu

Časový profil exkrece IVE ovčím trusem po jednorázové subkutánní aplikaci dávky 0,2 mg/kg byl znázorněn graficky u jednotlivých ovcí (obr. 2 - 7), průměr všech ovcí (obr. 8) a porovnání všech ovcí navzájem (obr. 9). Křivka vyjadřuje závislost

koncentrace IVE v trusu na čase. Měření ukázalo velké interindividuální rozdíly, avšak stejný trend průběhu křivky. IVE se začíná trusem eliminovat poměrně rychle. Např. 12 h po aplikaci dosahuje průměrná koncentrace IVE v trusu $0,1848 \pm 0,1569 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (viz obr. 8). Maximálních koncentrací dosahuje křivka v jednotlivých případech již 24 až 60 h po aplikaci. Průměrné maximální koncentrace IVE u všech ovcí $0,6321 \pm 0,3953 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bylo dosaženo po 60 h (viz obr. 8). Křivka do svého maxima strmě narůstá, přičemž po dosažení maxima začíná křivka ve většině případů prudce klesat, tento pokles se ve všech případech postupně zpomaluje. Z takového průběhu křivky lze odvodit, že se eliminace IVE řídí kinetikou prvního řádu, rychlost eliminace IVE se s ubývajícím léčivem v plazmě postupně snižuje. Průměr koncentrací IVE u všech ovcí ukazuje, že koncentrace IVE se v trusu blíží k nulovým hodnotám až po stovkách hodin, např. koncentrace $0,0147 \pm 0,0120 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ je dosaženo až 384 h po aplikaci (viz obr. 8).

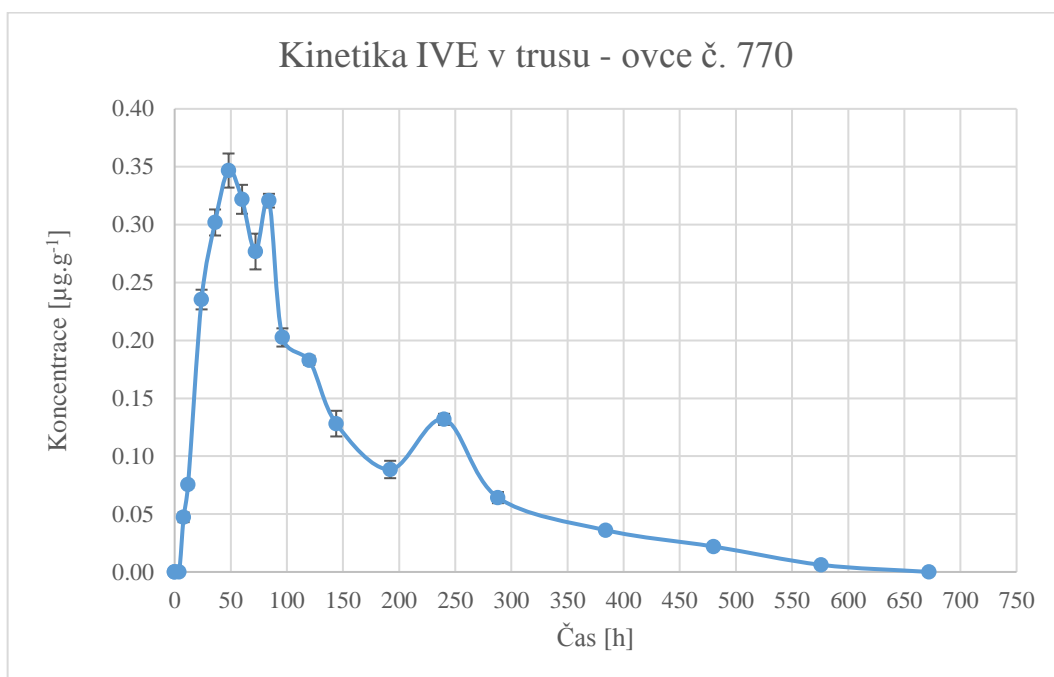


Obrázek 11. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 768.

Maximální koncentrace IVE:

$0,53282 \pm 0,018976 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

36 h od aplikace

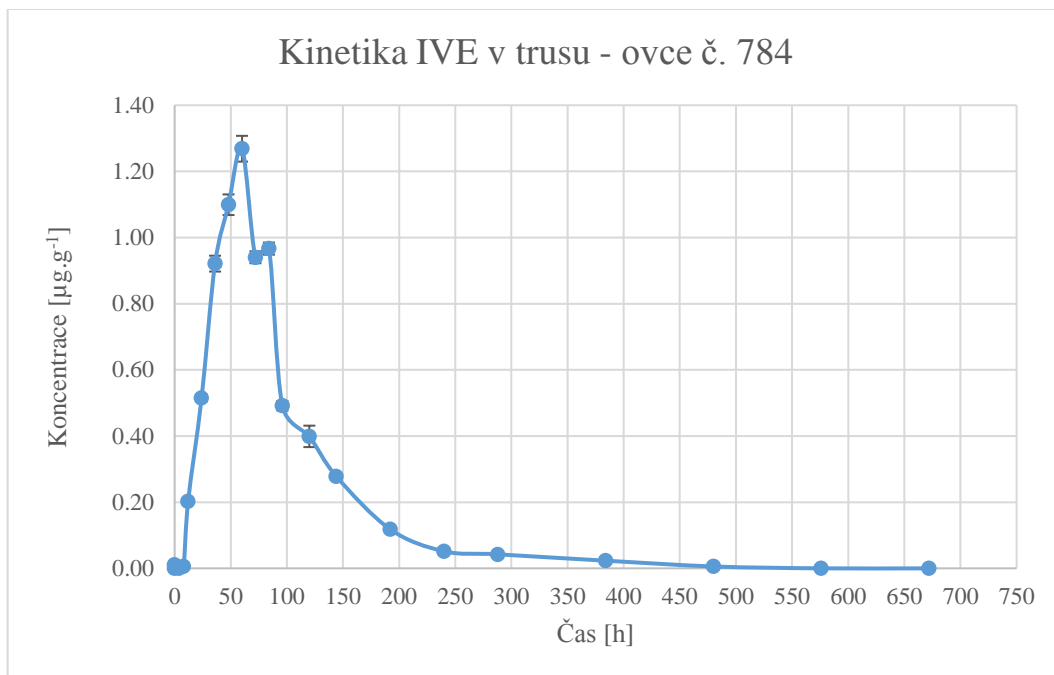


Obrázek 12. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 770.

Maximální koncentrace IVE:

$0,34671 \pm 0,014741 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

48 h od aplikace

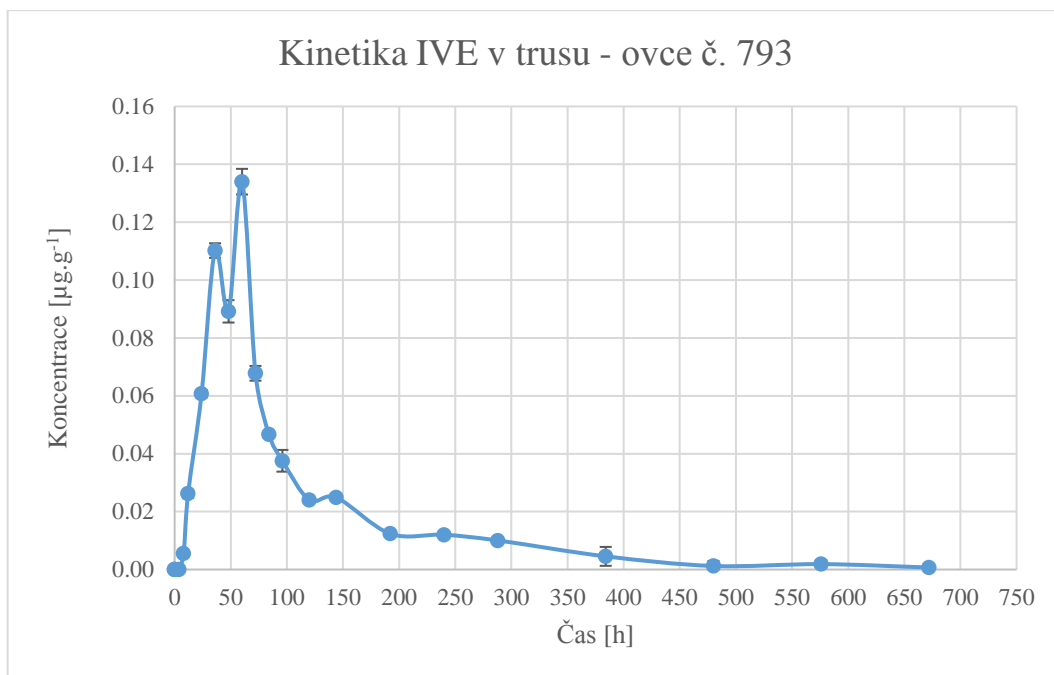


Obrázek 13. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 784.

Maximální koncentrace IVE:

$1,26860 \pm 0,039000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

60 h od aplikace

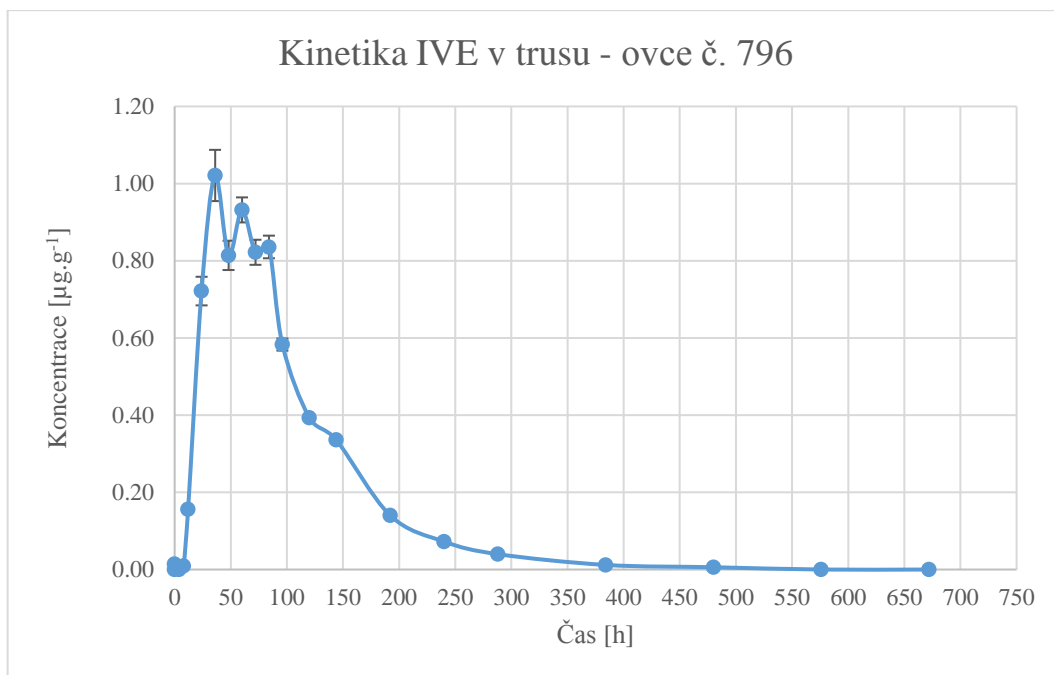


Obrázek 14. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 793.

Maximální koncentrace IVE:

$0,13401 \pm 0,004433 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

60 h od aplikace

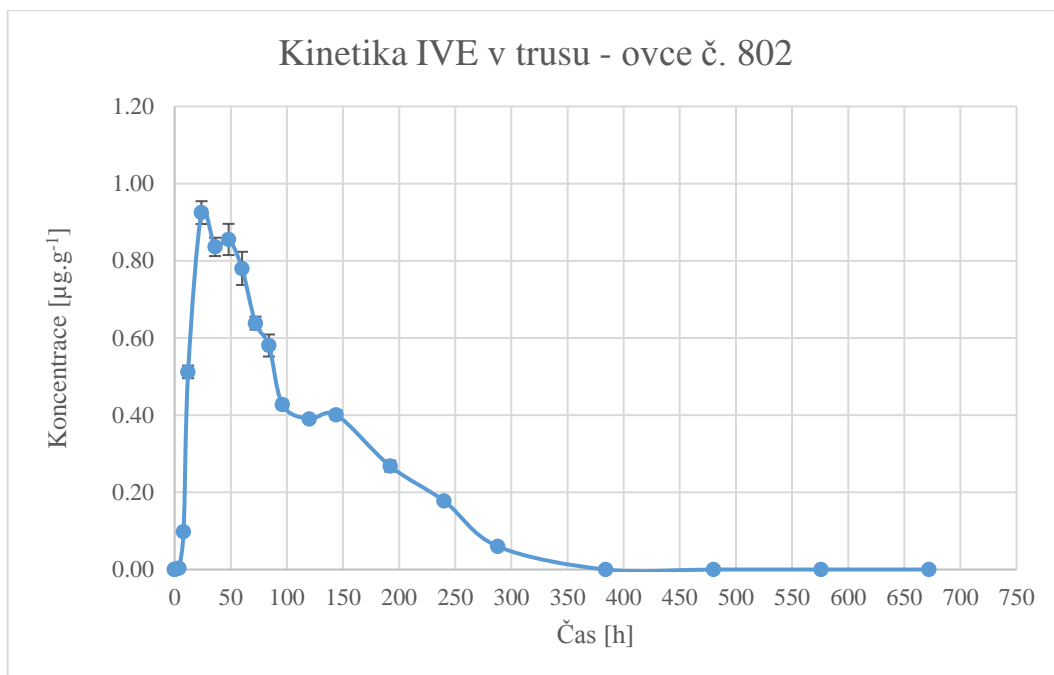


Obrázek 15. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 796.

Maximální koncentrace IVE:

1,02113 ± 0,066372 µg.g⁻¹

36 h od aplikace

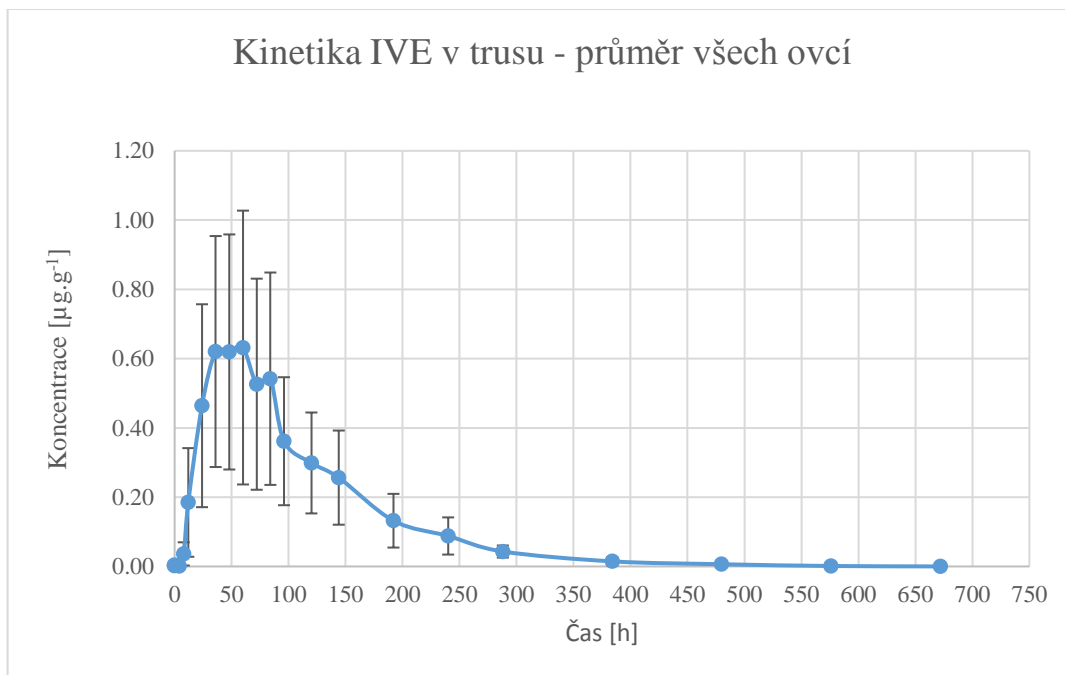


Obrázek 16. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u ovce číslo 802.

Maximální koncentrace IVE:

$0,92492 \pm 0,029565 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

24 h od aplikace

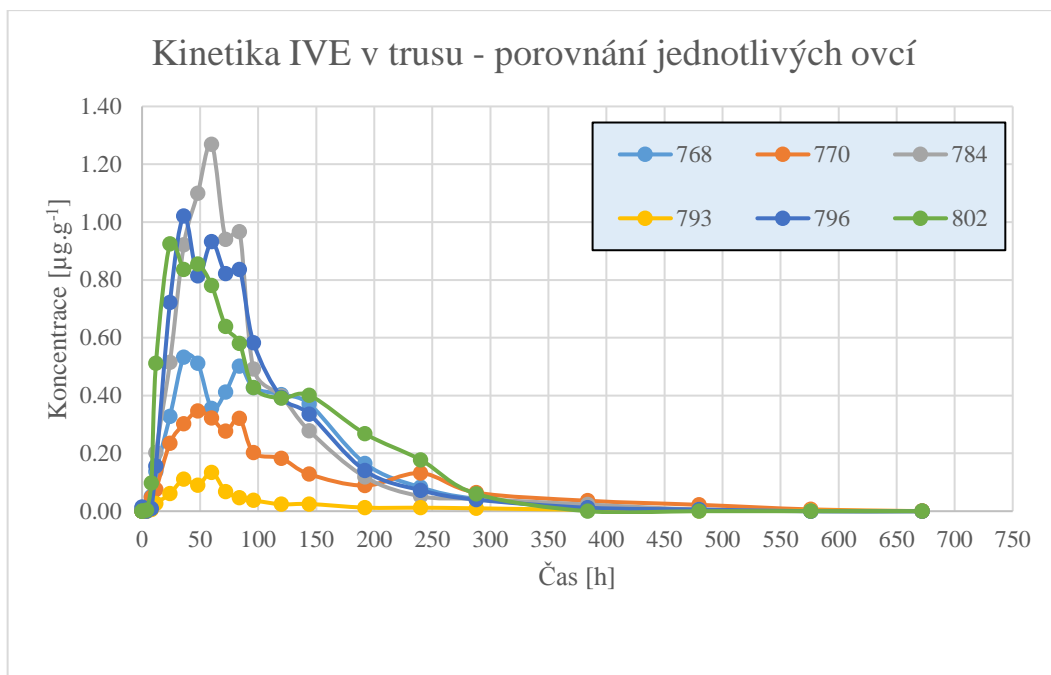


Obrázek 17. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase u všech ovcí.

Maximální koncentrace IVE:

$0,6321 \pm 0,3953 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

60 h od aplikace



Obrázek 18. Graf závislosti koncentrace IVE (ivermektinu) na čase.

6. DISKUZE

Farmakologický efekt IVE úzce souvisí s jeho farmakokinetickými vlastnostmi. Charakterizace jeho farmakokinetiky proto hraje důležitou roli v predikci a optimalizaci jeho anthelmintického účinku. Farmakokinetika IVE se však vyznačuje značnou variabilitou v závislosti na mnoha faktorech, proto jsou vyžadována další měření, která by dokázala jejich vliv osvětlit. Výrazná mezidruhová variabilita navíc brání vzájemné extrapolaci poznatků, což znesnadňuje klinickou praxi (González Canga et al. 2009). Navíc se ukázalo, že trusem eliminovaný IVE může nepříznivě ovlivňovat životní prostředí a podporovat rozvoj rezistence na anthelmintika, avšak míra tohoto vlivu zatím nebyla zcela stanovena z důvodu nedostatku dat (Bai a Ogbourne 2016; Bártíková et al. 2016; James et al. 2009). S ohledem na nedostatek informací o eliminaci IVE jsme se v našem experimentu zaměřili na studium exkrečního profilu IVE a jeho ovlivnitelnost různými faktory.

Kvůli výrazné variabilitě farmakokinetiky IVE bylo potřeba nejprve nastavit správný design experimentu. Prvním problémem byl výrazný koncentrační rozdíl mezi odběrem v čase 0 a odběrem v čase 24 h po aplikaci. Rychlejší nástup eliminace IVE trusem, než se původně předpokládalo, by mohl být způsoben poměrně rychlou absorpcí IVE. Absorpce i eliminace IVE úzce souvisí s cestou podání a formulací přípravku. V našem experimentu byl použit IVE ve vehikulu propylenglykol:glycerolfomal, u něhož nedochází k tak výraznému zpomalení uvolňování IVE z podkožního depa po subkutánní aplikaci jako u některých lipofilnějších vehikul (Lifschitz et al. 1999; Lo et al. 1985). S tímto předpokladem korelují výsledky studie provedené na skotu, při které se také objevilo významné množství IVE v trusu již první den po subkutánní aplikaci, nejvyšší koncentrace IVE se pak v trusu objevily po třech až pěti dnech (Rew a Vercruysse 2002). Z tohoto důvodu jsme přidali odběry v dřívějších časových intervalech (4, 8 a 12 h) a zaznamenali tak nástup exkrece IVE trusem přesněji.

Další problém nastal u koncových časů odběrů vzorků, IVE se totiž z těla eliminuje déle, než se původně předpokládalo. Pomalejší eliminace IVE z organismu ovce pravděpodobně souvisí s velkým $V_{D(IVE)}$, protože mezi těmito dvěma veličinami je blízký vztah. Čím delší je poločas eliminace konkrétního léčiva, tím větší je i jeho V_D (Dostálek et al. 2006). Subkutánní aplikace navíc u ovcí vede k mnohem vyšší distribuci IVE do tukové tkáně, čímž je zvýšen rezidenční čas na 114-216 h, což představuje téměř třikrát delší dobu než u intravenózního podání (Marriner et al. 1987). Myšlenku vlivu

velkého $V_{D(IVE)}$ podporuje fakt, že v tukové tkáni ovcí byly nalezeny méně polární metabolity IVE, které pravděpodobně vznikají esterifikací C_{24} hydroxylovaných derivátů s mastnými kyselinami. Ty pak snadno dále vytvářejí v tukové tkáni depa, ze kterých se pak IVE uvolňuje pomaleji. U prasat a koz jsou hlavními metabolity *O*-demethylované deriváty, které postrádají primární hydroxylovou skupinu a nejsou tedy vhodným substrátem pro esterifikaci, proto je u těchto zvířat depozice IVE v tukové tkáni nižší (Chiu et al. 1990; Danaher et al. 2006). Délka eliminace IVE z organismu je také silně ovlivněna formulací. Lo et al. (1985) tento poznatek potvrdili prostřednictvím experimentů na skotu, během nichž zjistili, že exkrece IVE u lipofilních vehikul po subkutánní aplikaci je pomalejší než u vehikul vodných. Eliminační poločas pro vodné roztoky je 2,0 dny, pro voda:glycerolformal 50:50 v/v 3,7 dny a pro propylenglykol:glycerolformal 60:40 v/v 8,3 dny.

Původní intervaly odběru vzorků po aplikaci se tedy v našem experimentu ukázaly jako nedostatečné, protože nedokázaly pokrýt celý průběh křivky závislosti koncentrace IVE na čase. Z tohoto důvodu jsme také přidali odběry v delších časových intervalech po aplikaci (84, 96, 120, 144, 192, 240, 288, 384, 480, 576 a 672 h), díky čemuž jsme zjistili, že se koncentrace IVE v trusu blíží k nulovým hodnotám až po stovkách hodin.

Farmakokinetika IVE se vyznačuje nejen velkými mezidruhovými rozdíly, ale z našeho měření vyplývá, že i značnými rozdíly v rámci jednoho druhu. To může být způsobeno dalšími faktory, mezi které můžeme zařadit např. věk, tělesnou konstituci, hmotnost, fyziologický stav organismu, pohlaví, atd. (González Canga et al. 2009).

V našem experimentu jsme testovali ovce podobného věku, který se v době aplikace pohyboval v rozpětí sedm až devět měsíců. Vliv rozdílného věku na farmakokinetiku IVE můžeme tedy pravděpodobně v tomto případě vyloučit. Vliv by mohla hrát rychlost dospívání u jednotlivých jedinců a s tím související fyziologické změny, protože tělesné dospělosti dosahují ovce až v rozsahu dvou až tří let (Mendelova univerzita 2017a).

Tělesná hmotnost se mezi zkoumanými jedinci sice lišila, ale porovnání farmakokinetiky IVE u jednotlivých ovcí z hlediska různé hmotnosti nepřineslo zcela konzistentní výsledky, pravděpodobně vlivem dalších faktorů, případně nízkého počtu testovaných ovcí.

Vliv na farmakokinetiku IVE má i množství a typ krmiva. Prodloužení doby průchodu tráveniny a léčiva zažívacím traktem způsobuje vyšší dostupnost léčiva pro

opětovné vstřebání v trávicím traktu, nehledně na to, jestli bylo léčivo aplikováno perorálně nebo třeba secernováno žlučovými cestami. Zpomalení posunu tráveniny může být vyvoláno omezením přísunu potravy. U ovcí po 24h lačnění, kterým byl perorálně podán IVE, se v porovnání s ovcemi s běžným přísunem potravy významně zvýšila hodnota $AUC_{(IVE)}$ a prodloužil eliminační poločas IVE (Rew a Vercruyse 2002). V našem případě nebyl u žádné ovce příjem potravy omezen, vliv tohoto faktoru také můžeme pravděpodobně vyloučit.

Dále se prokázal vliv březosti na farmakokinetiku IVE. Ten byl potvrzen v experimentu na ovcích v posledním trimestru, kterým byla jednorázově subkutánně aplikována dávka IVE 0,2 mg/kg. Ukázalo se, že u březích ovcí došlo k významnému prodloužení rezidenčního času IVE v plazmě. Tento jev může být pravděpodobně vysvětlen rozdílnou tělesnou hmotností mezi březími samicemi a kontrolní skupinou, zejména vyšším množstvím tukové tkáně u březích samic, jenž vede ke zvýšení $V_{D(IVE)}$ (PÉREZ et al. 2007). V našem experimentu jsme testovali pouze samce, vliv březosti proto můžeme vyloučit.

Jako zajímavý se také jeví vliv parazitózy na farmakokinetiku IVE. V experimentu na jehňatech, kterým byl subkutánně aplikován IVE v dávce 0,2 mg/kg, se ukázalo, že parazitóza významně modifikuje některé farmakokinetické parametry IVE v porovnání se skupinou jehňat bez parazitů. Parazitóza v tomto experimentu vyvolala významné snížení hodnoty $AUC_{(IVE)}$ a středního rezidenčního času IVE. Změna farmakokinetických parametrů IVE je vysvětlována vlivem patofyziologických změn v organismu ovce vyvolaných parazity. Jednak dochází k poklesu tělesné hmotnosti nakažených jedinců, což dále vede ke snížení $V_{D(IVE)}$ (Perez et al. 2006). Dále mohou parazité vyvolávat patofyziologické změny v gastrointestinálním traktu (GIT). Parazité zvyšují propustnost epitelu v GIT pro plazmatické bílkoviny, což vede k významné ztrátě plazmatických proteinů do GIT. Zvýšená permeabilita epitelu v GIT lumen pro plazmatické proteiny může redukovat poločas plazmatického albuminu a imunoglobulinů až na 50 % (Perez et al. 2006). Ztráta plazmatických proteinů do GIT současně vede i ke snížení plazmatické koncentrace IVE, jenž je na plazmatické proteiny navázán. Parazitóza je také asociována se zvýšením intestinální sekrece a střevní motility. Protože velké množství IVE je vylučováno do trusu prostřednictvím žluči a intestinální sekrece (Bogan a McKellar 1988), mohou tyto změny také přispět ke zvýšené eliminaci IVE u infikovaných jehňat. Vlivem těchto faktorů tak dochází ke zkrácení eliminačního poločasu IVE. Dalším důležitým krokem k pochopení změn farmakokinetiky IVE během

GIT parazitóz, bylo zjištěno, že tyto stavy jsou často asociovány s hypoalbuminemií a v některých případech s anémií (Holmes 1987; Perez et al. 2006). Lespine et al. (2003) demonstrovali, že se IVE ve vysoké míře váže i na plazmatické lipoproteiny, které pravděpodobně transportují IVE do tukové tkáně, což dále vede k prodloužení rezidenčního času IVE v organismu. Parazitózy mohou vyvolávat změny v syntéze proteinů a metabolismu tuků, což také může urychlovat eliminaci IVE (Perez et al. 2006).

Výše uvedený přehled faktorů, které mohou ovlivňovat farmakokinetiku IVE, naznačuje, že je tato problematika velmi komplexní a složitá. Interindividuální rozdíly zjištěné v našem experimentu můžeme pravděpodobně, s ohledem na námi posuzované faktory, přisoudit odlišnostem ve fyziologii jednotlivých ovcí.

7. ZÁVĚR

- Na základě literární rešerše byla zpracována problematika farmakokinetiky IVE u ovce domácí, přičemž byly popsány i různé faktory, které mohou farmakokinetiku IVE ovlivňovat.
- Byly charakterizovány metody použité ke stanovení farmakokinetiky IVE.
- V rámci optimalizace metody pro stanovení exkrečního profilu IVE bylo zvýšeno množství odběrů vzorků trusu, což vedlo ke zpřesnění získaného exkrečního profilu.
- IVE v subkutánně podané dávce 0,2 mg/kg se u ovcí začíná významně vylučovat již během prvního dne po aplikaci.
- Naopak ke kompletnímu vyloučení IVE z těla ovce dochází řádově až po stovkách hodin, což svědčí o značně dlouhém eliminačním poločase.
- Po zpracování farmakokinetických dat byla zjištěna výrazná interindividuální variabilita ve farmakokinetice IVE, přestože trend křivky byl u všech ovcí podobný.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

ABC transportní protein	<i>ATP Binding Cassette</i>	transmembránový protein využívající k přenosu látek ATP
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>	Fotoionizace za atmosférického tlaku
AUC	<i>Area Under the Curve</i>	plocha vymezená křivkou koncentrace léčiva v krvi vs. čas
AUC_{(IVE)0-LOQ}		AUC _(IVE) vztažena na časový interval
(AUC_{(IVE)0-∞})		AUC _(IVE) extrapolovaná na nekonečno
[BH]⁺		Brönstedova kyselina
C18		uhlovodíkové řetězce složené z 18 uhlíkových atomů
CI	<i>Chemical Ionization</i>	chemická ionizace
C_{max}		maximální koncentrace léčiva v krvi
DMSO		dimethylsulfoxid
EI	<i>Electron Ionization</i>	elektronová ionizace
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	ionizace elektrosprejem
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i>	kyselina gama-aminomáselná
GluCl		glutamát-chloridové kanály
GIT		gastrointestinální trakt
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	vlasovka slezová
HPLC	<i>High-Performance Chromatography</i>	<i>Liquid</i> vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IVE		ivermektin
L1, L2, L3, L4		jednotlivá larvální stadia <i>Haemonchus contortus</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>	kapalinová chromatografie

LC/MS/MS	<i>Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry</i>	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým uspořádáním spektrometru
M⁻		radikál-aniont
M⁺		radikál-kationt
M1		ionty vylétávající z kvadrupólu
M2, M3		ionty zachycené na tyčích kvadrupólu
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>	poměr hmota/náboj
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>	mnohočetná léková rezistence
ML		makrocyclické laktony
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>	Tandemové uspořádání spektrometru
P-gp		P-glykoprotein
Q1, Q2 a Q3	<i>Quadrupole 1, 2 and 3</i>	první, druhý a třetí kvadrupól
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	<i>Ultraviolet</i>	ultrafialové záření
V_D		distribuční objem

9. POUŽITÁ LITERATURA

ALVAREZ, Luis, Gonzalo SUAREZ, Laura CEBALLOS, Laura MORENO, Candela CANTON, Adrián LIFSCHITZ, Laura MATÉ, Mariana BALLENT, Guillermo VIRKEL a Carlos LANUSSE, 2015. Integrated assessment of ivermectin pharmacokinetics, efficacy against resistant *Haemonchus contortus* and P-glycoprotein expression in lambs treated at three different dosage levels. *Veterinary Parasitology* [online]. **210**(1–2), 53–63 [vid. 2017-08-19]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2015.03.001

ALVINERIE, M, J F SUTRA, P GALTIER a P L TOUTAIN, 1987. Determination of ivermectin in milk by high performance liquid chromatography. *Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research*. **18**(3), 269–274. ISSN 0003-4193.

BAI, Shahla Hosseini a Steven OGBOURNE, 2016. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere* [online]. **154**, 204–214 [vid. 2017-08-19]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.113

BALLWEBER, Lora Rickard, 2000. *Veterinary Parasitology*. B.m.: Butterworth-Heinemann. ISBN 9780702038617.

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Radka PODLIPNÁ a Lenka SKÁLOVÁ, 2016. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* [online]. **144**, 2290–2301 [vid. 2017-08-19]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.137

BÁRTÍKOVÁ, Hana, Lenka SKÁLOVÁ, Lucie STUHLÍKOVÁ, Ivan VOKŘÁL, Tomáš VANĚK a Radka PODLIPNÁ, 2015. Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment. *Drug metabolism reviews* [online]. **47**(3), 374–387. ISSN 1097-9883. Dostupné z: doi:10.3109/03602532.2015.1076437

BENZ, G.W., R.A. RONCALLI a S.J. GROSS, 1989. Use of Ivermectin in Cattle, Sheep, Goats and Swine. In: *Ivermectin and Abamectin* [online]. New York: Springer. ISBN 978-1-4612-3626-9. Dostupné z: doi:978-1-4612-3626-9_15

BLACKHALL, William J, Jean-Francois POULIOT, Roger K PRICHARD a Robin N BEECH, 1998. *Haemonchus contortus*: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin and Moxidectin Selected Strains. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*.

BOGAN, THE LATE J A a Q. A. MCKELLAR, 1988. The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online]. **11**(3), 260–268. ISSN 13652885. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.1988.tb00151.x

CAMPBELL, William C., 1989. *Ivermectin and Abamectin* [online]. 1. vyd. B.m.:

Springer-Verlag New York. ISBN 978-1-4612-3626-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4612-3626-9

CERKVENIK, V, I GRABNAR, V SKUBIC, D.Z DOGANOC, W.M.J BEEK, H.J KEUKENS, M DROBNIČ KOŠOROK a M POGAČNIK, 2002. Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. *Veterinary Parasitology* [online]. **104**(2), 175–185 [vid. 2017-08-19]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4017(01)00612-4

CHIU, Shuet Hing Lee, Marilyn L. GREEN, Francis P. BAYLIS, Diana ELINE, Avery ROSEGAY, Henry MERIWETHER a Theodore A. JACOB, 1990. Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **38**(11), 2072–2078. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf00101a015

COLVILLE, Thomas P. a Joanna BASSERT, 2015. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. 3. vyd. B.m.: Elsevier. ISBN 9780323227988.

CRAVEN, J., H. BJØRN, D. HENNESSY, C. FRIIS a P. NANSEN, 2001. Pharmacokinetics of moxidectin and ivermectin following intravenous injection in pigs with different body compositions. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online]. **24**(2), 99–104. ISSN 01407783. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2885.2001.00309.x

DANAHER, Martin, Laurence C. HOWELLS, Steven R.H. CROOKS, Vesna CERKVENIK-FLAJS a Michael O'KEEFFE, 2006. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B* [online]. **844**(2), 175–203 [vid. 2017-08-19]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.035

DENBOW, R. M. a D. M. AKERS, 2013. *Anatomy and Physiology of Domestic Animals* [online]. 2. vyd. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-118-35638-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-9653-4

DENT, J A, M M SMITH, D K VASSILATIS a L AVERY, 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **97**(6), 2674–2679. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.6.2674

DOBSON, Robert J., Leo LEJAMBRE a Jennifer H. GILL, 1996. Management of anthelmintic resistance: Inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *International Journal for Parasitology* [online]. **26**(8–9), 993–1000 [vid. 2017-08-19]. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(96)80078-6

DOSTÁLEK, Miroslav, Eva JANOŠTÍKOVÁ, Jan JUŘICA a Lucie ZAHRADNÍKOVÁ, 2006. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1464-7.

FLEMING, Sherrill A., Tom CRAIG, Ray M. KAPLAN, James E. MILLER, Christine NAVARRE a Mike RINGS, 2006. Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online]. **20**(2), 435–444. ISSN 08916640. Dostupné z: doi:10.1111/j.1939-1676.2006.tb02881.x

- FRIEDECKÝ, David a K. LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. **20**(41), 152–157. ISSN 12107921.
- GONZÁLEZ CANGA, Aránzazu, Ana M. SAHAGÚN PRIETO, M. JOSÉ DIEZ LIÉBANA, Nélida Fernández MARTÍNEZ, Matilde Sierra VEGA a Juan J. García VIEITEZ, 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal* [online]. **179**(1), 25–37 [vid. 2017-08-19]. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tvjl.2007.07.011
- GUILLARME, Davy a Jean-Luc VEUTHEY, ed., 2012. *UHPLC in Life Sciences* [online]. B.m.: The Royal Society of Chemistry. RSC Chromatography Monographs. ISBN 978-1-84973-388-5. Dostupné z: doi:10.1039/9781849735490
- HOLČAPEK, M., KOLÁŘOVÁ, L. AND NOBILIS, M., 2008. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. **391**(1), 59–78. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-1962-7
- HOLČAPEK, Michal, 2017a. *Experimentální metody strukturálního výzkumu - Hmotnostní spektrometrie* [online] [vid. 2017-03-02]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf
- HOLČAPEK, Michal, 2017b. Hmotnostní analyzátory. *holcapek.upce.cz* [online]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf
- HOLČAPEK, Michal, 2017c. Ionizační techniky. *holcapek.upce.cz* [online] [vid. 2017-03-15]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf
- HOLČAPEK, Michal, 2017d. Spojení MS a separačních technik. *holcapek.upce.cz* [online] [vid. 2017-03-05]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojzeni_MS_separace.pdf
- HOLMES, P. H., 1987. Pathophysiology of nematode infections. *International Journal for Parasitology* [online]. **17**(2), 443–451. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/0020-7519(87)90120-2
- JACOBS, Dennis, Mark FOX, Lynda GIBBONS a Carlos HERMOSILLA, 2015. *Principles of Veterinary Parasitology*. 1. vyd. B.m.: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0470670422.
- JAMES, Catherine E, Amanda L HUDSON a Mary W DAVEY, 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* [online]. **25**(7), 328–335. ISSN 1471-5007. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2009.04.004
- KERBOEUF, Dominique a Jacques AYCARDI, 1999. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. *Parasitology Research* [online]. **85**(8–9), 713–718. ISSN 00443255. Dostupné z: doi:10.1007/s004360050620
- KLIMEŠ, Jiří, Jaroslav SOCHOR, Milan MOKRÝ a Petr KASTNER, 2011. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 978-80-87009-29-1.

- LÁZNIČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK, 2008. *Základy fyzikální chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1511-0.
- LESPINE, A., F. BREE, F. BASSISSI, JF. SUTRA, JP TILLEMENT a M ALVINERIE, 2003. Binding of ivermectin and moxidectin to the plasma lipoproteins. In: *EAVPT Congress* [online]. Dostupné z: <http://prodinra.inra.fr/record/145472>
- LIFSCHITZ, A., G. VIRKEL, A. PIS, F. IMPERIALE, S. SANCHEZ, L. ALVAREZ, R. KUJANEK a C. LANUSSE, 1999. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Veterinary Parasitology* [online]. **86**(3), 203–215 [vid. 2017-08-19]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4017(99)00142-9
- LO, Pan-Kan Albert, David W. FINK, James B. WILLIAMS a Jack BLODINGER, 1985. Pharmacokinetic Studies of Ivermectin: Effects of Formulation. *Veterinary research communications* [online]. **9**(4), 251–268. ISSN 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- LUMARET, Jean-Pierre a Faiek ERROUISSI, 2002. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet. Res* [online]. **33**(5), 547–562. ISSN 09284249. Dostupné z: doi:10.1051/vetres:2002038
- MARRINER, S E, I MCKINNON a J A BOGAN, 1987. The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **10**(2), 175–179. ISSN 1365-2885. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.1987.tb00097.x
- MCMMASTER, Marvin C., 2005. *LC/MS A PRACTICAL USER'S GUIDE*. ISBN 978-0-471-65531-2.
- MENDELOVA UNIVERZITA, 2017a. Chov ovcí. web2.mendelu.cz [online] [vid. 2017-08-08]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1045&typ=html
- MENDELOVA UNIVERZITA, 2017b. Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek. *NanoBioMetalNet CZ.1.07/2.4.00/31.0023* [online] [vid. 2017-02-20]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova_chromatografie_s_ruznymi_typy_detekce_pro_analyzu_biologicky_vyznamnych_latek.pdf
- MOLENTO, M. B., A. LIFSCHITZ, J. SALLOVITZ, C. LANUSSE a R. PRICHARD, 2004. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research* [online]. **92**(2), 121–127. ISSN 09320113. Dostupné z: doi:10.1007/s00436-003-1022-3
- MORTIER, Leen, Els DAESELEIRE a Philippe DELAHAUT, 2003. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. **483**(1–2), 27–37 [vid. 2017-08-19]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(02)01365-X

- NOBILIS, M., M. HOLČAPEK, L. KOLÁŘOVÁ, J. KOPECKÝ, M. KUNEŠ, Z. SVOBODA a J. KVĚTINA, 2004. Identification and determination of phase II nabumetone metabolites by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. **1031**(1–2), 229–236. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.01.031
- PAUDEL, Amrit, V KUMAR a Saranjit SINGH, 2007. Mass Spectrometry in Pharmaceutical Analysis. *Pharmbit* [online]. **15**, 1–14. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/261175008>
- PEREZ, R., C. PALMA, I. CABEZAS, M. ARANEDA, L. RUBILAR a M. ALVINERIE, 2006. Effect of Parasitism on the Pharmacokinetic Disposition of Ivermectin in Lambs. *Journal of Veterinary Medicine Series A* [online]. B.m.: Blackwell Verlag GmbH, **53**(1), 43–48 [vid. 2017-08-19]. ISSN 0931-184X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0442.2006.00785.x
- PÉREZ, R., C. PALMA, M. J. NÚÑEZ, J. COX a M. ARBOIX, 2007. Pharmacokinetics of ivermectin in pregnant and nonpregnant sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, **31**(1), 71–76 [vid. 2017-08-19]. ISSN 01407783. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.2007.00926.x
- PUGH, D. G. a A. Nickie BAIRD, 2012. *Sheep and Goat Medicine* [online]. ISBN 9781437723533. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-60474-8
- REECE, William O., 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3282-4.
- REW, Robert S. a Jozef VERCRUYSSSE, 2002. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy* [online]. ISBN 0851996175. Dostupné z: doi:10.1079/9780851996172.0000
- SAMUEL, Koppara, Wenji YIN, Ralph A. STEARNS, Yui S. TANG, Ashok G. CHAUDHARY, James P. JEWELL, Thomas LANZA, Linus S. LIN, William K. HAGMANN, David C. EVANS a Sanjeev KUMAR, 2003. Addressing the metabolic activation potential of new leads in drug discovery: A case study using ion trap mass spectrometry and tritium labeling techniques. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **38**(2), 211–221. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.434
- SKÁLOVÁ, Lenka, Iva BOUŠOVÁ, Petr PÁVEK a Miroslav MACHALA, 2011. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1917-0.
- SMITH, James M a Roger K PRICHARD, 2002. Localization of p-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *The Journal of parasitology* [online]. **88**(3), 612–620. ISSN 0022-3395. Dostupné z: doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0612:LOPGMI]2.0.CO;2
- SOTIRCHOS, Irene M., Amanda L. HUDSON, John ELLIS a Mary W. DAVEY, 2008. Thioredoxins of a parasitic nematode: Comparison of the 16- and 12-kDa thioredoxins from *Haemonchus contortus*. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **44**(12), 2026–2033 [vid. 2017-08-19]. ISSN 08915849. Dostupné

z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.007

STRONG, L. a S. JAMES, 1993. SOME EFFECTS OF REARING THE YELLOW DUNG FLY SCATOPHAGA-STERCORARIA IN CATTLE DUNG CONTAINING IVERMEC. *VETERINARY PARASITOLOGY* [online]. **63**(1), 39–45. ISSN 00138703. Dostupné z: doi:10.1111/j.1570-7458.1992.tb02417.x

THOMAZ-SOCCOL, Vanete, Felipe POHL DE SOUZA, Cristina SOTOMAIOR, Edilene ALCÂNTARA CASTRO, Viviane MILCZEWSKI, Giovani MOCELIN a Maria DO CARMO PESSOA SILVA, 2004. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Resistance of Gastrointestinal Nematodes to Anthelmintics in Sheep (*Ovis aries*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. **47**(1), 41–47. ISSN 1516-8913. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-89132004000100006

USKVBL, 2011. *Souhrn údajů o přípravku* [online] [vid. 2017-04-02]. Dostupné z: www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780095114.doc

VADLEJCH, Jaroslav a Iva LANGROVÁ, 2014. *Gastrointestinální hlístice ovčí*. 1. vyd. Praha: Powerprint. ISBN 978-80-87994-20-7.

VOKŘÁL, Ivan, Veronika JEDLIČKOVÁ, Robert JIRÁSKO, Lucie STUHLÍKOVÁ, Hana BÁRTÍKOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ, Jiří LAMKA, Michal HOLČAPEK a Barbora SZOTÁKOVÁ, 2013. The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology* [online]. **140**(3), 361–367. ISSN 1469-8161. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182012001680

WOLSTENHOLME, Adrian J., Ian FAIRWEATHER, Roger PRICHARD, Georg VON SAMSON-HIMMELSTJERNA a Nicholas C. SANGSTER, 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* [online]. **20**(10), 469–476 [vid. 2017-08-19]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2004.07.010