

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DIPLOMOVÁ PRÁCE

K FARMAKOKINETICE
JEDNORÁZOVÉHO PODÁNÍ
ALBENDAZOLU U MUFLONA

Katedra: farmakologie a toxikologie

Školitel: prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Vedoucí katedry: prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček, CSc.

Hradec Králové, 2008

Ivan Vokřál

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za pomoci vedoucího diplomové práce, s použitím citované literatury, ostatních informačních zdrojů a výsledků vlastního šetření, které jsou uvedeny v této práci.

V Holohlavech dne 20.5. 2008

Ivan Vokřál

Poděkování :

Považuji za svou milou povinnost poděkovat panu prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc za odborné a organizační vedení při zpracování této práce. V neposlední řadě patří můj dík také paní doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a paní doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za cenné a věcné připomínky a rady při zpracovávání této práce. Za rady ohledně HPLC analýzy pak děkuji také panu Mgr. Viktoru Cvilinkovi.

ABSTRAKT

Jméno: Ivan Vokřál

Název diplomové práce: K farmakokinetice jednorázového podání albendazolu u muflona

Abstrakt:

Tato práce se snaží přispět k poznatkům o farmakokinetice albendazolu u muflona evropského (*Ovis gmelini musimon*) po jednorázovém podání albendazolu v dávce 30 mg/kg. Byly provedeny dva experimenty. První experiment byl uskutečněn na souboru 12 zvířat, ta byla rozdělena do 4 skupin. Jednotlivé skupiny zvířat byly postupně utráceny v intervalu 4, 6, 8 a 10 hodin od podání albendazolu. Odebrány byly vzorky séra, žluče ze žlučníku a žlučvodů. Koncentrace albendazolu (ABZ) a metabolitů albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSO₂) byly měřeny pomocí HPLC metody. Pro zjištění poměru jednotlivých enantiomerů ABZSO pak byla použita HPLC metoda s chirální kolonou. Druhý experiment na 2 zvířatech měl pouze rozšířit a potvrdit předchozí výsledky.

Z výsledků studie je patrný vzestup krevních koncentrací albendazolu a jeho metabolitů až do osmé hodiny po podání. Následně je již patrný pokles. Koncentrace ABZSO a ABZSO₂ se mezi žlučí ze žlučníku a žlučvodů liší minimálně. Průměrná maximální koncentrace ABZSO ve žluči je 3,6 µg/ml pro žlučník a 3,3 µg/ml žlučvodů. Poměr enantiomerů ABZSO (-) a ABZSO (+) je ve všech vzorcích posunut výrazně k ABZSO (+). Poměr enantiomerů v průběhu sledování není konstantní.

Klíčová slova : albendazol, *Ovis musimon*, farmakokinetika, HPLC

ABSTRACT

Name: Ivan Vokřál

Title: On pharmacokinetic of single administration of albendazole in mouflon (*Ovis musimon*)

Abstract:

This diploma thesis contributes to the knowledge of albendazole pharmacokinetics in mouflon (*Ovis gmelini musimon*) treated by a single administration of albendazole in a dose of 30,0 mg/kg of body weight. Two separate experiments were realised. The first one was carried out on 12 mouflon ewes divided into 4 groups. Groups of the animals were gradually culled at the time intervals of 4, 6, 8 and 10 hours after the albendazole administration. The samples of the blood (serum), bile from gallbladder and terminal bile ducts were withdrawn. The concentration of albendazole (ABZ) and its major metabolites albendazolsulphoxide (ABZSO) and albendazolsulphone (ABZSO₂) were determined in samples of biological materials by HPLC method. To determine the ratio of ABZSO enantiomers, the HPLC method with chiral column was used. The second experiment carried on 2 animals (time interval 6 hours) extended and partially confirmed previous results.

The increase in blood concentrations of albendazole and its metabolites until the eighth hour after the administration is evident. In later time intervals decrease in concentrations was documented. The concentrations of ABZSO and ABZSO₂ between the bile from the gallbladder and the bile ducts differ minimally. The average maximum concentration of ABZSO in the bile is 3.6 µg/ml for gallbladder and 3.3 µg / ml for bile ducts. The ratio of enantiomers ABZSO (-) and ABZSO (+) is shifted significantly to ABZSO (+) in all the samples. The found ratio of enantiomers in individual time intervals is not constant.

Key words : albendazole, *Ovis musimon*, farmakokinetics, HPLC

Obsah

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 OVIS MUSIMON	8
2.1.1 Rozšíření.....	8
2.1.2 Popis zvířete	9
2.1.3 Choroby muflona.....	11
2.1.3.1 Vnitřní parazitární onemocnění u muflona.....	12
2.1.3.2 Vnější parazitární onemocnění u muflona	15
2.2 DIKROCELIÓZA	17
2.2.1 Původce onemocnění.....	17
2.2.2 Epidemiologie a prevalence	18
2.2.3 Symptomatologie.....	19
2.2.4 Diagnostika.....	19
2.2.5 Profylaxe a léčba	19
2.3 BENZIMIDAZOLOVÁ ANTHELMINTIKA.....	21
2.3.1 Chemická struktura a mechanismus účinku	21
2.3.2 Albendazol.....	26
2.3.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	26
2.3.2.2 Farmakokinetika	26
2.3.2.3 Dávkování.....	29
2.3.2.4 Přípravky obsahující albendazol v ČR	30
3. CÍL PRÁCE	31
4. MATERIÁL A METODIKA.....	32
4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA	32
4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	33
4.3 METODIKY	34
4.3.1 Příprava vzorků	34
4.3.1.1 Experiment č. 1	34
4.3.1.2 Experiment č. 2.....	35
4.3.2 extrakce	35
4.3.3 HPLC analýza.....	36
4.3.3.1 Achirální analýza vzorků.....	36
4.3.3.2 Chirální analýza vzorků.....	39
5. VÝSLEDKY	41
5.1 ŽLUČ - ŽLUČNÍK	41
5.2 ŽLUČ - ŽLUČOVODY	42
5.3 SÉRUM.....	44
5.4 STEREOSPECIFITA BIOTRANSFORMACE ABZ NA ABZSO	45
6. DISKUSE.....	47
6.1. Farmakokinetika albendazolu a jeho metabolitů.....	47
6.2. Porovnání naměřených hodnot mezi žlučí ze žlučníku a žlučvodů	48
6.3. Stereospecifita biotransformace albendazolu na albendazolsulfoxid	49
7. ZÁVĚR	50
POUŽITÁ LITERATURA.....	51
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

1. ÚVOD

V dnešní době, kdy je celosvětovým problémem nedostatek potravin a mnoha zemím hrozí hladomory, se léčba parazitárních chorob jeví jako velmi důležitá a jakékoliv poznatky, které mohou přispět ke snížení hospodářských úbytků zvěře jako velmi prospěšné. Mezi druhy, které nabývají v poslední době na hospodářském významu se objevuje také muflon.

Muflon evropský (*Ovis gmelini musimon*), který je v Evropě druhem poměrně mladým, se v posledních několika dekádách stal velice významnou a žádanou lovnou zvěří a také významným hospodářským zvířetem, které můžeme potkat v mnoha oborních a zájmových chovech. Skutečnost, že zvířata jsou v uzavřených chovech sebou nese i mnoho problémů, zvláště pak problémů týkajících se zdravotního stavu zvěře. Z hlediska muflona je také celkem problematická jeho příbuznost s ovci domácí a to z důvodu přenosu mnoha onemocnění a zvláště pak parazitárních. Často je muflon chován na místech dřívějších chovů ovcí a nákazy muflonů jsou tak rychlé a často značné.

Parazitární onemocnění jsou tak neustále v popředí zájmu odborné veřejnosti. V poslední době dochází u parazitů k nárůstu rezistence proti některým léčivům a následkem toho k hospodářským ztrátám. Rezistence se tak stává celosvětově poměrně velkým problémem. Problémem je také omezený počet léčivých látek a fakt, že se jedná o zvířata určená často pro produkci masa. Z tohoto důvodu je také důležité znát farmakokinetiku léčiv užívaných k léčbě parazitóz. Zvolením správné dávky a správného léčiva je po té možno omezit a předcházet vzniku rezistence. Celkově se však dá říci, že bez znalosti farmakokinetiky léčiva v těle zvířete je velmi obtížné získat povědomí o správném dávkování, které je pro tuto prevenci velmi důležité.

Tato práce si klade za cíl přispět k poznatkům o farmakokinetice léčiv z rodiny benzimidazolů u muflona evropského (*Ovis gmelini musimon*). Sledovaným léčivem je albendazol, který se osvědčil jako dobré a spolehlivé léčivo v mnoha studiích a který působí na mnoho vnitřních parazitů. Mnoho prací se zabývalo *in vitro* studiemi, avšak ucelená studie *in vivo* doposud chybí. Tato práce si klade za cíl tuto mezeru alespoň z části zaplnit.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 OVIS MUSIMON

Systematické zařazení muflona (Tomiczek, Tücke, 2007):

Třída:	<i>Mammalia</i> , Linnaeus, 1758	Savci
Podtřída:	<i>Theria</i> , Parker a Haswell, 1897	Živorodí
Nadřád:	<i>Eutheria</i> , Gill, 1872	Placentálové
Řád:	<i>Artiodactyla</i> , Owen, 1884	Sudokopytníci
Podřád:	<i>Ruminantia</i> , Scopoli, 1777	Přežvýkaví
Nadčeleď:	<i>Bovidae</i> , Simpson, 1931	Dutorozí
Čeleď:	<i>Bovidae</i> , Gray, 1821	Turovití
Podčeleď:	<i>Caprinae</i> , Gill, 1872	Kozy a ovce
Tribus:	<i>Caprini</i> , Simpson, 1945	Kozy
Rod:	<i>Ovis</i> , Linnaeus, 1785	Ovce
Druh:	<i>Ovis orientalis</i> , Gmelin, 1774	Ovce mufloní
Poddruh:	<i>Ovis gmelini musimon</i> , Pallas, 1811	Muflon

2.1.1 Rozšíření

Evropský muflon (*Ovis gmelini musimon*) je nejmenším zástupcem druhu divokých ovcí. Jeho výskyt zasahuje prakticky celou Evropu, Českou Republiku nevyjímaje. Ostatní druhy a rody této divoké ovce mají zastoupení v zemích od Evropy, přes celou Asii, až k Aljašce. Prapůvodní domovinou jsou pravděpodobně náhorní plošiny vnitřní Asie, ze kterých se později migrací rozšířily tyto druhy po téměř celé severní polokouli.

Jako místo původu evropského muflona bylo dlouho považováno souostroví Sardinie a Korsiky, avšak vědecké výzkumy ukázaly, že místo skutečného původu leží v oblasti spojnice mezi Kaspickým mořem a Perským zálivem v Přední Asii. V této oblasti také dnes žije několik příbuzných druhů jako anatolská divoká ovce (*Ovis gmelini gmelini*, Blyth, 1841), isfahánský muflon (*Ovis gmelini isphahanica*, Nasonov, 1910) a další. Na evropském kontinentu je však evropský muflon jediným zástupcem divokých ovcí.

Do celé Evropy se muflon evropský začal rozšiřovat masivně až v průběhu osmnáctého a devatenáctého století. Jednalo se však hlavně o oborní chovy. V roce 1883 bylo na Slovensku z obory v Jelenci vysazeno 100 kusů tohoto druhu do volné přírody oblasti Ponitří, kde se začal poměrně rychle množit. Muflon se tak postupně dostal do volné přírody celé Evropy. V současné době je v Evropě běžným druhem chovaným v

oborních chovech ale také druhem celkem hojně se vyskytujícím ve volné přírodě (Tomiczek a Tücke, 2007).

2.1.2 Popis zvířete

Muflon evropský je stavbou těla robustní zvíře, pokryté krátkou srstí s jarním zbarvením žlutohnědé až červenohnědé, v zimním období pak tmavohnědé. Pohlaví muflona lze rozlišit poměrně snadno, kdy muflonka je oproti muflonovi menší, nemá tak pestře zbarvenou srst.

Velikostně se dá toto zvíře přirovnat k ovci domácí, avšak hmotnost i výška závisí na mnoha faktorech jako jsou potrava, podnebí, zdravotní stav a další vlivy. Tělesné hodnoty pro muflona na evropské pevnině jsou v průměru takovéto: tělesná délka 95-130 cm, tělesná výška 75-90 cm, hmotnost 33-58 kg. Pro muflonky, které se od muflona vzrůstem a tělesnou stavbou liší jsou pak tyto hodnoty nižší a to: tělesná délka 85-115 cm, tělesná výška 70-80 cm, hmotnost 22-35 kg (Lochman a Tomiczek, 1979). Ojedíněle se mohou vyskytovat větší odchylky právě v závislosti na okolních podmínkách.

Typické je pro evropského muflona také zbarvení, které je ze všech divokých ovcí nejpestřejší a díky němuž má přirozenou ochranu proti predátorům. V oblastech původního rozšíření a v oblastech Evropy pokrytých listnatými lesy je toto ochranné zbarvení velice účinné, avšak v oblastech pahorkatin a subalpínských lesů již ztrácí svou funkci. Základní barva jarní srsti je světle hnědá až rezavě červená. Zimní pak tmavší kaštanová hněd'. Muflonky bývají méně výrazné bledší barvy se šedavými odstíny. Růst a výměna osrstění jsou pak podmíněny geneticky a ovlivněny fotoperiodicitou v závislosti na klimatu.

Mezi výrazné znaky muflona patří obličejová maska, brýle a také toulce. Maska je bílé barvy a táhne se od svíráku směrem k očím. Někdy se tento znak používá k určení stáří muflona. Brýlemi se rozumí světlé až bílé orámování očí. Důležitým znakem muflona jsou pak toulce, které u mufloních beranů začínají vyrůstat mezi třetím až pátým měsícem života. Tyto toulce užívá muflon jako zbraň při soubojích. Od třetího roku se na toulcích tvoří velmi výrazné prstence, avšak po pátém se jejich hloubka a šířka snižuje a jejich rozeznání je tak těžší. Omezení intenzity v růstu toulců, které jinak dorůstají po celý život jedince, jsou přibližně od listopadu do přelomu března a dubna.

Při těchto přestávkách vznikají takzvané roční vruby, podle kterých lze zjistit věk muflona. Toulce jsou ale také jedním z indikátorů zdravotního stavu muflona. Při závažných orgánových onemocněních, nebo při vnitřních parazitózách (motolice ovčí, strongylóza) dochází ke zpomalení a nepravidelnému růstu toulců (Tomiczek a Türcke, 2007).

Aktivita muflona jako zvířete žijícího ve volné přírodě se dá rozdělit do denních a ročních cyklů. Mufloní denní aktivita začíná s východem slunce, nejvyšší je však odpoledne a před západem slunce. Tento čas je rozdělen do třech pastevních cyklů, které se svou dobou liší v závislosti na roční době a růstu vegetace (Bubeník, 1959). V ročním cyklu žije mufloní zvěř od jara do podzimu v tlupách odděleně podle pohlaví. Někdy se však vyskytují s muflonkami i mladí mufloni, které lze s velkou pravděpodobností pokládat za loňská muflončata. Starší mufloni vytvářejí samostatné menší skupinky, nebo žijí kromě doby říje zcela samotářsky. Během doby říje se pak připojují samci k tlupám muflonek a také v zimě jsou obě pohlaví pohromadě. Pokud tlupa přechází, vede ji zpravidla nejzkušenější a nejopatrnější muflonka, která dá v případě nebezpečí signál hvízdnutím. Normální dorozumivací hlas je u muflonů (stejně jako u ovcí) bečení (Kolda a kol., 2004).

Období říje u muflona probíhá od října do listopadu. Březost trvá 22 týdnů, po kterých se muflonka na čas oddělí z tlupy a porodí jedno až dvě jehňata. Ta začínají přijímat zelenou potravu již za dva týdny a mateřské mléko sají v průměru do půl roku. Období dospělosti dosahuje jedinec po osmnácti měsících. Beraní se do reprodukce zapojují aktivně až ve třech letech (Červený a kol., 2004).

Mufloni bývají věrní k jednomu stanovišti po tak dlouhou dobu, jak dovolí vnější okolnosti. V kulturní přírodě tvoří bariéry často silnice, železniční tratě a vodní toky. V přírodě, kde lidské stavby nevyskytují jsou to pak horské hřebeny, jezera a oblasti bez vegetace (Tomiczek a Türcke, 2007).

Složení potravy je u muflona velice různorodé a závisí na prostředí ve kterém se nachází. Skládá se různých druhů bylin, travin, zemědělských plodin, výhonků, plodů a také kůry lesních dřevin. Způsob braní potravy odpovídá spíše kozám a dokládá tím příbuznost k tomuto druhu (Tomiczek a Türcke, 2007).

V poslední době se muflon stává také významným hospodářským zvířetem (farmové a zájmové chovy), což, vzhledem k zvýšené intenzitě chovu, je okolnost ještě výrazněji spojená s problematikou parazitóz a jejich léčbou. Jelikož muflon u nás patří k žádané

lovné zvěři, jejíž trofeje jsou známé po celém světě, bylo by dobré zde také uvést, jaká je povolená doba lovu muflona v České republice. Pro muflona je tato doba stanovena zákonem na rozmezí od 1. srpna do 31. prosince. Výjimku pak mají oborní chovy, ve kterých je lov umožněn po celou dobu roku (vyhláška 245/2002).

2.1.3 Choroby muflona

Jako každý živočich, i muflon podléhá celé řadě onemocnění. Krom virových, bakteriálních a plísňových onemocnění, které se v poslední době vyskytují okrajově, podléhá muflon celé řadě parazitárních onemocnění. Parazitární onemocnění jsou nebezpečná jak z hlediska zvířete, tak z hlediska člověka, kdy některé mohou být na člověka přenosné. Nákaza zvíře vyčerpává a pokud není v dobrém zdravotním stavu, může docházet k úhynům a úbytkům na stavech. Jde-li o chovy oborní, lze předpokládat zvýšenou možnost nákazy, proto by v takovýchto chovech mělo docházet k preventivním opatřením. Důležité je na tomto místě také zmínit skutečnost, že většina parazitárních nákaz je díky příbuznosti muflona evropského a ovce domácí mezi těmito druhy přenosná (Páv a kol., 1981).

Přehledová tabulka č. 1 ukazuje možné nákazy muflona vnitřními parazity. V tabulce jsou uvedeny druhové jméno a lokalizace nákazy v těle muflona.

Tabulka. č. 1.: Vnitřní parazité mufloní zvěře (Tomiczek a Tücke, 2007, Páv, 1981)

<i>Druh parazita</i>	<i>Lokalizace parazita</i>
<i>Ashwortius sidemi</i>	Slez
<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Tenké střevo
<i>Capillaria bovis</i>	Tenké střevo
<i>Capillaria longipes</i>	Tenké střevo
<i>Coenurus cerebralis / Multiceps multiceps</i>	Mozek
<i>Cooperia bisonis</i>	Tenké střevo
<i>Cooperia curticei</i>	Tenké střevo
<i>Cooperia oncophora</i>	Tenké střevo
<i>Cooperia pectinata</i>	Tenké střevo
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Játra
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	Plíce
<i>Eimeria ah-sa-ta</i>	Tenké střevo
<i>Eimeria arloingi</i>	Tenké střevo
<i>Eimeria crandalis</i>	Tenké střevo
<i>Eimeria faurei</i>	Tenké střevo
<i>Eimeria intiricata</i>	Tenké střevo, kyčelník
<i>Eimeria ninae-kohl-yakimovae</i>	Tenké střevo, kyčelník
<i>Eimeria ovina</i>	Tenké střevo

<i>Eimeria parva</i>	Tenké střevo, kyčelník
<i>Fasciola hepatica</i>	Játra
<i>Haemoncus contortus</i>	Slez
<i>Chabertia ovina</i>	Tlusté střevo
<i>Moniezia enedeni</i>	Tenké střevo
<i>Moniezia expansa</i>	Tenké střevo
<i>Müllerius capillaris</i>	Plíce

Pokračování tabulky č.1.

<i>Nematodirus filicollis</i>	Tenké střevo
<i>Nematodirus spathiger</i>	Tenké střevo
<i>Neostrongylus linearis</i>	Plíce
<i>Oesophagostum columbianum</i>	Slepé střevo
<i>Oesophagostum venulosum</i>	Slepé střevo
<i>Ostertagia circumcincta</i>	Slez
<i>Ostertagia leptospicularis</i>	Slez
<i>Ostertagia ostertagi</i>	Slez
<i>Ostertagia pinnata</i>	Slez
<i>Ostertagia trifurcata</i>	Slez
<i>Paramphistomum sp.</i>	Bachor, tenké střevo
<i>Protostrongylus kochi</i>	Plíce
<i>Sarcocystis tenella</i>	Svalovina
<i>Skrjabinagia kolchida</i>	Slez
<i>Spiculoptera Böhmi</i>	Slez
<i>Spiculoptera spiculoptera</i>	Slez
<i>Taenia hydatigena / Cysticercus tenuicollis</i>	Střevo, plíce, bachor, slezina
<i>Toxoplasma gondii</i>	Játra, plíce, slezin, mozek
<i>Trichostrongylus axei</i>	Slez, tenké střevo
<i>Trichostrongylus capricola</i>	Slez, tenké střevo
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Tenké střevo
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Tenké střevo
<i>Trichuris capreoli</i>	Slepé střevo
<i>Trichuris globulosa</i>	Slepé střevo
<i>Trichuris ovis</i>	Slepé střevo

2.1.3.1 Vnitřní parazitární onemocnění u muflona

Eimerióza

Kokcidióza je protozoózou napadající střevní sliznici. Nálezy se objevují v trusu nebo v obsahu střeva. Běžně dochází k přenosu mezi ovce a muflonem. U muflona se nalézají druhy *Eimeria ahsata*, *E. arloingi*, *E. faurei*, *E. crandalis*, *E. intricata*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. parva*, *E. ovina*. U muflona v oborním chovu bývá rozšíření až 100%. V honitbách je to okolo 75-80 %. To je dáno stádovým způsobem života muflonů. K nákaze kokcidiemi dochází hlavně v zimních měsících a je proto nutné dávat důraz na preventivní opatření. Toto onemocnění vede u oborní zvěře k úhynům muflončat (Páv a kol., 1981).

Sarkocystóza

Napadá až 28 % populace muflonů. Jedná se o vývojová stadia kokcií blízkých rodu *Isospora*, u mufloní zvěře je prokazován druh *Sarcocystis tenella*. Nákaza se pozná často až po ulovení jako bělavá místa ve svalovině. Takto napadené maso lze konzumovat jen po dokonalé tepelné úpravě, protože je zde podezření přenosu na člověka (Blažek a kol., 1976).

Toxoplazmóza

U mufloní zvěře bylo pozorováno 25% napadení. Toto onemocnění je způsobeno parazitem *Toxoplasma gondii* a vyskytuje se ve formě cyst a pseudocyst (Páv a kol., 1981).

Motoličnatost

Motoličnatost je u muflona jednou ze závažnějších nákaz. Prakticky lze u muflona najít dva druhy motolic. Motolice jaterní - *Fasciola hepatica* působící fasciolózu a motolice kopinatá - *Dicrocoelium dendriticum* působící dikroceliózu. Obě dvě mají poměrně složitý cyklus rozmnožování přes meziphostitele. U motolice jaterní je přirozeným prostředím vlhká pastvina s vyskytující se plžem bahnatkou malou (*Galba truncatula*). Naproti tomu u motolice kopinaté je přirozeným prostředím suchá oblast s tvrdým vápenitým podkladem a dva meziphostitelé – plži rodů *Zebrina*, *Helicella*, *Theba* a mravenců *Formica fusca* a *Formica rufibarbis*. U muflona je nákaza v populaci často vysoká, o to vyšší, jsou-li, nebo byly-li v okolí chovány ovce, které jsou taktéž hostitelky těchto parazitů. Může se jednat až o 70 %. Při mírné nákaze není onemocnění na první pohled patrné. Při silných napadeních motolicemi však pozorujeme vyhublost a v nejhroších případech, hlavně u motolice jaterní, také úhyny (Páv a kol., 1981, Kotrlá a kol., 1984).

Plicnivky

Mezi velmi časté parazitární onemocnění u muflona patří plicní červivost. Mezi zástupci velkých plicnivek to je hlavně plicnivka jelení (*Dictyocaulus viviparus*) (délka 80 mm) vyskytující se u muflona v 1% procentu případů. Tato plicnivka má vývoj přímý bez meziphostitele.

Z malých druhů plicnivek to pak jsou *Müllerius capillaris* (délka 30 mm) a *Protostrongylus rufescens* (délka 40 mm). První u muflona ve 36% případů, druhá

pak v 5% případů. Oba tyto druhy také parazitují na ovci domácí. Samci jsou u plicnívek co do délky přibližně poloviční oproti samicím. Malé druhy plicnívek mají vývoj nepřímý a potřebují tedy hostitele, kterými jsou v tomto případě suchozemští i vodní plži a slimáci.

Larvy po pozření pronikají slizniční vrstvou tenkého střeva do mizních cév a lymfatických uzlin. Mizními i krevními cestami jsou pak zaneseny do plicní tkáně. Larvy, stěhující se po plicích, rozrušují plicní tkán a způsobují tak překrvení a četné záněty. To má vliv na vitalitu zvěře. Při silných infekcích zvláště velkých druhů plicnívek pak dochází také k úhynům (Páv a kol., 1981).

Boubele tasemnic

U muflonů stejně jako u jiné spárkaté zvěře lze často objevit také boubele tasemnic, které v dospělosti cizopasí na masožravcích. U muflona se objevují hlavně boubele tasemnice vroubené (*Taenia hydatigena*), ty dosahují i velikosti slepičího vejce a jsou zavěšeny na orgánech jako průhledné měchýřky vyplněné tekutinou. Jako cílový druh jsou u této tasemnice psi a jiní masožravci. U muflonů se může nacházet až v 6 % případů. Další boubel, která se vyskytuje často u muflona je boubel tasemnice *Multiceps multiceps* a to *Coenurus cerebralis*. Nalézá se v mozku postižených zvířat, kde dorůstá až velikosti vlašského ořechu. K projevům patří významné změny v chování zvěře, které vede až k úhynu postiženého kusu (Páv a kol., 1981).

Tasemnice

U muflona nacházíme dva druhy tasemnic, tasemnici srnčí (*Moniezia benedeni*) a tasemnici ovčí (*Moniezia expansa*). U druhé zmíněné je muflon jediným hostitelem mezi spárkatou zvěří (Páv a kol., 1981).

Hlístice

a) slézová červivost: se vyskytuje všude ve světě zvláště v chovech ovcí. Toto onemocnění je však dobře přenosné také na spárkatou zvěř. Mezi nejnebezpečnější patří vlasovka slézová (*Haemonchus contortus*) která se u muflona vyskytuje v 12% případů.

Dalším rodem parazitujícím ve slézu u muflona je rod *Spiculoptera*. Z druhů pouze *Spiculoptera spiculoptera*.

b) červivost slézu a tenkého střeva: Vlasovky z rodu *Trichostrongylus* parazitují jak ve slézu, tak také v tenkém střevě, kde se živí hlenem a tkání sliznice. U muflona jsou známy nákazy *Trichostrongylus axei*, *T. columbiformis*, *T. vitrinus* a vzácně také *T. capricola*.

Z této skupiny dalším druhem jsou vlasovky rodu *Ostertagia*. Z druhů napadajících muflona to jsou *O. leptospicularis*, *O. circumcincta*, *O. ostertagi* a vzácněji *O. trifurcata*.

c) červivost tenkého střeva: V tenkém střevě parazitují krom rodů *Trichostrongylus* a *Ostertagia* také vlasovky z rodu *Nematodirus*. U muflona jsou to druhy *N. spathiger* a *N. filicollis*.

Vzácně se vyskytuje u muflona v tenkém střevě parazitující háďě dobytčí (*Strongyloides papillosus*). U tohoto parazita je zvláštností způsob průniku do hostitelského organismu, kdy tento parazit přestupuje do těla zvířete přes kůži.

Dalším parazitem, vyskytujícím se vzácně je pak kapilárie dobytčí (*Capillaria bovis*)

d) červivost tlustého střeva: Mezi nejčastější parazity tlustého střeva patří zubovky. Jsou to hlavně druhy zubovka ovčí (*Chabertia ovina*) a rod *Oesophagostomum*, ze kterého napadá muflona druh *O. columbianum*. U obou těchto druhů probíhá vývoj bez mezihostitele. Při napadení zubovkou ovčí (*Chabertia ovina*) způsobuje její larvální stádium katarální zánět střeva, v dospělosti pak poškozují sliznici střeva. Při napadení druhem *O. columbianum* dochází v larválním stádiu k uzlíčkovitému onemocnění střeva, které vyvolávají larvy pronikající do stěny tlustého střeva. Dospělí jedinci tohoto parazita pak žijí volně v tlustém nebo slepém střevu a živí se hlenem sliznice.

V slepém střevě můžeme u muflona nalézt také hlístice z rodu tenkohlavců (*Trichocephalus*). Jejich vývoj probíhá jako v předešlém případě bez mezihostitele. Ve slepém střevě se zavrtávají do sliznice a živí se zde krví. Při tom produkují toxiny, které mohou vyvolávat nervové příznaky. U muflona se setkáváme s druhem *Trichocephalus ovis* (Páv a kol., 1981).

2.1.3.2 Vnější parazitární onemocnění u muflona

U muflona můžeme také nalézt zástupce mnoha vnějších parazitů. Jelikož však nejsou hlavním cílem této práce, jsou zde zmíněni pouze okrajově.

Střečkovitost

Střečkovitost rozlišujeme u zvěře podkožní nebo nosohltanovou. Podkožní střečkovitost způsobuje u muflona střeček srnčí (*Hypoderma diana*). Na napadené zvěři jsou vidět v boule v podkoží, nacházející se po obou stranách hřbetu. Zvíře nákazou trpí a hubne. Často dochází k úhynům. Nosohltanovou střečkovitost způsobují střečci z rodu *Cephenomyia*. Napadány jsou hlavně mladé kusy. Nápadné je chraptění, kašel a pohazování hlavou. Nakažená zvěř je pohublá a málo vitální. Při velké nákaze může dojít až k zadušení nakaženého kusu. Jako preventivní opatření se jeví odstřel takto postižených kusů (Páv a kol., 1981).

Kloši

U muflona nacházíme kloše ovčího (*Melophagus ovinus*). Kloš se živí krví postiženého zvířete, na kterém probíhá jak vývojové stádium, tak stádium dospělce. Ojedinele může dojít k oslabení takto nakaženého zvířete (Páv a kol., 1981).

Všenky

U muflona zastoupeny druhem *Damalinea ovis*. Jedná se o drobného cizopasníka velikosti 1-2 mm. Živí se šupinami kůže, nebo drobnými úlomky srsti. Pobíháním mezi srstí zvěř spíše zneklidňují (Páv a kol., 1981).

Klíšťata

Častým vnějším parazitem bývá také klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které cizopasí nejen na muflonech, ale i na mnoha dalších druzích zvěře. Tento cizopasník se přichytává na kůži zvířat, ze které saje krev. Málo kdy je však nákaza natolik početná, aby došlo k vyhublosti zvířete nebo nedokrevnosti. Na druhé straně však nebezpečí tohoto parazita spočívá v možnosti přenosu virových nálezů a rozšiřování jejich ohnisek (Páv a kol., 1981).

2.2 DIKROCELIÓZA

2.2.1 Původce onemocnění

Původcem tohoto parazitárního onemocnění je motolice kopinatá *Dicrocoelium dendriticum* RUDOLPHI, 1803 (syn.: *Dicrocoelium lanceolatum*), nazývaná též „malá jaterní motolice“. Systematicky je zařazena do třídy *Trematoda – motolice*, čeleď *Dicrocoeliidae* (Buchar a kol., 1995).

Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*) má ploché tělo listovitého tvaru, které je průsvitné. Na délku měří 8-14 mm a na šířku pak 2-3 mm. Břišní přísavka je umístěna v polovině těla, za ní nalezneme kulovitou varlatu. Vaječník je umístěn v zadní části těla. Střed těla je vyplněn stromkovitě větvenou dělohou. (Jíra, 1998) Vajíčka motolice jsou oválná, tmavě hnědá, velikostní 38-45 μm na délku a 22-30 μm na šířku. Obsahují miracidium (Otranto a Traversa, 2002).

Tato motolice se vyskytuje prakticky na celém světě. Cizopasí ve žlučových cestách v játrech býložravých savců, zvláště ovcí, ale i skotu, koz nebo spárkaté zvěře. Vyskytuje se však i u psů a koček, vzácně také u člověka (Hanzák a kol., 1973). Ovce jsou k motolici kopinaté zvláště vnímavé, avšak díky příbuznosti je tato vnímavost převedena také na muflona. V některých zdrojích se uvádí i vliv věku hostitelského organismu na velikost nákazy (Manga a kol., 1991).

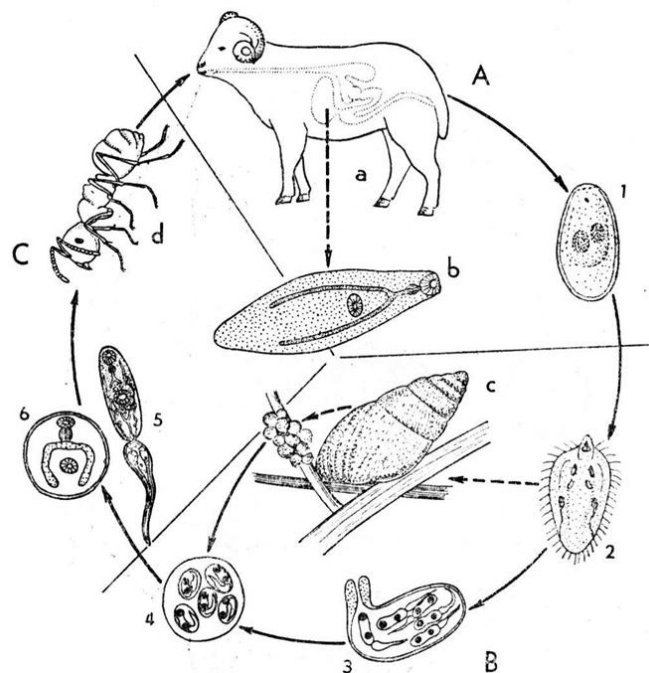
Vývojový cyklus motolice kopinaté je relativně složitý a zdlouhavý. Probíhá přes dva mezihostitele. Celý trvá přibližně 6 měsíců. Dospělí jedinci, kteří se nacházejí ve žlučových cestách, jsou hermafrodité, kteří mají jak samčí, tak samičí pohlavní orgány. Produkuje oplozená vajíčka, která se dostávají žlučovody do trávicího traktu a spolu s trusem ven z těla hostitele. Tato vajíčka obsahují miracidium a musí být pozřena prvním mezihostitelem. V tomto případě jsou to suchozemští plži rodu *Zebrina*, *Ena*, *Helicella*, *Theba* a další (Kratochvíl, 1973).

Stádium vývoje v plži trvá 3-4 měsíce. Během této doby se z miracidia tvoří asexuálně sporocysty první a druhé generace. Druhá generace formuje cercárie, které migrují do dýchací dutiny plže a odkud jsou společně se slizovitým sekretem vytlačeny ven dýchacím otvorem. Slizovitý obal chrání cercárie před vysušením.

Takto vzniklé cercárie jsou následně požití mravencem z rodu *Formica* (např. *F. fusca*, *F. pratensis*, *F. rufibarbis*). Zde se vyvíjejí v metacercárie. Cyklus v mravencích trvá obvykle dobu 1 – 2 měsíců. Některé cercárie (1-2) (Otranto a Traversa, 2002) jsou lokalizovány v subesofageálním nervovém gangliu. Tímto ovlivňují chování mravence a ten se při poklesu teploty pod 15°C nevrací do mraveniště, ale zůstává v křeči přichycen na vrcholcích rostli. Tímto se rapidně zvyšuje pravděpodobnost, že bude daný mravenec požit definitivním hostitelem.

V trávicím systému hostitele, v duodenu, je pak požitý mravenec natráven a metacercárie migrují žlučovodnými cestami do jater. Zde dozrává v dospělého jedince a celý cyklus se opakuje (Otranto a Traversa, 2002).

Obrázek č. 1: Vývojový cyklus motolice kopinaté (Kratochvíl, 1973)



79. Vývojový cyklus motolice kopinaté — *Dicrocoelium dendriticum*: A. V hostiteli (a) žije dospělec (b); vajíčka odcházejí trusem do prostředí (1). B. Ve vajíčkách se tvoří miracidium (2), které se uvloňuje, jakmile vajíčko pozře mezihostitel c); v něm prodělává vývoj až do stavu cercárií (3 a 5); cercárie jsou vytlačovány ven z těla mezihostitele shluklé do tvaru slizovitých koulí (4). C. Pozře-li cercárie (5) předhostitel (d), mění se v něm v invazní metacercárie (6). (Sestaveno podle různých autorů.)

2.2.2 Epidemiologie a prevalence

Výskyt nákazy motolicí kopinatou u člověka bývá sporadický. Naproti tomu však u zvířecích hostitelů je prevalence vysoká. Nákaza je rozšířena prakticky celosvětově

a to jak v údolních pastvinách, tak ve vysokohorských pastvinách. Důležité je pouze, aby lokalita poskytovala optimální podmínky pro rozvoj suchozemských plžů a mravenců, kteří jsou nezbytní jako hostitelský organismus pro rozšíření nákazy motolicí v dané lokalitě. V České republice se dikrocelióza vyskytuje především ve středních a jižních Čechách a na jižní Moravě (Ducháček a Lamka, 2003).

2.2.3 Symptomatologie

Nemoc má dvě fáze. Fázi invazivní a fázi biliární. První invazivní fází rozumíme migraci motolice v jaterním parenchymu, druhou, biliární pak usazování motolic ve žlučových cestách hostitele. U nemocných zvířat byla zaznamenána ztráta či změna důležitých biomolekul, např. plazmatických proteinů. Zátěž do 4000 jedinců motolice kopinaté nezpůsobuje u ovcí významnou ztrátu plazmatických bílkovin. Klinické symptomy tak nejsou obvykle zjevné, dokud nedopřeje onemocnění do těžšího stádia. Na postižení dikroceliózou ukazuje anémie, edém, vyhublost, v pokročilém stádiu pak také změny povrchu žlučových cest, jejich rozšíření a cirhóza jater (Kuběňová, 2006).

2.2.4 Diagnostika

Nejběžněji používanou metodou pro diagnózu nákazy motolicemi je koprologická zkouška, kdy se stanovení nákazy opírá o mikroskopický nálezn vajíček v trusu. Negativní koprologický nálezn však zcela nevylučuje dikroceliózu. Spolehlivě bývá odhalena až po utracení zvířete a prohlídce jaterní tkáně a žlučových cest.

V posledních letech jsou vyvíjeny imunodiagnostické metody (imunofluorescence, precipitace, pasivní hemoaglutinační test, komplementární fixace, ELISA) jako alternativa ke koprologickým zkouškám a postmortální prohlídce jater. ELISA testy založené na antigenech proti motolici kopinaté se ukázaly jako spolehlivé a schopné odhalit nákazu relativně brzy (Otranto a Traversa, 2002).

2.2.5 Profylaxe a léčba

Vzhledem ke složitosti vývojového cyklu je léčba onemocnění dikroceliózy obtížná a málo úspěšná. Mnoho běžně užívaných anthelmintik je v doporučených dávkách proti

motolici neúčinné a to z důvodu špatné dostupnosti motolic ve žlučových cestách. Profylaxe je v endemických oblastech založena na léčbě všech zvířat přímo vystavených infekci. Na základě epidemiologie se pak doporučuje provádět léčbu dvakrát až třikrát ročně a to na jaře, a před ustájením na podzim.

Jako léčiva jsou používána hlavně benzimidazolová anthelmintika (albendazol, mebendazol, fenbendazol, triklabendazol, thiabendazol) a pro-benzimidazoly (thiofanát, netobimin). Je nutné podat vyšší dávky zmíněných anthelmintik. Např albendazol v dávkách 15 a 20 mg/kg per os způsobil redukci motolice kopinaté v játrech o 98,2 a 99,6 % (Himonas, C., 1980). Naproti tomu dávka obvyklá 10 mg/kg způsobila pokles pouze o 92,22 % (Cordero, 1980, Otranto a Traversa, 2002).

2.3 BENZIMIDAZOLOVÁ ANTHELMINTIKA

Benzimidazolová anthelmintika jsou široce užívanými léčivy jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Jedná se o látky, v jejichž základní struktuře se nachází planární struktura benzimidazolu. Odtud také název celé skupiny těchto látek. Jedná-li se o pro- benzimidazoly, dochází k tvorbě této struktury až v organismu.

2.3.1 Chemická struktura a mechanismus účinku

Základem struktury je planární struktura benzimidazolu. Jedná se bicyklickou strukturu, kde je na imidazolový heterocykl připojen v poloze 4 a 5 benzen. Další substitucí v polohách 2 a 5 pak bylo připraveno několik tisíc látek s rozdílnými fyzikálně chemickými vlastnostmi a farmakokinetikou (Lanusse a Prichard, 1993). Pouze několik se však dostalo do stádia komerčního využití. Samozřejmě však výzkum v této oblasti neustal a můžeme se tak setkávat s nově syntetizovanými benzimidazolovými sloučeninami s anthelmintickou aktivitou (Mavrova a kol, 2006). Srovnáme-li farmakodynamiku benzimidazolů, je prakticky stejná u všech derivátů. Spočívá hlavně ve vazbě na β -tubulin s následnou blokádu polymerizace tubulinu, po němž dochází k rozkladu vnitřního uspořádání buněk parazita. Byla též pozorována inhibice transmembránového přenosu elektronů, resultující v porušení energetické balance ATP/ADP, ovlivnění energetického metabolismu parazita a následné smrti (Lacey, 1990; McCracken a Stillwell 1991, Solana a kol. 1998). Nízká toxicita pro hostitelský druh je způsobena 1000x vyšší afinitou k tubulinu parazitů, než k tubulinu savců. Pozměněná struktura molekuly tubulinu pravděpodobně způsobuje vznik rezistence parazitů k léčbě (Lanusse a Prichard 1993, Frayha a kol, 1997). Bylo již identifikováno několik mutací ve dvou genech pro β -tubulin, avšak není to jediný mechanismus, který vede k rezistenci na benzimidazoly (Gilleard, 2006). Tato rezistence se vyskytuje prakticky již u několika druhů parazitů, jako například *Haemonchus contortus* (Lacey, 1986), nebo *Taenia columbriiformis* (Chartier a kol, 1998).

Podle struktury lze rozdělit benzimidazoly do čtyř skupin (tab č 2. dle Lanusse a Prichard, 1993)

- A. benzimidazol thiazoly – thiabendazol, kambendazol
- B. benzimidazol methylkarbamáty – parabendazol, mebendazol, flubendazol, cyklobendazol, oxybendazol, luxabendazol, albendazol, rikobendazol, fenbendazol, oxfendazol
- C. halogenované benzimidazol thioly - triklabendazol, luxabendazol
- D. pro-benzimidazoly – thiofanát, febantel, netobimin

Fyzikální vlastnosti

Benzimidazoly jsou látky krystalické s vysokým bodem tání. Rozpustnost ve vodě je špatná a je limitujícím faktorem pro technologické zpracování lékové formy benzimidazolů. Také biologická dostupnost je tímto faktorem do značné míry limitovaná a účinnost proti parazitům lokalizovaným mimo zažívací trakt tak může být problematická. Z tohoto důvodu byly v pozdějších letech syntetizovány tzv. pro-benzimidazoly, což jsou látky farmakologicky neúčinné, avšak s dobrou rozpustností ve vodě. Po podání hostitelskému organismu jsou však (zpravidla za účasti střevní mikroflóry) transformovány na účinné metabolity.

Ze zmiňovaných pro-benzimidazolů jsou aktivními metabolity u thionaftátu – lobendazol, u febantelu – fenbendazol a u netobiminu – albendazol.

Závislost struktury na účinku










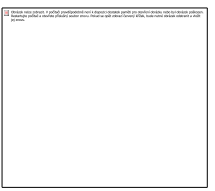
Základní struktura benzimidazolu společně s vhodnou substitucí v poloze 2 je důležitá pro vazbu na parazitární β -tubulin. Obměny struktury, které nahrazovaly v heterocyklu benzimidazolu dusík jiným atomem (kyslík, síra, uhlík) vedly ke snížení vazebnosti na β -tubulin a tím ke snížení anthelmintické účinnosti.

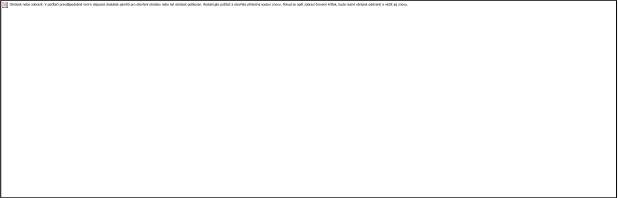




Optimální substituce v poloze 2 dává tomuto regionu velikost, polaritu a dipólový moment, který vhodně umožňuje interakci s vazebným místem β tubulinu. Pro tuto interakci jsou právě vhodné substituce 2-thiazolem (thiabendazol) a 2-methylkarbamátem (albendazol, fenbendazol). Substituce jiné, nebo žádné dosahují mnohem nižší nebo žádné účinnosti. Substituce, které se zaměřily na dusík heterocyklu se ukázaly jako nevhodné a snižující účinnost anthelmintika.

Substituce v poloze 5 benzimidazolu modifikuje intenzitu interakce a mění fyzikálně-chemické vlastnosti látky odrážející se v její farmakokinetice. Vysoké účinnosti dosahují benzimidazoly obsahující síru v 5-substituentu (albendazol,

rikobendazol a další). Substituce halogeny nepřinesla výrazné zvýšení účinnosti (fenbendazol, triklabendazol (Velík, 2005)).

Tabulka č. 2: Chemická struktura anthelminticky účinných benzimidazolů a pro-benzimidazolů

benzimidazol		
	substituce	
derivát	v poloze 5	v poloze 2
thiabendazol		
cambendazol		
albendazol		
fenbendazol		
mebendazol		

<p>triklabendazol</p>	
<p>lobendazol</p>	
<p>thiofanát</p>	
<p>febantel</p>	
<p>netobimin</p>	

V současnosti u nás převažuje počet registrovaných léčivých přípravků s obsahem benzimidazolů pro použití ve veterinární praxi nad počtem léčivých přípravků pro použití u lidí. (Databáze AISLP)

2.3.2 Albendazol

Je jedním z nejdůležitějších zástupců benzimidazolových anthelmintik, které jsou užívány k léčbě helmintóz. Te to dáno velkým rozsahem účinku, který zahrnuje nematoda, cestoda a také trematoda. Užívá se hlavně u přežvýkavců. Je, spolu se svým aktivním metabolitem (albendazol-sulfoxid, rikobendazol), účinný proti dospělým jedincům i většině vývojových stadií včetně vajíček červů (Dayan, 2003). V humánní medicíně je užíván k léčbě echinokokózy, cysterkózy, askariózy, nekatorózy a filariózy (Velík, 2005).

2.3.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Albendazol je podle současného platného chemického názvosloví *methyl-[5-(propylsulfanyl)-1H-benzimidazol-2-yl]karbamát*. Sumární vzorec, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, molekulová hmotnost $M_r = 265,34$ g/mol.

Jedná se o bílý, nebo slabě nažloutlý prášek, který je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v bezvodé kyselině mravenčí, velmi špatně rozpustný v dichlormethanu, prakticky nerozpustný v lihu 96 % (ČL 2005). Hodnota $pK_a = 10,26$ a $2,80$ je pro albendazol. Pro albendazol sulfoxid (rikobendazol) je pak $pK_a = 9,79$ a $0,20$. Vazba na proteiny je udávána v rozmezí 89-92 % (Jung a kol, 1998). Výše zmíněné fyzikálně chemické údaje jsou důležité hlavně z důvodu technologického zpracování albedazolu do lékové formy. Těmi jsou hlavně suspenze, pasty a granuláty pro orální nebo intraruminální podání. Mezi další lékové formy, používané pro léčbu albendazolem, byly systémy pro dlouhodobé uvolňování léčiva. Z hlediska indukce enzymů a možnosti vzniku rezistence parazita na léčivo jsou však tyto systémy méně vhodné (Velík, 2005).

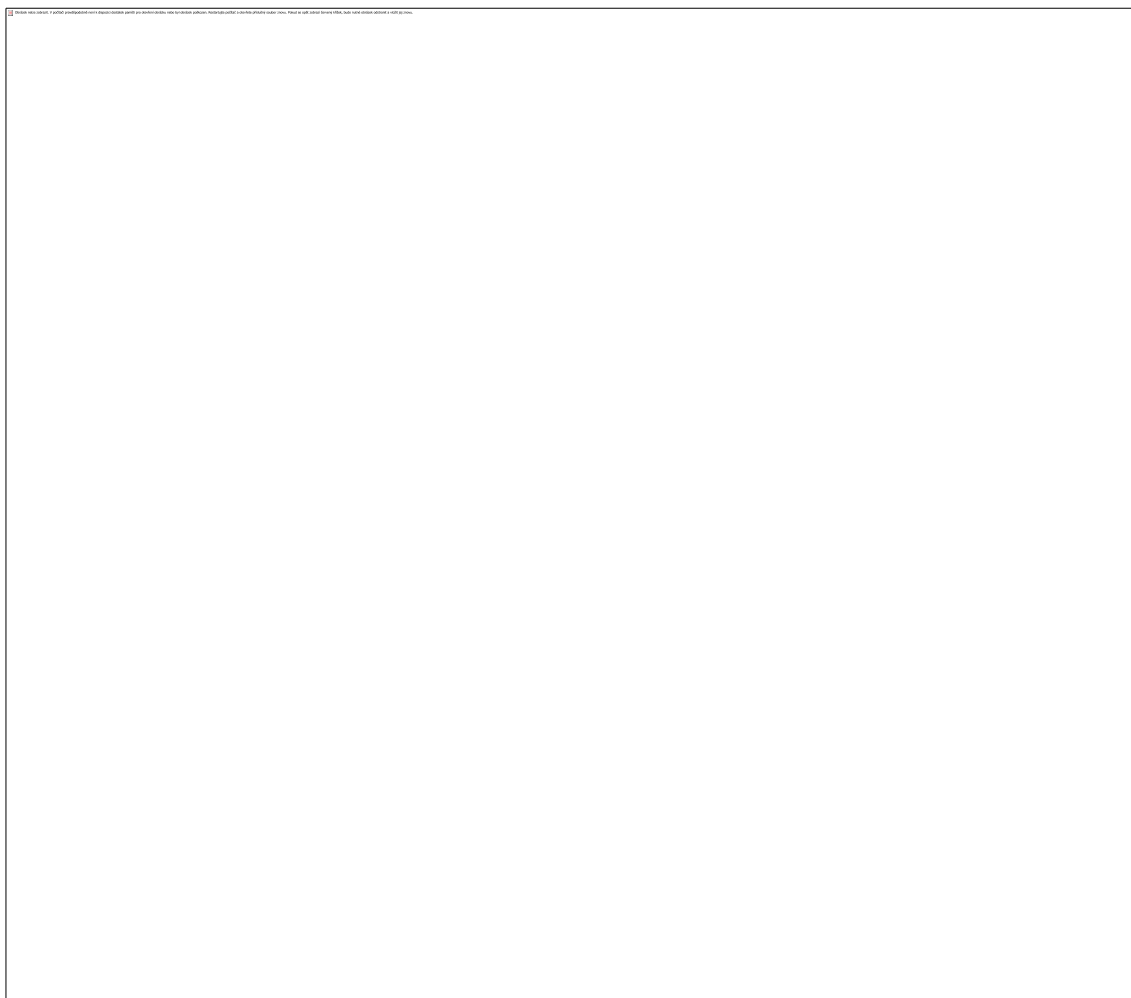
2.3.2.2 Farmakokinetika

Albendazol jako parentní látka je po podání metabolizován ve dvou stupních. V prvním stupni vzniká opticky aktivní látka ABZSO(-,+) neboli albendazolsulfoxid. Druhým krokem metabolizace je přeměna ABZSO(-,+) na albendazolsulfon ABZSO₂.

Po orálním podání je albendazol absorbován v trávicím traktu. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem, liposolibilitě, ionizovatelnosti a rozpustnosti hraje zpracování lékové formy v tomto kroku klíčovou roli (Dressman a Reppas, 2000). Velkou roli při absorpci albendazolu hraje také uspořádání trávicího traktu hostitelského organismu. U druhů s menším objemem žaludku a střev je biologická dostupnost oproti druhům polygastrickým snížena. Podání polygastrickým zvířatům je naproti tomu výhodné. V prostředí batoru je u polygastrických zvířat většina benzimidazolů lépe rozpustná než v kaudálnějších částech zažívacího traktu (Velík, 2005).

V prvním kroku metabolizace albendazolu se uplatňuje především cytochrom P4503A (CYP3A) a flavinové monooxygenázy (FMO), produktem je albendazolsulfoxid (ABZSO). Jelikož se jedná o látku chirální, vznikají dva enantiomery: (-)-ABZSO a (+)-ABZSO. CYP generuje převážně (-)-ABZSO formu, zatímco FMO produkuje (+)-ABZSO formu. (Moroni a kol., 1995) Následná biotransformace, převážně katalyzovaná nejvíce podrodinou cytochromu P4501A dává vzniknout albendazolsulfonu (ABZSO₂). Albendazolsulfoxid je pro účinek léčby velice důležitý, jelikož právě tato molekula je považována za účinnou látku s anthelmintickým účinkem. Naproti tomu albendazolsulfon je látkou farmakologicky inaktivní (Velík a kol., 2003).

Oba vzniklé enantiomery se liší vazebností na β -tubulin parazita. Za sloučeninu zodpovědnou za anthelmintickou aktivitu je považována (+)-ABZSO forma (Solana a kol., 2002). Poměr těchto dvou enantiomerů je tedy důležitým faktorem ovlivňujícím vlastní účinek albendazolu na prarazita. Při studiu farmakokinetiky by tedy neměl být tento fakt opominut. Tento poměr je druhově specifický. Například přežvýkavci, psovitě šelmy a člověk mají tento poměr podobný, posunutý ve prospěch (+)-ABZSO. U potkana je naproti tomu v převaze (-)-ABZSO. Poměr enantiomerů však není konstantní, ale mění se v závislosti na čase od podání léčiva. (Velík a kol., 2003).



Obrázek č. 2: Základní schéma metabolizace albendazolu (Cristofol a kol., 2000)

U albendazolu byl také popsán indukční efekt na biotransformační enzymy, hlavně podrodinu CYP1A. Po opakovaném podávání albendazolu muflonovi (muflonky, věk 5-8 let) byly pozorovány nárůsty aktivit CYP1A a CYP1A2 v játrech a tenkém střevě. V *in vitro* studii s primární kulturou mufloních hepatocytů nebyl indukční efekt na CYP1A významný. K indukci CYP1A však došlo i po jednorázovém podání albendazolu (Velík a kol., 2005). Toto zjištění je při léčbě albendazolem nutno brát v úvahu. Dochází ke zrychlení tvorby inaktivního ABZSO2 a tím k také ke snižování koncentrace účinného ABZSO. To následně může vést až ke vzniku helmintorezistence. Nutno také podotknout, že indukce CYP1A může značně ovlivnit metabolismus jiných látek a léčiv.

2.3.2.3 Dávkování

Dávkování abendazolu není jednotné pro všechny živočišné druhy. Albendazol se používá převážně u ovcí a skotu. Ochranné lhůty jsou, dle dostupných informací k prodáváním přípravkům na trhu, pro potravinová zvířata 14 dní na maso a 72 hodin na mléko. U onemocnění dikroceliózou, jejíž původce sídlí ve žlučovodech jater, je přístup léčiva k parazitům poněkud obtížnější. Problematika dávky byla studována v minulosti již několikrát a to jak s jednorázovým, tak s opakovaným podáním albendazolu. Zkušenosti s intraruminálním (které je výhodnější, nežli podání per os) v koncentracích 15 a 20 mg/kg živé hmotnosti ukázaly redukci *D. dendriticum* v játrech o 98,2 % a 99,6 % (Himonas a Liakos, 1980) zatímco podání dávky 10 mg/kg živé váhy vedlo k redukci pouze na 92,22 % (Cordero, 1980). Testovány byly také intraruminální kapsle s pozvolným uvolňováním, které vedly k poklesu nákazy u *D. dendriticum* o 88,5 % (Čorba, 1991).

Z mnoha prací na toto téma je tedy patrné, že dávky albendazolu podávané jednorázově proti *D. dendriticum* by neměly být nižší, nežli 15 mg/kg ž.hmotnosti. V případě opakovaného podání je pak vhodné, aby dávka podávaného léčiva byla alespoň 7,5 – 10 mg/kg ž. hmotnosti (Ducháček, 2003). Z důvodu indukce enzymu CYP1A (Velík et al. 2005) je však lepší použít dávku jednotlivou, kdy je potenciální vznik rezistence parazita na léčivo omezen.

Zajímavé a pro tuto práci důležité jsou údaje naměřené při podání albendazolu v jednorázových dávkách 30 a 50 mg/kg ž. hmotnosti, kdy hodnoty počtu vajíček na jeden gram vyšetřovaného materiálu poklesly na nulové hodnoty během 4 resp. 6 dnů. Ve sledovaném souboru zvířat (muflon – *Ovis gmelini musimon*) byl také sledován výskyt *Müellerius capillaris*. Na tohoto parazita působil albendazol již v nižších dávkách (Ducháček, 2003). Vezmeme-li tedy v úvahu možnost vzniku rezistence helmintů při opakovaném podávání léčiva a velikost dávky, kdy je 37,5 mg/kg (Bowman, 1999) u ovce považováno za maximální tolerovanou dávku, jeví se jednorázové podání 30 mg/kg pro léčbu jako vhodné. Studie (Ducháček, 2003) však nebyla uzavřena s jednoznačnými výsledky. Je však asi nejužitečnější prací, která se dávkovacími schématy albendazolu u muflona a dikroceliózy zabývá.

2.3.2.4 Přípravky obsahující albendazol v ČR

Značně převažují přípravky, užívané pouze ve veterinární praxi. Jedinou výjimkou je Zentel užívaný v humánní medicíně pro léčbu chorob vyvolaných prvoky nebo červy: enterobióza, ankylostomóza, nekatorióza, hymenolepióza, teniózy, strongyloidóza, askaridóza, trichurióza, klonorchíáza, larva migrans cutanea, giardióza u dětí. Přípravky registrované jako veterinária s obsahem albendazolu jsou pouze Albex 10% a Aldifal 10%. U obou je cílovým druhem zvířat skot a ovce. Jsou určeny pro léčbu a prevenci motolichnatosti (dospělci a larvální stadia *Fasciola hepatica* a *Dicrocoelium dendriticum*), gastrointestinálních a plicních nematodóz a monieziózy u ovcí Aldifal 2,5% a u skotu Aldifal 10%. Přípravek Albex 10% je pak určen k léčbě gastrointestinálních a plicních parazitů u skotu (*Ostertagia spp.*, *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Bunostomum spp.*, *Cooperia spp.*, *Strongyloides spp.*, *Dictycaulus viviparus*, *Moniezia spp.*, *Fasciola hepatica*) a u ovce (*Ostertagia spp.*, *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus spp.*, *Chabertia spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Dictyocaulus filaria*, *Moniezia spp.*, *Fasciola hepatica*).

Tabulka č. 3: Přehled registrovaných hromadně vyráběných léčivých přípravků s obsahem albendazolu v ČR (zdroj: databáze AISLP 2008.1)

název přípravku	ATC	koncentrace léčiva	léková forma/ velikost balení
ALBEX 10% A.U.V.	Q09AA	100 mg / ml	SOL / 1LT
ALDIFAL 10% A.U.V.	Q09AA	100 mg / ml	SUS / 100 ML
ALDIFAL 10% A.U.V.	Q09AA	100 mg / ml	SUS / 1LT
ALDIFAL 10% A.U.V.	Q09AA	100 mg / ml	SUS / 5LT
ALDIFAL 2,5% A.U.V.	Q09AA	25 mg / ml	SUS / 100 ML
ALDIFAL 2,5% A.U.V.	Q09AA	25 mg / ml	SUS / 500 ML
ALDIFAL 2,5% A.U.V.	Q09AA	25 mg / ml	SUS / 1 LT
ALDIFAL 2,5% A.U.V.	Q09AA	25 mg / ml	SUS / 5 LT
ZENTEL	P02CA03	200 mg / tbl	POR TBL

3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo přispět k poznání farmakokinetiky albendazolu po jeho jednorázovém podání u muflona (*Ovis gmelini musimon*) se zaměřením na biotransformační přeměny parentní látky. Dílčími cíli byly:

1. Připravit a uskutečnit v terénním chovu experimentální práce na muflonech ošetřených shodnou dávkou léčiva, zvířata utratit v různých časových intervalech po ošetření albendazolem a navzorkovat je.
2. Ve vzorcích krve (séra), žluči ze žlučníku a žlučovodů stanovit pomocí HPLC koncentrace parentní molekuly a jejích metabolitů.
3. Ve vzorcích biologických tekutin stanovit také koncentrace obou enantiomerů albendazolsulfoxidu.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

Při experimentu č.1 byly použity muflonky z oborního chovu Vlkov pod Oškobrhem. Celkem 12 zvířat bylo rozděleno do 4 skupin po třech, stáří muflonek se pohybovalo v rozmezí 4-10 let. Zvířata byla individuálně označena ušními známkami. Přehled rozdělení zvířat do skupin a jejich charakteristik je zobrazena v tabulce č. 4.

Tabulka č.4: Přehled rozdělení zvířat do skupin a jejich charakteristika

experimentální skupina	číslo ušní známky	stáří zvířete (rok)	březost (ano/ne)
A	B2	6	ano
	41	6	ne
	45	9	ano
B	B1	8	ano
	47	5	ano
	42	10	ano
C	69	7	ano
	49	7	ano
	50	4	ano
D	61	5	ano
	č.2	7	ano
	43	8	ano

V experimentu č. 2 byly použity muflonky z oborního chovu Vlkov pod Oškobrhem, jednalo se o 2 muflonky ve stáří 4 a 6 let, obě březí. Individuálně označeny ušními známkami jako M3 a M4.

Veškeré experimenty byly prováděny se souhlasem etické komise mateřského pracoviště i jemu nadřazených složek.

4.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Pomůcky:

laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, odměrné válce), mikrozkušavky, automatické pipety, pipetovací špičky, vialky, inserty, stopky, váženka, navažovací lžičky a kopistky, magnetické míchadlo, parafilm, popisovací fixy.

Přístrojové vybavení:

pipety eppendorf v rozmezí 1 – 1000 ul

freezer Heraeus HeraFreeze

analytické váhy - Scaltec SBC 22

vysokoúčinný kapalinový chromatograf - Shimadzu 10 AVP

koncentrátor - Eppendorf Concentrator 5301

ultrazvuková lázeň - Bandelin Sonorex

digitální pH-metr - Jenway LTD 3020

Použité chemikálie:

albendazol - Sigma, ČR

albendazolsulfoxid - Toronto Research Chemicals, Kanada

albendazolsulfon – Toronto Research Chemicals, Kanada

amoniak - Lachema, ČR

octan ethylnatý - Sigma, ČR

acetonitril pro kapalinovou chromatografii - Sigma, ČR

isopropylalkohol - Merck

běžné chemikálie čistoty p.a. - Penta, ČR; Lachema, ČR:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 ,

Vermintan gran. 20%

4.3 METODIKY

4.3.1 Příprava vzorků

4.3.1.1 Experiment č. 1

Pokus byl uskutečněn dne 14.1. 2005

K provedení vlastního pokusu byla v oborním chovu v obci Vlkov pod Oškobrhem vyčleněna skupina 12 kusů muflonek. Zvířata byla nejprve zvážena, aby bylo možné aplikovat každému kusu přesnou dávku léčiva stanovenou na 30 mg/kg živé hmotnosti. Všem zvířatům byla podána perorální suspenze 10% suspenze albendazolu (připravena z 20% Vermitan granulátu). Doba podání léčiva byla u každého kusu zaznamenána tak, aby mohlo dojít k utracení zvířete v přesném intervalu po podání.

Časové rozmezí pro utracení zvířat bylo 4 hodiny (skupina A), 6 hodin (skupina B), 8 hodin (skupina C), 10 hodin (skupina D) po podání léčiva. Postupně bylo utraceno všech 12 muflonek.

Z každého zvířete byl odebrán vzorek biologických materiálů:

- ☒ žluč ze žlučvodů
- ☒ žluč ze žlučníku
- ☒ krev, ze které následně bylo separováno sérum

Vzorky byly popsány písmenem skupiny a v každé skupině označeny 1-3.

Vzorky ze žlučvodů jednotlivých zvířat byly později spojeny a to po 0,3 ml od každého zvířete do směsných vzorků a označeny jako Asv – Dsv. Dále byly pro případnou analýzu ponechány zbytky individuálních vzorků.

Krev byla odebrána jako první do plastových zkumavek při vykrvování zvířete, bezprostředně po té následoval odběr dalších vzorků. Žluč ze žlučvodů byla získána punkcí terminálního žlučvodu v oblasti jaterního hylu, odběr žluče ze žlučníku byla provedena po jeho uvolnění z jaterní tkáně a převedením celého jeho obsahu do plastové zkumavky.

Uchovávání materiálu:

Materiál byl až do doby zpracování uchováván v hlubokomrazícím zařízení při teplotě - 80 °C.

Zajištěné vzorky biologických materiálů:

Žluč ze žlučvodů

A – pouze A1 kvantitativně, ostatní bez odběrů.

B – kvantitativně všechna zvířata

C – kvantitativně všechna zvířata

D – kvantitativně všechna zvířata

Žluč ze žlučníků

A-D 1-3 – každý vzorek do vlastní zkumavky

Sérum:

A-D 1-3 – každý vzorek do vlastní zkumavky

4.3.1.2 Experiment č. 2

Pokus byl uskutečněn dne 22.2. 2007

Na základě výsledků z předchozího experimentu byla podána 2 muflonkám stejná dávka albendazolu jako v prvním případě 30 mg/kg. Biologické vzorky byly odebrány po utracení zvířat shodně s experimentem č.1 za 6 hodin od podání léčiva. Plánováno bylo odebrat žluč ze žlučníku, žlučvodů a krev pro získání séra. U jednoho ze zvířat se nepodařilo odebrat žluč ze žlučvodů. Vzorky byly označeny jako M3 a M4.

4.3.2 extrakce

Všechny vzorky byly zpracovány extrakcí do octanu ethylnatého po zvýšení pH na rozmezí 10 – 11 pomocí amoniaku. Extrakce byla provedena protřepáváním po dobu 5 minut. Po oddělení obou fází byla octanová fáze odebrána a převedena do vialky. Následně byly vzorky odpařeny v koncentrátoru. Extrakční účinnost byla pro žluč

stanovena pro ABZ, ABZSO a ABZSO₂ na 95,33 %, 59,95 % a 83,25 %. Pro sérum nemohla být vzhledem k nedostatku čistého séra stanovena.

Žluč

Extrahováno bylo 400 μl žluči do 800 μl octanu ethylnatého. Ke každému vzorku bylo přidáno před extrakcí 20 μl amoniaku pro zvýšení bazicity. Následně byla provedena extrakce vzorku. Vrstva s octanem ethylnatým byla převedena do vialky a odpařena v koncentrátoru. Stejně tak byla provedena extrakce žluči ze žlučových.

Plasma

300 μl vzorku bylo extrahováno 800 μl octanu ethylnatého za zvýšeného pH pomocí 30 μl NH_3 . Vrstva octanu ethylnatého byla opatrně odebrána a převedena do vialky. Následně byla odpařena v koncentrátoru.

Před měřením vzorků na HPLC byl každý vzorek rozpuštěn v 800 μl mobilní fázi a na 10 minut ponořen do ultrazvukové lázně. Po rozpuštění následovalo vlastní měření při kterém byla ochytávána frakce ABZSO (total+-). Následně byla tato frakce odpařena v koncentrátoru.

4.3.3 HPLC analýza

4.3.3.1 Achirální analýza vzorků

Analýza vzorků séra

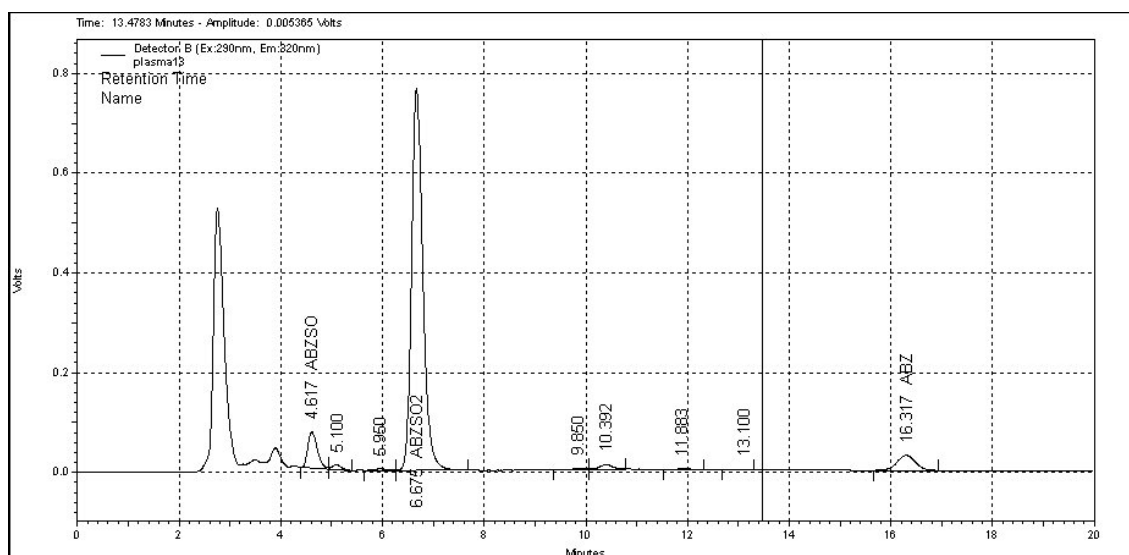
Achirální HPLC měření vzorků bylo provedeno pomocí systému Shimadzu Hplc sestávajícího se z modulů – pumpa Shimadzu LC-10ADvp, autosampler Shimadzu LC-10ADvp, fluorescenční detektor Shimadzu RF10Ax1 ($\lambda_{\text{EX}}=290$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=320$ nm), kolonový termostat Shimadzu CTO-10ACvp. Jako kolona byla použita kolona HPLC LiChroCART 250-3 (LiChrosper 60 RP-select B, 250 mm x 3 mm, 5 μm) reverse-phase. Jako předkolona LiChroCART 4-4 (LiChrosper 60 RP-select B, 4 mm x 4 mm, 5 μm). Mobilní fáze se sestávala z acetonitrilu a pufru ze fosforečnanu draselného o pH 3. Poměr byl 35:65 v/v. Průtok kolonou v isoktatickém módu 0,5 ml/min. Všechny experimenty probíhaly při teplotě 25 °C.

Data byla zpracována programem Shimadzu Class VP, verze 6.12 sp2. Sloučeniny byly identifikovány pomocí retenčních časů stanovených pomocí referenčních látek.

Za těchto chromatografických podmínek byly retenční časy sloučenin 5.1 min (ABZSO – a +), 7,1 min (ABZSO₂) a 17,2 min (ABZ). Lineární kalibrace byla provedena v rozsahu 2000 – 13000 ng/ml pro ABZ, 250 – 3000 ng/ml pro ABZSO, 25-125 ng/ml pro ABZSO₂.

Během analýzy byla z každého vzorku do vialky odchycena frakce ABZSO (+,-). Pokud to bylo možné, byla snaha odchytnout celou frakci, tak, aby koncentrace analytu pro následné měření chiralitu byla dostatečná. Při nízkých koncentracích v měřených vzorcích byl zvýšen objem nástřiku desetinásobně tak, aby následně bylo možno chiralitu změřit. Odchycené frakce byly odpařeny na koncentrátoru Eppendorf 5310. Tyto vzorky byly později podrobeny chirální analýze.

Obrázek č.3: Ukázka HPLC chromatogramu dělení albendazolu a jeho metabolitů albendazolsulfoxidu a albendazolsulfon při analýze séra.



Analýza vzorků žluči

Po pokusech o analýzu žluči předchozí metodou bylo zjištěno nedostatečné oddělování analyzovaných látek od látek balastních, které v extraktu zbyly. Tyto pokusy byly provedeny s čistou žlučí, do které byly přidány standarty jednotlivých sledovaných látek. Vzhledem k tomu, že bylo důležité získat čistě oddělené látky, aby bylo možné provést analýzu chiralitu u ABZSO, rozhodl jsem se pro úpravu stávající metody tak, aby byla zajištěna čistota jednotlivých metabolitů.

Achirální HPLC měření vzorků žluči bylo provedeno pomocí systému Shimadzu Hplc sestávajícího se z modulů – pumpa Shimadzu LC-10ADvp, autosampler Shimadzu LC-10ADvp, fluorescenční detektor Shimadzu RF10Ax1 ($\lambda_{EX}=290$ nm, $\lambda_{EM}=320$ nm), kolonový termostat Shimadzu CTO-10ACvp. Jako kolona byla použita kolona HPLC LiChroCART 250-3 (LiChrosper 60 RP-select B, 250 mm x 3 mm, 5 μ m) reverse-phase. Jako předkolona LiChroCART 4-4 (LiChrosper 60 RP-select B, 4 mm x 4 mm, 5 μ m). Mobilní fáze se sestávala z acetonitrilu a pufru z fosforečnanu draselného o pH 3.

Metoda probíhala formou částečného gradientu. Průtok kolonou byl 0,6 ml/min při teplotě 25 °C. V první části je poměr fosforečnanového pufru a ACN 75:25, mezi 17 a 19 minutou následuje změna na poměr 70:30, která trvá až do 34 minuty. Následuje sekvence promívání kolony, která má odstranit případné zbylé výrazněji zadržované nečistoty před nástřikem dalšího vzorku. Pro žluč extrahovanou pomocí octanu ethylnatého se tato sekvence ukázala jako výhodná. Přesné poměry ukazuje tabulka č.3.

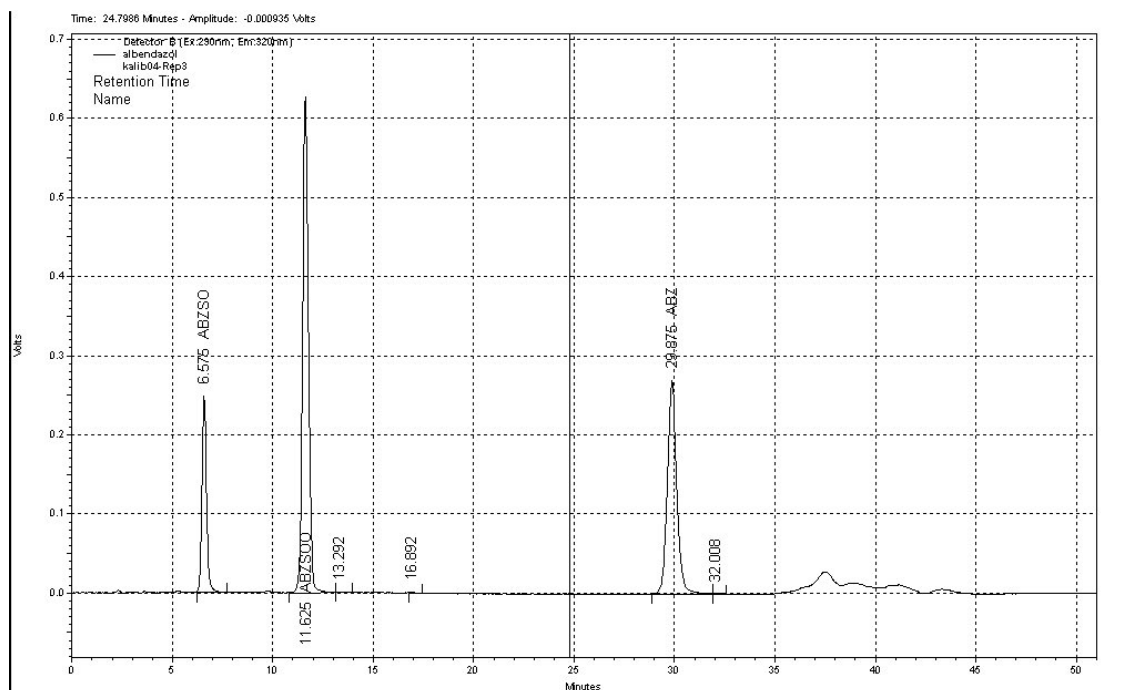
Za těchto chromatografických podmínek byly retenční časy sloučenin 6,5 min (ABZSO – a +), 11,6 min (ABZSO₂) a 30,0 min (ABZ). Lineární kalibrace byla provedena v rozsahu 2000 – 13000 ng/ml pro ABZ, 250 – 3000 ng/ml pro ABZSO, 25-125 ng/ml pro ABZSO₂.

Během analýzy byla pak odebírána frakce ABZSO pro následnou analýzu chiralitu. Jednotlivé vialky s nachytným ABZSO byly odpařeny v koncentrátoru Eppendorf 5310 a uschovány pro analýzu chiralitu.

Tab.č. 5: Rozložení koncentrací pufru a acetonitrilu pro gradientovou analýzu vzorků.

Čas [min]	Pufr [%]	ACN [%]
0-17	75	25
17-19 změna	75 - 70	25 - 30
19-34	70	30
34-36 změna	70 - 40	30 - 60
36-42	40	60
42-46 změna	40 - 75	60 - 25
46-51	75	25

Obrázek č.4: Ukázka HPLC chromatogramu dělení albendazolu a jeho metabolitů albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu při analýze žluči

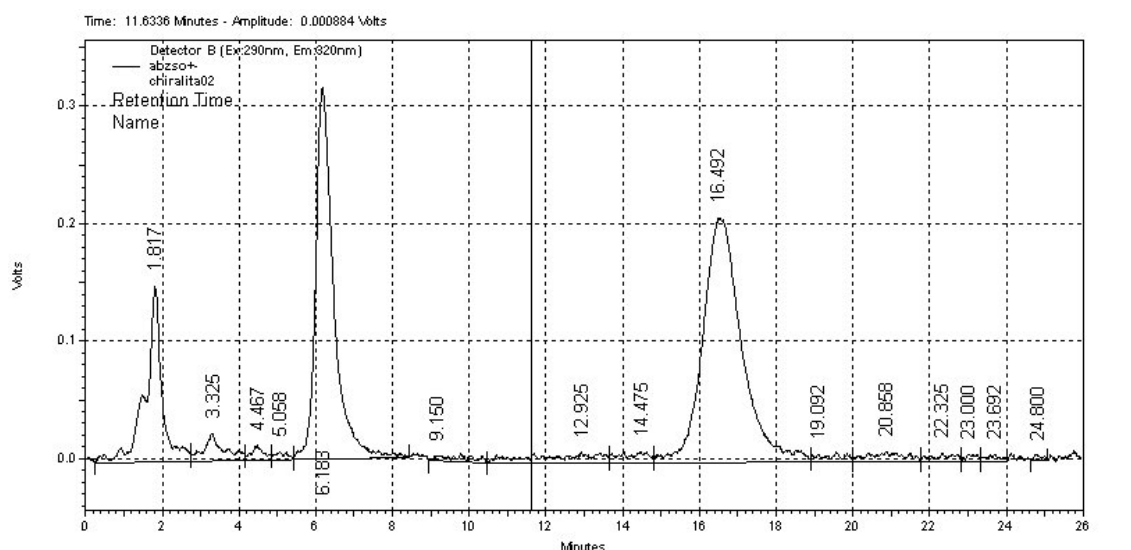


4.3.3.2 Chirální analýza vzorků

K chirální HPLC analýze byl použit opět přístroj Shimadzu v předešlé konfiguraci avšak s kolonou Chiral-AGP stationary phase (150 mm x 4 mm, 5 μ m). Detekce enantiomerů probíhala na fluorescenčním detektoru Shimadzu RF-10 Ax1 ($\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 320$ nm). Průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Mobilní fázi tvořil 0,2% isopropylalkohol v sodnofosfátovém pufru o pH 6,9 (0,01 M NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4). Jednotlivé enantiomery byly identifikovány pomocí retenčních časů. Retenční čas pro (-) ABZSO byl 6,1 minut a pro (+) ABZSO 16,4 minut.

Všechny vzorky byly rozpuštěny v 200 μ l mobilní fáze. Objem nástřiku na kolonu byl 100 μ l.

Obrázek č.5: Ukázka HPLC chromatogramu dělení ABZSO (- a +), Retenční čas pro (-) ABZSO byl 6,1 minut a pro (+) ABZSO 16,4 minut



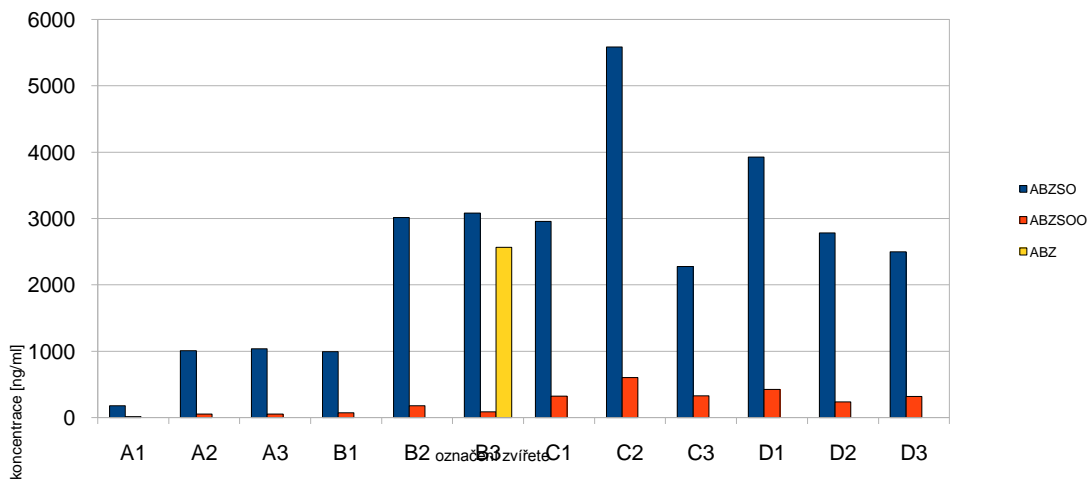
5. VÝSLEDKY

5.1 ŽLUČ - ŽLUČNÍK

Z analýzy vzorků žluče ze žlučníků je patrný nárůst koncentrace ABZSO po 6. hodině od podání. Výraznější koncentrace ABZSO₂ jsou pak patrné až ve skupině, která byla utracena 8 hodin po podání léčiva. Z toho se dá usuzovat, že rychlost metabolizace z ABZSO na ABZSO₂ je výrazně pomalejší, nežli rychlost metabolizace ABZ na ABZSO. Ve skupině sledovaných zvířat se vyskytlo jedno zvíře, u kterého byly abnormálně zvýšené hladiny ABZ. Naproti tomu u ostatních kusů se ABZ ve žluči nevyskytoval. Lze proto předpokládat, že zde půjde pravděpodobně o poruchu metabolismu.

Mezi skupinami C a D lze vidět relativně porovnatelné hodnoty v koncentracích ABZSO a ABZSO₂, v průměru jsou však ve skupině D nižší. Z toho lze tedy usuzovat, že nejvyšší koncentrace ABZSO je přítomna kolem 8. hodiny po podání vlastního léčiva, poté pozvolna klesá. To samé platí pro koncentrace ABZSO₂, kdy nejvyšší zaznamenané koncentrace tohoto metabolitu jsou právě ve skupině utracené 8 hodin po podání suspenze albendazolu. Důležité je také poukázat na značné rozdíly v metabolismu jednotlivých zvířat, což může být vlivem věku, onemocnění případně genetických rozdílů oproti zvířatům ostatním.

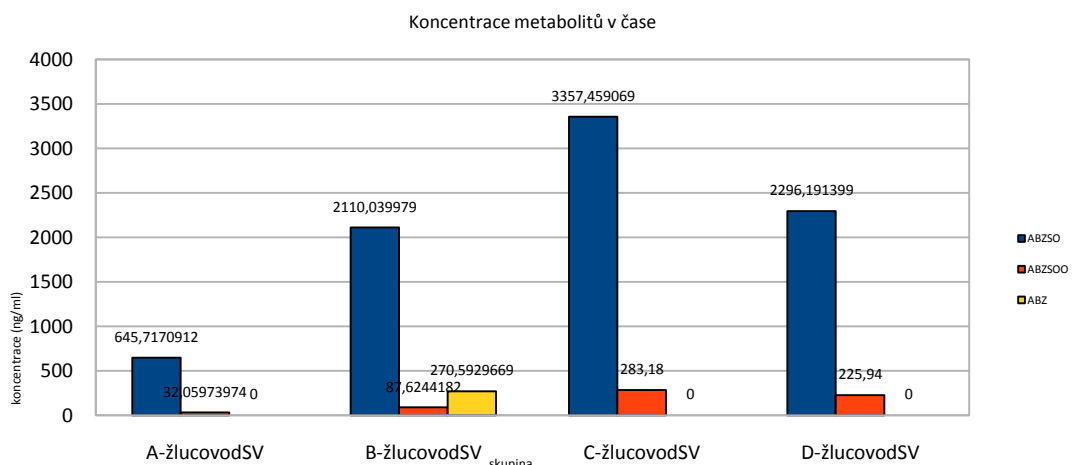
Graf č.1: Individuální koncentrace albendazolu (ABZ) a jeho jednotlivých metabolitů albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO) u žluči získané ze žlučnicku. - experiment č.1



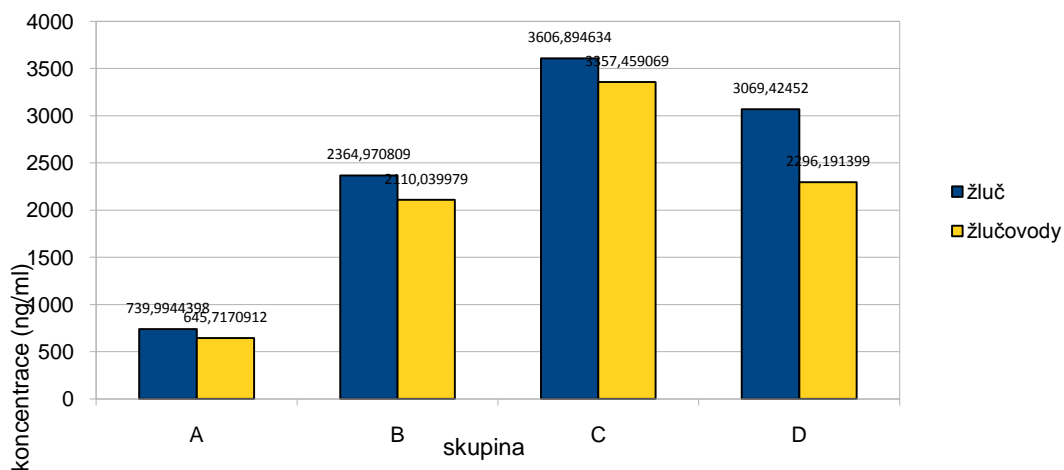
5.2 ŽLUČ - ŽLUČOVODY

Žluč ze žlučovodů byla analyzována jako směsné vzorky, které byly odebrány ihned po utracení zvíře. Pouze ve skupině A se nepodařilo kvantitativně odebrat vzorky u všech zvířat. U analyzovaných vzorků byl nalezen ABZ pouze u skupiny B, což potvrzuje předchozí výsledky ze žlučníků, kde byl u jednoho zvířete ABZ také nalezen. V ostatních vzorcích ABZ nebyl nalezen. Jedná se tedy o průměrné hodnoty, které ukazují stoupající koncentraci ABZSO až do 8 hodin po podání. Následující hodnota ze skupiny D vykazuje již pokles koncentrace ABZSO ve žlučovodech. Totéž platí pro koncentrace ABZSO₂, která také roste pouze do 8. hodiny po podání léčiva. Z tohoto sledovaného vzorku je tedy patrné že koncentrace ABZSO, který je účinnou formou léčiva, je u muflona po jednorázovém podání ABZ maximální 8 hodin po podání a následně klesá.

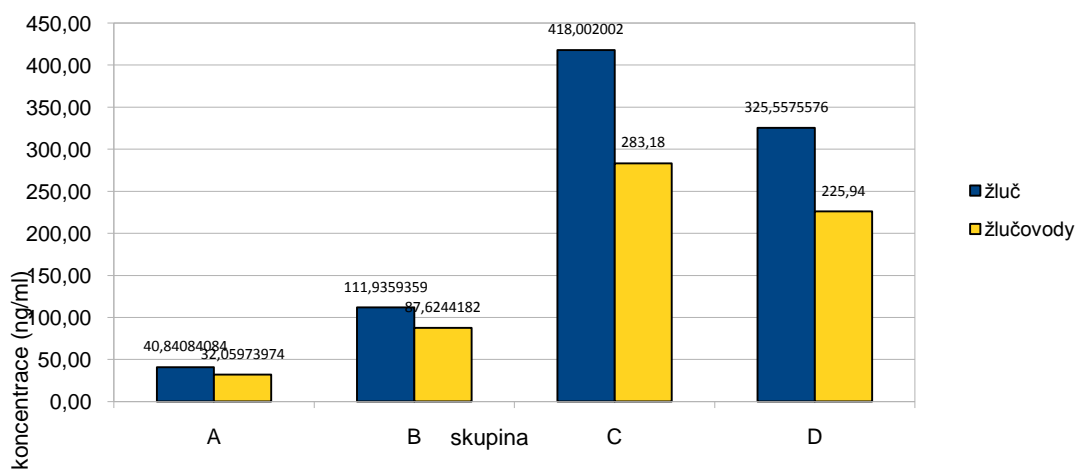
Graf č.2: Průměrné koncentrace albendazolu (ABZ) a jeho jednolitých metabolitů albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO) ve žluči získané ze



žlučvodů pro jednotlivé skupiny zvířat. - experiment č.1

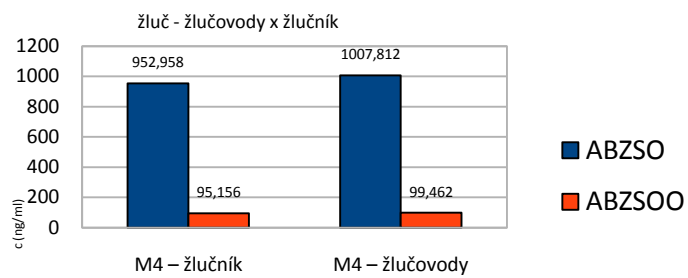


Graf č. 3.: Porovnání průměrných koncentrací albednazolsulfoxidu (ABZSO) mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů.



Graf č. 4.: Porovnání průměrných koncentrací albendazolsulfonu (ABZSO₂) mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů – experiment č. 1

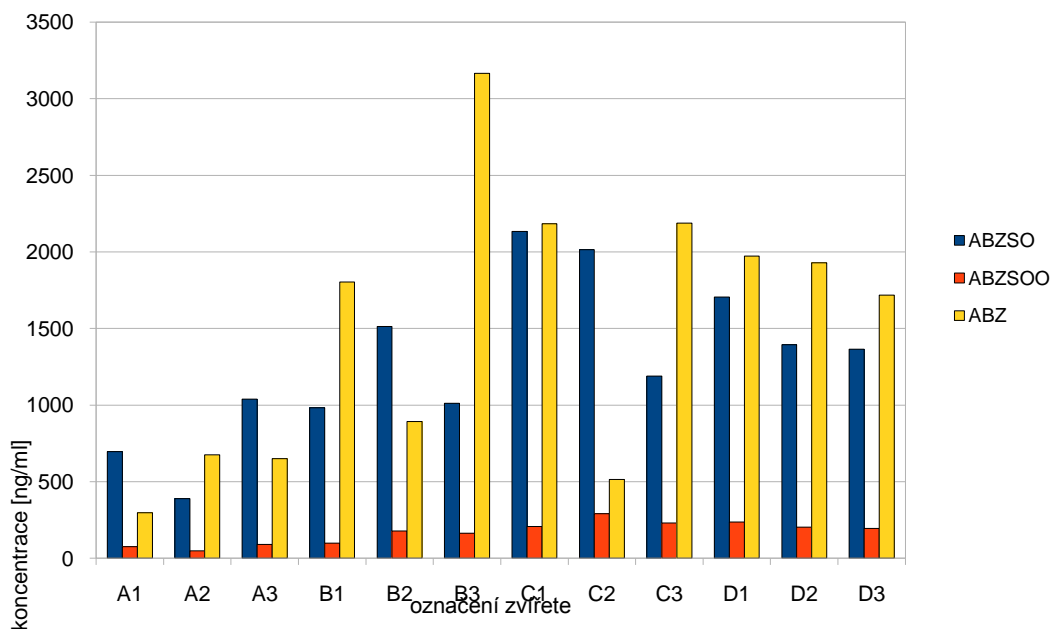
Graf č. 5.: Porovnání koncentrací albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO) mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů – experiment č. 2



5.3 SÉRUM

Z analýzy séra muflona je patrný vzestup koncentrací albendazolu a albednazolsulfoxidu po 6. resp 8. hodině. Po té následuje již pozorovatelný sestup hladin jak albedazolu, tak albendazol sulfoxidu. Za povšimnutí stojí jeden ze vzorků označený B3, kde byla koncentrace albendazolu abnormálně vysoká oproti ostatním zvířatům. Zvýšení koncentrace albenzazolsulfoxidu je naproti tomu srovnatelné s ostatními zvířaty v této skupině. Z naměřených hodnot je patrné, že koncentrace ABZ, ABZSO (-,+) a ABZSO₂ stoupají až k času 8 hodin po podání. V 10. hodině po podání je již znatelný úbytek všech výše zmíněných látek. Nejvyšší koncentrace na parazity účinného ABZSO (- , +) je tedy po 8 hodinách od podání léku.

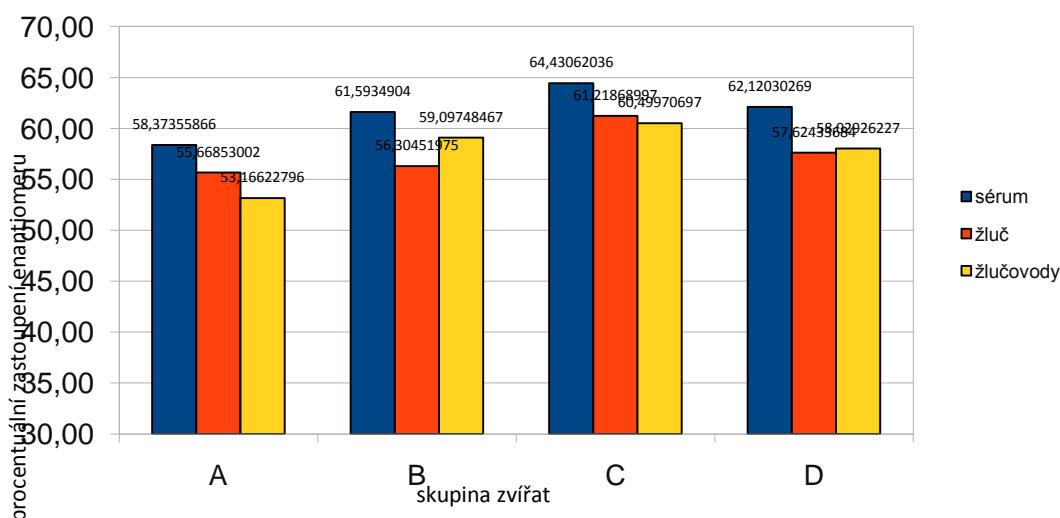
Graf č. 6.: Individuální koncentrace albendazolu (ABZ) a jeho metabolitů albedazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSOO) v séru zvířat – experiment č. 1.



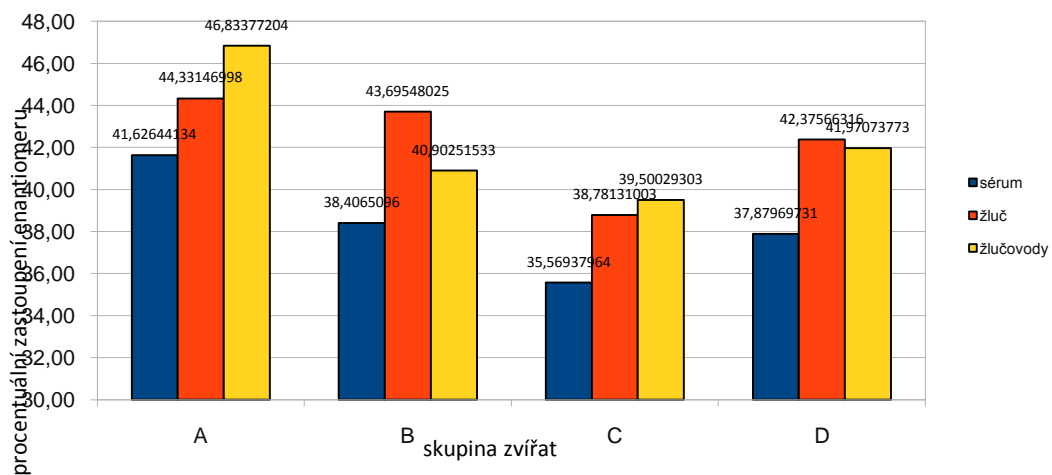
5.4 STEREOSPECIFITA BIOTRANSFORMACE ABZ NA ABZSO

Albendazol je v těle muflona oxidován na albendazol sulfoxid. Při analýze vzorků byly ze séra, žluče ze žlučnicků a žluče ze žlučvodů odebírány frakce ABZSO (+ a -) na chirální analýzu. Tato analýza ukázala, že poměr ABZSO (-) : ABZSO (+) převažuje ve prospěch ABZSO (+). Jak je z analýzy také patrné, stoupá v čase koncentrace ABZSO (+) oproti klesající koncentraci ABZSO (-). Tento vzestup je patrný až do doby 8 hodin po podání léčiva, kdy je již zaznamenán pokles tvorby ABZSO (+). Toto zjištění je patrné pro sérum, žluč ze žlučnicků i žluč ze žlučvodů. Nejlépe je to patrné na přiložených grafech (graf č. 7 a graf č.8) , které zobrazují procentuální zastoupení jednotlivých enantiomerů ve sledovaných skupinách zvířat A-D.

Graf č. 7.: Procentuální zastoupení (+) albendazolsulfoxidu v jednotlivých biologických materiálech (sérum, žluč ze žlučvodů a žlučnicku) – experiment č.1



Graf č. 8.: Procentuální zastoupení (-) albendazolsufoxidu v jednotlivých biologických materiálech (sérum, žluč ze žlučovodů a žlučníku) – experiment č.1



6. DISKUSE

Tato diplomová práce se snaží přispět k poznání farmakokinetiky albendazolu po jeho jednorázovém podání dávky 30 mg/kg hmotnosti zvířete. Cílem bylo zjistit poznatky o biotransformaci albendazolu a jeho metabolitů albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu. Experiment č. 1 byl proveden na 12 zvířatech, měl význam pro základní zorientování ve sledované problematice, druhý experiment byl využit pro doplnění dřívějších nálezů.

Pro tuto práci bylo vytyčeno několik cílů, které jsou níže konfrontovány s naměřenými hodnotami, případně s hodnotami již známými z dřívějších prací.

6.1. Farmakokinetika albendazolu a jeho metabolitů

Náhled na celkovou farmakokinetiku albendazolu a jeho metabolitů albendazolsulfoxidu (ABZSO) a albendazolsulfonu (ABZSO₂) nám poskytují data získaná z biologických materiálů získaných v experimentu č. 1. Tato data jsou shrnuta v grafech č.1 (žluč ze žlučníku), č.2 (žluč ze žlučvodů) a č.6 (sérum). Jednoznačně je patrné, že albendazol jako parentní látka je detekovatelná pouze v samotném séru, kdežto ve žluči ze žlučníku ani žlučvodů zvolenými metodami detekovatelná nebyla. Z grafu č.6 (sérum) je patrný celkový vzestup koncentrací albendazolu i albendazolsulfoxidu a albendazolsulfonu až do 8. hodiny od podání suspenze léčiva. Pak je již patrný pozvolný pokles. Z toho lze tedy usuzovat, že v době kolem 8. hodiny od podání suspenze léčiva je průměrná koncentrace albendazolu i jeho metabolitů ABZSO a ABZSO₂ nejvyšší. Jelikož nebyla z důvodu absence čistého séra provedena extrakční účinnost, lze se pouze dohadovat, zda vyšší koncentrace albendazolu v séru oproti ABZSO odpovídají skutečnosti.

Porovnáme-li data získaná z jednotlivých biologických materiálů (grafy č. 1, č.2 a č.6) a přihlédneme-li ke zjištění, že ve žluči ze žlučníku ani žlučvodů nebyl albendazol detekován, můžeme konstatovat, že rychlost nárůstu koncentrace ABZSO a ABZSO₂ je v těchto materiálech srovnatelná. V průměru je nejvyšší koncentrace ABZSO i ABZSO₂ zaznamenána 8 hodin po podání albendazolu jako léčiva. Po této době je již patrný pokles těchto hodnot. To vede k závěru, že nejvyšší koncentrace, které

jsou schopny postihnout případného parazita, se budou vyskytovat právě v rozmezí mezi 6. a 10. hodinou od podání.

Dále je patrný řádový rozdíl mezi koncentracemi ABZSO a ABZSO₂. Původní předpoklad počítal se stoupající koncentrací ABZSO₂ i po té, co již koncentrace ABZSO začne klesat. Tento předpoklad však nebyl v této práci potvrzen. Naopak, průměrná koncentrace ABZSO₂ po 8. hodině po podání, kdy dosahuje maximálních hodnot, zaznamenává pokles.

Z grafu č. 1 (žluč ze žlučníku) a č. 6 (sérum) jsou také patrné rozdíly v rychlosti metabolizace albendazolu a jeho metabolitů ABZSO a ABZSO₂ mezi jednotlivými zvířaty. Je pravděpodobné, že tyto rozdíly jsou dány odlišným věkem a mírou zdravotního postižení (především dikrocelióza), které může biotransformační procesy ovlivňovat.

V grafu č.1 je u jednoho zvířete ze skupiny B detekován albendazol ve velmi vysoké koncentraci. Naproti tomu u ostatních zvířat albendazol detekován nebyl. Jedná se pravděpodobně o abnormalitu, která může být způsobena poruchou metabolismu tohoto zvířete.

6.2. Porovnání naměřených hodnot mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů

Z hlediska nákazy dikroceliózou je důležitým poznatkem koncentrace ABZSO ve žlučovodech. Proto byla snaha o získání těchto hodnot a také o porovnání hodnot mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů. Z experimentu č. 1 vyplynulo, že maximální koncentrace je dosažena přibližně po 8 hodinách a následně již zaznamenává pokles. Průměrná hodnota koncentrace ABZSO je v tuto dobu okolo 3,6 µg/ml pro žlučník a 3,3 µg/ml pro žlučovody. Individuálně však tato hodnota může značně kolísat.

Srovnání mezi koncentracemi ABZSO a ABZSO₂, které je dobře patrné z grafů č. 3. a č 4., ukazuje, že žluč ze žlučníku má oproti žluči ze žlučovodů koncentrace vyšší. Pro porovnání koncentrací byly k dispozici pouze směsné vzorky ze žlučovodů, a tak bylo rozhodnuto provést experiment č. 2, kterým by se výše zmíněná skutečnost ověřila. Při tomto experimentu se povedlo odchytil dva kusy muflonek. Odebrat biologický materiál v dostatečném množství se však podařilo pouze u jedné z nich. Je to dáno obtížným odběrem žluče ze žlučovodů, který je složitý na provedení. Navíc hrozí vniknutí žluče ze žlučníku do žlučovodů a následné zkreslení výsledků.

Data z experimentu č. 2 ukazují (graf č.5), že koncentrace ABZSO a ABZSO₂ jsou ve žluči ze žlučníku a žluči ze žlučvodů jsou totožné.

Rozdíly mezi experimentem č. 1 a experimentem č. 2 jsou jasně patrné. Je však otázkou, zda nejsou tyto rozdíly dány právě rozdílnou rychlostí metabolizace jednotlivých zvířat v experimentu č. 1, kdy byly použity pro žlučovody pouze směsné vzorky. Naproti tomu v experimentu č. 2 byl pouze jeden vzorek, ze kterého si o této problematice nelze udělat celkový obraz. Přesto lze z dostupných hodnot vyvodit závěr, že koncentrace ABZSO i ABZSO₂ jsou v žluči ze žlučníku i žlučvodů řádově velmi podobné.

Vzhledem k výše uvedenému by bylo v budoucnu vhodné tento experiment ještě jednou zopakovat.

6.3. Stereospecifita biotransformace albendazolu na albendazolsulfoxid

Při studiu stereospecifity biotransformace albendazolu na albendazolsulfoxid byly u muflona zjištěny oba enantiomery. ABZSO (+) má ve všech sledovaných biologických materiálech vyšší procentuální zastoupení oproti ABZSO (-). Dále je patrná změna tohoto poměru, kdy do 8. hodin od podání stoupá podíl ABZSO (+) oproti ABZSO (-). Následně je již zaznamenán pokles. Dobře je to patrné z grafu č. 7. a č. 8. Porovnáme-li tuto skutečnost s *in vitro* studií, jedná se o značný rozdíl, protože studie *in vitro* tuto změnu poměrů v čase neukázala (Velík a kol., 2003).

Rozdíly enantiomerů mezi jednotlivými biologickými materiály jsou dobře patrné (graf č. 7 a č. 8). Žluč ze žlučníku a žluč ze žlučvodů má jen nepatrné rozdíly mezi poměry obou enantiomerů. Naproti tomu však je rozdíl poměrů v séru výrazněji posunut k hodnotám ABZSO (+). Tuto skutečnost lze přirovnat pravděpodobně rozdílné stereospecifitě biotransformace v různých tkáních muflona.

Jelikož je známo, že ABZSO (-) je produkován systémem CYP 450 zatímco ABZSO (+) je produkován systémem FMO (Moroni a kol.,1995). Vzhledem k tomuto poznatku se dá předpokládat, že aktivita FMO je oproti aktivitě systému CYP 450 u muflona do značné míry nižší a při biotransformaci albendazolu je systém CYP 450 v převaze.

Je zde také důležité zmínit skutečnost, že se jednotlivé enantiomery liší svou vazebností na β -tubulin parazita. Za sloučeninu s anthelmintickou aktivitou

je považována (+)-ABZSO forma (Solana a kol, 2002). Z naměřených hodnot je patrná převaha právě této formy.

7. ZÁVĚR

Na základě dvou provedených experimentů a naměřených dat lze vyvodit tyto závěry:

Albendazol jako parentní látka se až na výjimky nevyskytuje v námi sledované žluči. Ve vysokých koncentracích je však detekovatelný v séru. Maximální koncentrace albendazolu a jeho metabolitů albendazolsufoxidu a albedazolsulfonu jsou mezi 6. a 10. hodinou po podání suspenze. V naší práci tato maximální koncentrace byla v průměru 8 hodin od podání suspenze léčiva. Hodnoty u zvířat ve skupinách relativně značně kolísají. Poměr mezi koncentracemi metabolitů ABZSO a ABZSO₂ je řádově několikanásobně vyšší ve prospěch ABZSO. Po osmé hodině od podání je pak patrný pokles koncentrací ABZ i ABZSO a ABZSO₂.

Hodnota průměrné maximální koncentrace, která se nachází po podání léčiva ve žluči ze žlučníku je 3,6 µg/ml. Ve žluči ze žlučovodů je pak tato hodnota nepatrně nižší a to 3,3 µg/ml. Koncentrace metabolitů ABZSO a ABZSO₂ nejsou při porovnání mezi žlučí ze žlučníku a žlučovodů v námi měřených vzorcích totožné, řádově se však neliší.

Stereospecifita metabolizace ABZ na ABZSO (+) a ABZSO (-) je posunuta ve prospěch ABZSO (+). V čase od podání se poměr metabolitů mění ve prospěch ABZSO (+) až do 8. hodiny, kdy dosáhne maxima a poté již klesá. Při porovnání enantiomerů mezi žlučí a sérem je patrná převaha ABZSO (+) v séru oproti žluči v řádu několika procent.

POUŽITÁ LITERATURA

AISLP mikroverze 2008.1: databáze léků (<http://www.aislp.cz>)

AISLP: SPC přípravku Zentel®, SmithKline Beecham Laboratoires
Pharmaceutiques, Francie, 2005

AISLP: SPC přípravku Albex, Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing Ltd., Loughrea,
Co. Galway, Ireland.

AISLP: SPC přípravku Aldifal, Mevak a.s. Nitra, Biovetská 32, p.sch. 29/c, 949 91
Nitra, SR.

Blažek K., Kotrlý A., Ippen R.: Sarkosporidióza myokardu spárkaté zvěře,
Vet.Medicina, Praha, 21: s. 75 -80, 1976

Bowman, D.: Georgi's parasitology for veterinarians. 7. vyd. Philadelphia, Pennsylvania:
W. B. Saunders Company, 1999, 414 s. ISBN 0-7216-7097-0.

Buchar J., Ducháč V., Hůrka K., Lellák J.: Klíč k určování bezobratlých, 1.vyd. Praha:
Scientia s.r.o., 1995, s. 52-54, ISBN 80-85827-81-6

Červený J., Kamler J., Kholová H., Koubek P., Martínková N.: Encyklopedie
myslivosti. 1. vyd. Praha: Ottovo nakladatelství s.r.o., 2004, s. 341-343, 411.. ISBN 80-
7181-901-8.

Čorba, J., Krupicer, I., Legény, J., Juris, P., Vesely, L., 1991. Effect of a controlled-
release albendazole capsule on parasitism and productivity of sheep. Vet. Parasitol. 40,
s. 273–279.

Cristofol, C., Virkel, G., Alvarez, L., Sanchez, S., Arboix, M.& Lanusse, C.E. (2000)
Comparative disposition of ricobendazole enantiomers after intravenous and

subcutaneous administration of a racemic formulation to calves. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 8, s. 303 – 311

Cordero, M., 1980. *Indice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Madrid, pp. 579

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

Dressman, J., B. Reppas, Ch.,: *In vitro - in vivo* correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 11, 2000, s. 73-80

Ducháček L.: Muelleriáza a dikroceliáza mufloní zvěře - terénní ověření účinnosti vybraných anthelmintik, *Disertační práce, Veterinární a Farmaceutická Universita Brno*, 2003

Ducháček L., Lamka J.: Dicrocoeliosis – the present state of knowledge with respect to wildlife species, *Acta Vet. Brno*, 72, 2003, s. 613-626

Frayha, G., J., Smyth, J., D., Gobert, J., G., Savel, J.,: The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drug in man, *General Pharmacology*, 28, 1997, s. 273-299.

Gilleard J.S.: Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics, *International Journal for Parasitology* 36 (2006), s. 1227–1239

Himonas, C.A., Liakos, V., 1980. Efficacy of albendazole against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet. Rec.* 107, s. 288–289.

Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N.,: Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Ruminant Research*, 29, 1998, s. 33-41

Jíra J.: *Lékařská helmintologie, Helminthoparazitární nemoci*, 1.vyd. Praha: Galén, 1998, s. 126-129. . ISBN 80-85824-82-5

Jung, H., Medina, L., Garcia, L., Feuentes, I., Moreno R.,: Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 1998, s. 43-48.

Kolda F. a spol.: *Myslivost - O zvěři, lovu a zákonech*. 1.vyd Praha: Nakladatelství Plot, 2004, s. 45-47. . ISBN 80-86523-33-0

Kotrlá B. a kolektiv: *Parazitózy zvěře*. 1.vyd Praha: Academia, 1984, s. 157-162. .

Kuběnová M.: *Studium biotransformačních enzymů u parazita motolice kopinaté*, Diplomová práce, FaF HK, 2006

Kratochvíl J.: *Použitá zoologie 1 – Bezobratlí*, 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1973, s. 180-184. . ISBN 07-031-73

Lacey E., Prichard R., K.,: Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical parasitology*, 19 (2), 1986, s. 171-181

Lacey, E.,: Mode of action of benzimidazoles, *Parasitology Today*, 6, 1990, s. 112 -115

Lamka J, Ducháček L.: *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. 3 vyd. Praha: Karolinum, 2006, s. 64 – 66. . ISBN 80-246-1234-7

Lanusse, C., E., Prichard, R., K., Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintic, in ruminants. *Drug metabolism reviews*, 25, 1993, s. 235-279.

Manga-González, M.Y., González-Lanza, C., Del-Pozo, P., 1991. Dynamics of the elimination of *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda, Digenea) eggs in the faeces of lambs and ewes in porma basin (León, Nw Spain). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* s. 66, 57–61.

Mavrova A., KamelyaAnichina K. K., Vuchev D. I., Tsenov J. A., Denkova P.S., Kondeva M. S., Micheva M. K.: Antihelminthic activity of some newly synthesized 5(6)-(un)substituted-1H-benzimidazol-2-ylthioacetyl piperazine derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry 41, 2006, s. 1412-1420

McCracken R., O., Stillwell, W., H.: A possible biochemical-mode of action for benzimidazole anthelmintic. International Journal for Parasitology, 21, 1991, 99-104

Moroni P., Buronfosse T., Longin Sauvageon C., Delatour P., Benoit E.: Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenin dinucleotide-containing and cytochrom P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes, Drug Metab. Disp., 2, 1995, s. 160-165

Páv Jaromír, MVDr. a kolektiv: Choroby lovné zvěře. 1.vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1981, s. 144-195

Otranto D., Traversa D.: A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment, Veterinary Parasitology 107, 2002, s. 317–335

Velík J., Baliharová V., Skálová L., Szotáková B., Wsól V., Lamka J.: Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes, J. Vet. Pharmacol. Therap., 26, 2003, s. 297-302

Solana, H., D., Teruel, M., T., Najle, R., Lanusse, C., E., Rodrigues, J., A.: The anthelmintic albendazole affect *in vivo* the dynamics and the detyrosination-tyrosination cycle of rat brain microtubules. Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana, 48, 1998, 199-205.

Solana, H., D., Sallovitz, J., M., Lanusse, C., E., Rodriguez, J., A.: Enantioselective binding of albendazole sulphoxide of cytosolic proteins from helminth parasites. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 24, 2002, s. 7-13.

Tomiczek H., Türcke F.: Mufloní zvěř - biologie, chov, lov. 4.vyd. Praha: Víkend, 2007, s. 9-22, 73-79. . ISBN 978-80-86891-70-5

Velík J., Baliharová V., Skálová L., Szotáková B., Wsól V., Lamka J.,: Stereospecific biotransformation of albendazole in mouflon and rat-isolated hepatocytes, J. Vet. Pharmacology Ther., 26, 2003, s.297-302

Velík J., Szotáková B., Baliharová V., Lamka J., Šavlík M., Wsól V., Šnejdrová E., Skálová L.: Albendazole repeated administration induces cytochromes P4501A and accelerates albendazole deactivation in mouflon (*Ovis musimon*), Res. Vet. Sci., 78, 2005, 255-263 Clinical Pharmacology, 1, 7–13.

Velík J.: K biotransformačním aspektům albendazolu u hospodářských a volně žijících druhů zvířat, Disertační práce, Universita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta University Karlovy, 2005

Vyhláška 245/2002 Ministerstva zemědělství o době lovu jednotlivých druhů zvěře a bližších podmínkách provádění lovu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABZ	albendazol
ABZSO	albendazolsulfoxid
ABZSO ₂	albendazolsulfon
ABZSOO	albendazolsulfon
ACN	acetonitril
ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace
CYP	cytochrom P450
FMO	flavinové monoxygenázy
HPLC	high performance liquid chromatography