

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE ANTHELMINTIK A JEJICH
METABOLITŮ U TASEMNIC METODOU LC/MS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2012

David Briestenský

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Úvodem mé diplomové práce bych rád poděkoval školitelce Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za odborné vedení práce a za užitečné rady a návrhy při vypracování této práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Ivanovi Vokřálovi a Mgr. Haně Bártíkové za pomoc s experimentální částí diplomové práce. V neposlední řadě děkuji pracovníkům celé katedry biochemických věd za milý přístup a příjemné prostředí a Mgr. Simoně Bernardové za překlad abstraktu a za gramatickou korekci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Titul, jméno, příjmení kandidáta: David Briestenský

Titul, jméno, příjmení školitele: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Název diplomové práce: Identifikace a kvantifikace anthelmintik a jejich metabolitů u tasemnic metodou LC/MS

Biotransformace anthelmintik, stejně jako aktivita biotransformačních enzymů, představují oblasti, které zatím u tasemnic nejsou příliš prozkoumané. Avšak právě biotransformační enzymy mohou do určité míry chránit organismus parazita proti působení anthelmintik (a xenobiotik obecně). Schopnost parazita metabolizovat podané anthelmintické léčivo na neúčinný metabolit může představovat výhodný obranný mechanismus, který může přispívat ke vzniku helmintorezistence. Cílem mé práce bylo zhodnotit metabolismus vybraných anthelmintik (albendazolsulfoxid, flubendazol, mebendazol) u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Výsledky biotransformace ukazují, že tasemnice není schopná oxidovat ani redukovat albendazolsulfoxid. Mebendazol a flubendazol je schopná redukovat. Pro redukci mebendazolu a flubendazolu byly určeny kinetické parametry, které ukázaly, že rychlost přeměny na redukovaný metabolit je u flubendazolu dvacetkrát pomalejší než u mebendazolu, ale afinita reduktas je u flubendazolu sedmkrát vyšší. Jedinými metabolity druhé fáze biotransformace byly dva různě methylované deriváty redukovaného flubendazolu. V jednom případě byl methyl na benzimidazolovém jádře (C-methylace), ve druhém na postranním řetězci (N-methylace). Metabolity anthelmintik byly detekovány a identifikovány pomocí HPLC se spektrofluorometrickým detektorem, s UV detektorem nebo s hmotnostním spektrometrem. V porovnání s výsledky metabolizace u jiných helmintů se ukázalo, že biotransformace xenobiotik je rozdílná nejen u různých helmintů v rámci jednotlivých tříd, ale i mezi tasemnicemi samotnými.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: David Briestenský

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Identification and quantification of anthelmintics and their metabolites in tapeworms by LC/MS

Biotransformation of anthelmintics, as well as the activity of biotransformation enzymes, represents areas that are not yet so much explored at the tapeworms. However especially biotransformation enzymes can to a certain extent protect organism of the parasite against effects of anthelmintics (and xenobiotics in general). The ability of the parasite to metabolize administered anthelmintic drug to an inactive metabolite can represent a convenient defence mechanism that may contribute to the formation of resistance. The aim of my thesis was to evaluate the metabolism of selected anthelmintics (albendazole sulphoxide, flubendazole, mebendazole) in *Hymenolepis diminuta*. Results of metabolism show that the rat tapeworm is unable to oxidize or reduce albendazole sulphoxide. Tapeworm is able to reduce mebendazole and flubendazole. For mebendazole and flubendazole reduction the kinetic parameters were determined. It was shown that the rate of conversion to reduced metabolites of flubendazole is twenty times slower than for mebendazole reduction, but the affinity of reductases is seven times higher to flubendazole. The only phase II metabolites were two methylated derivatives of reduced flubendazole. In one case methylation took place on benzimidazole core (C-methylation), in second on the side chain (N-methylation). Metabolites were detected and identified using HPLC with spectrofluometric detector, UV detector and mass spectrometer. Compared with the results of the metabolism in other helminths, it was shown that the biotransformation of xenobiotics is different not only in different helminths within individual classes, but also among tapeworms themselves.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 <i>HYMENOLEPIS DIMINUTA</i>	9
2.1.1 Taxonomie.....	9
2.1.2 Stavba těla	9
2.1.3 Vývojový cyklus	10
2.1.4 Ovlivnění hostitele	11
2.1.5 Crowding efekt.....	12
2.2 ANTHELMINTIKA	12
2.2.1 Benzimidazolová anthelmintika	13
2.3 METABOLISMUS XENOBIOTIK U HELMINTŮ	15
2.4 BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY.....	16
2.4.1 Enzymy fáze I biotransformace.....	16
2.4.1.1 Oxidační enzymy.....	16
2.4.1.2 Redukční enzymy	17
2.4.1.3 Hydrolytické enzymy	18
2.4.2 Enzymy fáze II biotransformace	18
2.4.2.1 Glutathion-S-transferasa.....	18
2.4.2.2 Methyltransferasa	19
2.4.3 Fáze III biotransformace	20
2.5 METABOLISMUS XENOBIOTIK U <i>H. DIMINUTA</i>	20
2.6 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	21
2.6.1 Detektory	22
2.7 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	23
2.7.1 Iontový zdroj	24
2.7.2 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR	24
2.7.3 Detektor.....	25
2.8 SPOJENÍ LC/MS.....	26
2.8.1 LC/MS při studiu metabolismu léčiv	27
3 CÍL PRÁCE.....	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 CHEMIKÁLIE.....	30
4.2 PŘÍSTROJE	30
4.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	31
4.4 PRACOVNÍ POSTUP	32
4.4.1 Příprava pufrů, médií a roztoků.....	32
4.4.2 Stanovení koncentrace bílkovin s využitím BCA	34
4.4.3 <i>In vitro</i> biotransformace anthelmintik u <i>H. diminuta</i>	35
4.4.3.1 Inkubace subcelulárních frakcí s ABZ.SO	35
4.4.3.2 Inkubace FLU v cytosolu s různými koenzymy.....	36
4.4.3.3 Inkubace cytosolu s FLU a MBZ	36
4.4.4 <i>Ex vivo</i> biotransformace anthelmintik u <i>H. diminuta</i>	37
4.4.4.1 Inkubace živých tasemnic s MBZ a FLU	37
4.4.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	38
4.4.5.1 Podmínky HPLC pro stanovení metabolitů ABZ.SO	38
4.4.5.2 Podmínky HPLC pro kinetickou studii	39
4.4.6 LC/MS	41

4.4.6.1 Podmínky LC/MS pro stanovení metabolitů FLU, MBZ a ABZ.SO.....	41
5 VÝSLEDKY	43
5.1 STANOVENÍ BÍLKOVIN	43
5.2 <i>IN VITRO</i> BIOTRANSFORMACE ANTHELMINTIK U <i>H. DIMINUTA</i>	43
5.2.1 Inkubace subcelulárních frakcí s ABZ.SO	43
5.2.2 Inkubace FLU v cytosolu s různými koenzymy.....	44
5.2.3 Inkubace cytosolu s FLU a MBZ	44
5.3 <i>EX VIVO</i> BIOTRANSFORMACE ANTHELMINTIK U <i>H. DIMINUTA</i>	46
5.3.1 LC-MS ⁿ analýza metabolitů FLU	46
5.3.2 LC-MS ⁿ analýza metabolitů MBZ	48
6 DISKUSE.....	49
7 ZÁVĚR.....	53
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	54
9 SEZNAM LITERATURY	56

1 ÚVOD

Helmintózy jsou infekční choroby vyvolané mnohobuněčnými živočichy, pro které se vžil označení červi. Helmintózy představují jednu z nejrozšířenějších příčin ohrožení zdravotního stavu hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Chovatelům hospodářských zvířat působí tyto nemoci značné ekonomické ztráty. Mnohé helmintózy jsou i zoonózami (Lamka, Ducháček 1998). V tropických zemích a oblastech s nižším hygienickým standardem představuje vysoká míra infikace lidí vnitřními parazity vážný problém, který spolu s nedostatečnou výživou vede ke zvyšování dětské úmrtnosti (Stejskal 2005).

K prevenci a léčbě těchto onemocnění se využívá celá řada různorodých léčiv s anthelmintickými účinky. Většina užívaných léčiv je syntetického původu. Parazité si při častém a někdy nevhodném užívání anthelmintik tvoří vůči těmto látkám rezistenci. Pro nalezení příčiny vzniku rezistence je třeba znát mechanismy biotransformace toxických látek (xenobiotik) u helmintů.

Ve své práci jsem se zabýval biotransformací vybraných anthelmintik ze skupiny benzimidazolů (BZD) *in vitro* i *ex vivo* u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*), modelového organismu pro studium třídy Cestoda. K identifikaci metabolitů byla použita metoda LC/MS, ke kvantifikaci metabolitů byla použita metoda HPLC.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Hymenolepis diminuta*

2.1.1 Taxonomie

<u>Říše:</u>	Animalia
<u>Kmen:</u>	Platyhelminthes
<u>Třída:</u>	Cestoda
<u>Řád:</u>	Cyclophyllidea
<u>Čeleď:</u>	Hymenolepididae
<u>Rod:</u>	Hymenolepis
<u>Druh:</u>	<i>H. diminuta</i>

2.1.2 Stavba těla

Dospělý jedinec měří od 20 do 60 cm. V krajních případech může dorůst až do velikosti 90 cm (Dewey 2001). Jeho ploché tělo se skládá ze dvou částí. První tvoří skolex (hlavička), který je vybaven čtyřmi kruhovými přísavkami a vysunovatelným chobotkem (rostellum). V hlavičce se nachází smyslové centrum tasemnice, ze kterého vede síť podélných nervů, která je rozprostřena po celém těle. Takto může tasemnice vnímat vnější podněty. Druhou částí je segmentovaná strobila (tělo). Ta je tvořena jednotlivými články (proglotidy), které představují samostatné reprodukční jednotky. Povrch těla pokrývá tegumentum (neodermis). Na povrchu tasemnic se nacházejí mikrotrichy (přeměněné mikrovláčky), které pokrývá glykokalyx (Volf a kol. 2007).

Spolu se všemi členy třídy Cestoda i tasemnice krysí postrádá jakékoliv stopy zažívacího traktu. Veškeré živiny a potřebné látky přijímá povrchem těla. K tomuto účelu slouží i mikrotrichy, které zvětšují plochu těla. Jejich počet tak ovlivňuje množství vstřebaných živin. Glykokalyx, vrstva makromolekul obsahujících sacharidy, ochraňuje *H. diminuta* před mechanickým a chemickým poškozením ve střevech definitivního hostitele. Interakcí glykokalyxu a určitých molekul dochází ke zvýšení aktivity amylasy v *H. diminuta* a potlačení aktivity enzymů trypsinu, chymotrypsinu a pankreatické lipasy konečného hostitele. Dochází také k poklesu absorpce kationtů a žlučových solí do těla parazita (Dewey 2001).

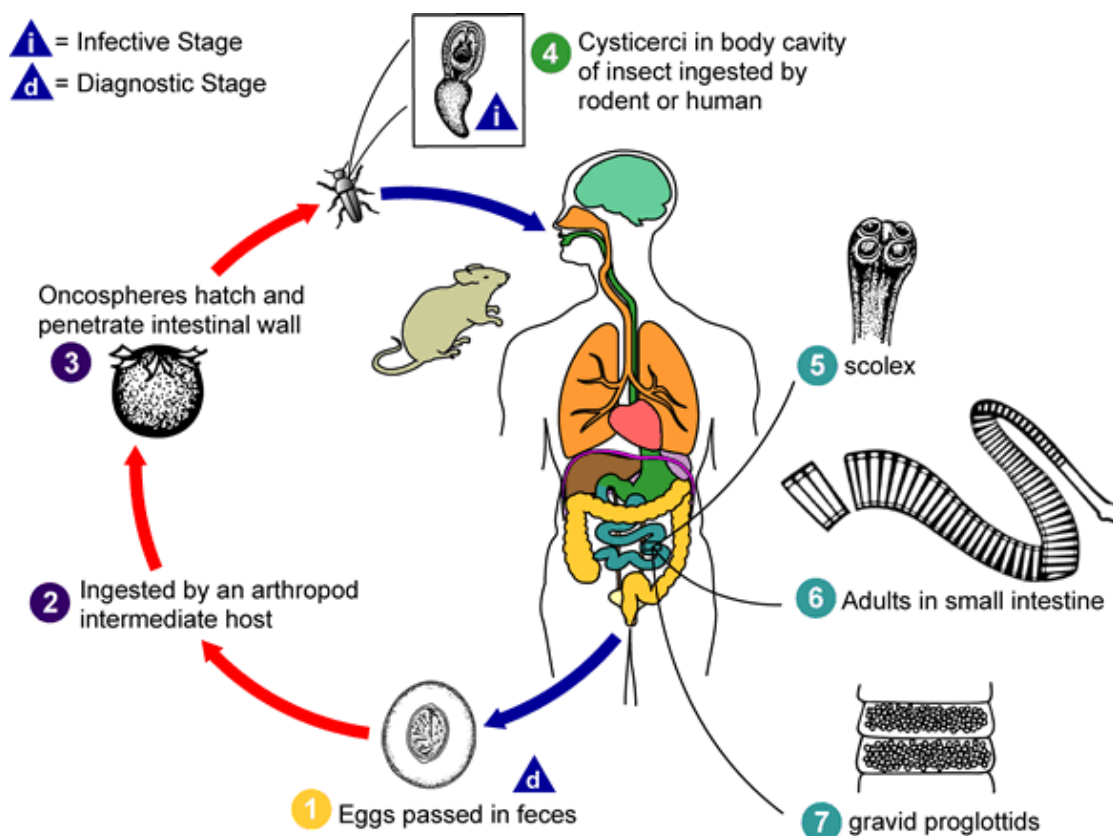


Obr. 1. *Hymenolepis diminuta*. Foto: Mgr. Ivan Vokřál

2.1.3 Vývojový cyklus

Životní cyklus je nepřímý a je schematicky znázorněn na obrázku 2. Tasemnice jsou živočichové oviparní (vejcorodí). Vajíčka (1) jsou uvolňována buď izolovaně opuštěním článku uterinním pórem (anapolyze) nebo uvnitř celého článku (apolyze), se stolicí pak opouštějí definitivního hostitele (Volf a kol. 2007). Ve vnějším prostředí vajíčka nepřežijí více než 10 dní (DPDx – Hymenolepiasis). Uvnitř vajíčka se vytváří první larva – onkosféra (hexakant). Pro další vývoj musí být vajíčko pozřeno mezihostitelem (2), kterým jsou nejčastěji brouci rodu *Tenebrio* (Shea 2007) nebo *Tribolium* (Evans a kol. 1998). Méně často se jím stává blecha. Při pozření dojde k porušení skořápky a v lumen střeva dojde po natrávení ochranných vrstev k uvolnění onkosféry (3) z vajíčka (Lethbridge 1971). Ta pronikne přes střevní stěnu do hemocoelu, tělní dutiny, která je součástí oběhové soustavy hmyzu. Zde se z onkosféry vyvine druhá larva – cysticerkoid (4). V tomto stádiu je *H. diminuta* infekční. Konečným hostitelem jsou především hlodavci (krysy, potkani). Ve výjimečných případech se jím stává i člověk (Andreassen a kol. 1999, Tena a kol. 1998). V žaludku a tenkém střevě definitivního hostitele dojde k uvolnění cysticerkoidů z tkání mezihostitele. Po vylíhnutí skolexu (5) se čtyřmi přísavkami se parazit přichytí ke stěně tenkého střeva. V dospělého jedince (6) se parazit vyvine během 3 týdnů (DPDx – Hymenolepiasis).

Tasemnice jsou hermafrodité. Každý článek obsahuje samčí i samičí reprodukční orgány. K oplození může dojít mezi dvěma jedinci nebo mezi články na stejné strobile. Vajíčka jsou obsažena v nejstarších článcích na konci těla (7) (Volf a kol. 2007).



Obr. 2. Životní cyklus *Hymenolepis Diminuta* (DPDx - Hymenolepiasis)
 (Jednotlivé fáze jsou popsány v kapitole 2.1.3)

Člověk jako definitivní hostitel se může nakazit alimentární cestou. Klinický průběh je asymptomatický, při větším počtu tasemnic ve střevě se mohou objevit bolesti břicha, průjmy až poškození střev (Mencl 2001, Dewey 2001). Onemocnění se nazývá hymenolepióza (Förstl a kol. 2004).

2.1.4 Ovlivnění hostitele

Parazité často vyvolávají u hostitele různé změny počínaje morfologií, přes regulaci metabolismu a rozdělování energie pro jednotlivé životní funkce, až po specifické zásahy do nervového systému vedoucí ke změnám chování hostitele, a tím zvyšují pravděpodobnost, že dojde k úspěšné infekci (Flegr, Havlíček 1999).

Tasemnice nejsou výjimkou. Trus infikovaných potkanů přitahuje potemníka hnědého (*Tribolium confusum*) (Evans a kol. 1998) a potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) (Shea 2007) více než trus neinfikovaných potkanů. Brouci tak dokáží rozlišit infikovaný trus, který obsahuje více lipidů a méně sacharidů, a tím se zvyšuje šance na pozření vajíčka tasemnice (Pappas, Wardrob 1997). Infikované brouky však trus nakažených potkanů již neláká a to nejspíše z důvodů odvrácení možnosti letální infekce nebo k zamezení kompetice o hostitele (Shea 2007).

Studie hostitelských vztahů *Tenebrio molitor* – *Hymenolepis diminuta* ukázaly, že je brouk parazitem ovlivňován a stává se tak snadnější kořistí pro definitivního hostitele. Infikovaní brouci se v bludišti ve tvaru T pohybují značně pomaleji než brouci v kontrolní neinfikované skupině. Infikovaným broukům také trvá déle, než se naučí volit správnou cestu. Vliv infekce je zřetelný již po prvním týdnu od pozření vajíčka a dokonce vyšší po dvou týdnech. Delší infekce již schopnosti brouka nezhoršuje (Sheiman a kol. 2006).

2.1.5 Crowding efekt

Bylo zjištěno, že ve větších populacích tasemnic se velikost jednotlivých jedinců *H. diminuta* v tenkém střeově úměrně zmenšuje vůči jejich celkovému počtu. Tento jev se označuje jako crowding efekt.

V *in vitro* experimentech bylo objeveno, že tasemnice do média vylučuje mimo jiné acetát, cGMP, kyselinu glukosaminovou a sukcinát. Tyto látky mají schopnost inhibovat syntézu DNA v rostoucí části organismu parazitů. Tasemnice, na které při experimentech tyto látky působily, měly méně proglotidů než kontrolní skupina a tím je podpořena teorie, že uvolňované látky *in vitro* jsou součástí mechanismu crowding efektu *in vivo*. Tento efekt tasemnice využívají, aby snížily poškození hostitele (Cook, Roberts 1991).

2.2 Anthelmintika

Anthelmintika jsou látky používané pro eliminaci helmintů z organismu. Nejčastěji se jedná o látky syntetického původu, které pro své výhodné vlastnosti (stále stejná jakost, ekonomicky výhodná výroba, vhodná forma pro uchovávání i pro aplikaci) prakticky zcela vytlačily rostlinné drogy a z nich izolované účinné látky (Lamka, Ducháček 1998). Stejně jako se dělí helminté do tří skupin: tasemnice (Cestodes), hlístice (Nematodes) a motolice (Trematodes), dělíme i anthelmintika. Proti tasemnicím

se používají anticestodika (Lincová, Farghalli 2007). Anthelmintika s nejširším užitím, které máme k dispozici, jsou BZD (Köhler 2001).

2.2.1 Benzimidazolová anthelmintika

Ideální anthelmintikum by mělo být bezpečné, snadno dávkovatelné a aplikovatelné, se širokým spektrem účinku. Tyto požadavky splňují BZD, které jsou používány od roku 1961. Jejich plošné užívání bez střídání s jinými druhy anthelmintik má za následek u některých parazitů rozvoj rezistence (Bodeček, Koudela 2009).

Podávání benzimidazolových anthelmintik je celosvětově rozšířeno především ve veterinární medicíně. Dle ATC klasifikace jim náleží kód Q09AA (veterinaria-anthemintika) (Velík a kol. 2004). V terapii a k prevenci se konkrétně používají tyto látky: albendazol, fenbendazol, flubendazol, kambendazol, mebendazol, luxabendazol, oxibendazol, parbendazol, thiabendazol, triklabendazol. Léčiva netobimin, febantel a thiofanát jsou proléčiva (probenzimidazoly), v cílovém organismu jsou metabolizována na anthelminticky účinné metabolity. V humánní medicíně se z derivátů BZD k terapii helmintóz používají pouze mebendazol, albendazol a thiabendazol.

BZD jsou léčiva s antinematodní, anticestodní a z části antitrepatodní aktivitou. Mechanismus účinku je založen na vazbě léčiva na β -tubulin, protein nutný k tvorbě mikrotubulů. Mikrotubulinové struktury zprostředkovávají životně důležité funkce jako je mitóza, pohyb a transport. Mezi tubulinem helmintů a savců existují strukturální rozdíly, proto nepůsobí BZD toxicky i na hostitele. Výsledkem je rozvrat energetického metabolismu, vyčerpání energie, imobilizace a následná smrt citlivých parazitů. Většina léčiv této skupiny působí proti vývojovým i dospělým stádiím helmintů, některé látky působí i ovicidně (Bodeček, Koudela 2009).

Následuje stručný popis benzimidazolových anthelmintik, se kterými jsem pracoval a sledoval jejich biotransformaci u tasemnice krysí.

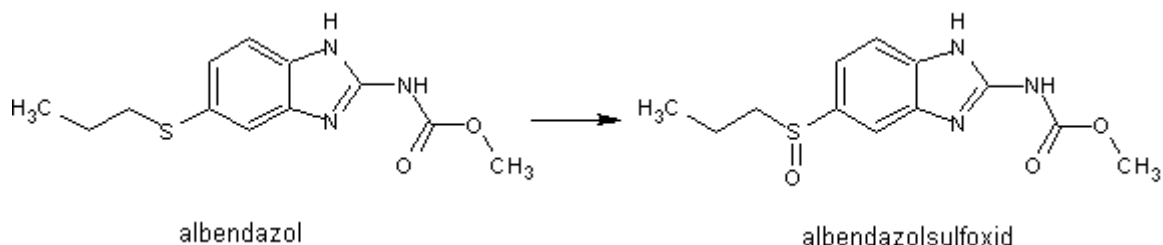
Albendazolsulfoxid

Chemický název: methyl-[5-(propylsulfinyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát

Zkratka: ABZ.SO

Sumární vzorec: C₁₂H₁₅N₃O₃S

Molekulová hmotnost: 281,33 g.mol⁻¹



Obr. 3. Chemická struktura albendazolu a jeho metabolitu albendazolsulfoxidu

Albendazolsulfoxid (Rikobendazol) je aktivním metabolitem albendazolu (ABZ). Má tedy i stejné účinky. Působí na hlístice, tasemnice, motolice a dokonce i proti prvku lamblie střevní (*Giardia lamblia*). Působí larvicidně, ovicidně a vermucidně. Hlavní cestou biotransformace je oxidace. Metabolitem je farmakologicky neaktivní albendazolsulfon (ABZ.SOO) (SPC Zentel®).

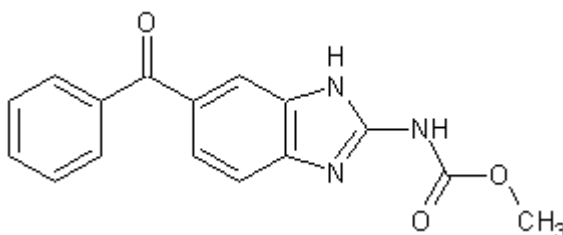
Mebendazol

Chemický název: methyl-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl) karbamát

Zkratka: MBZ

Sumární vzorec: C₁₆H₁₃N₃O₃

Molekulová hmotnost: 295,29 g.mol⁻¹



Obr. 4. Chemická struktura mebendazolu

Mebendazol se používá jak ve veterinární medicíně, tak při léčbě člověka. U lidí je indikován při infekcích parazity roup dětský (*Enterobius vermicularis*) nebo škrkavka dětská (*Ascanis lumbricoides*), u zvířat při parazitózách způsobených hlísticemi rodu *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Toxocara* nebo *Ascaris*. Ve veterinární medicíně je určen především k léčbě ovcí, koz a koní.

Mebendazol je metabolizován zejména v játrech. Hlavními metabolickými cestami jsou redukce karbonylové skupiny na hydroxylovou a hydrolýza karbamoylové skupiny na aminoderivát, která byla pozorována u koní a lidí (SPC Vermox®).

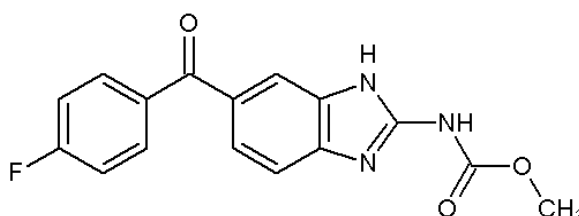
Flubendazol

Chemický název: methyl-[5-(4-fluorobenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl] karbamát

Zkratka: FLU

Sumární vzorec: C₁₆H₁₂FN₃O₃

Molekulová hmotnost: 313,29 g.mol⁻¹



Obr. 5. Chemická struktura flubendazolu

Flubendazol je fluoroderivát mebendazolu. Používá se při tlumení a léčbě parazitóz vyvolaných gastrointestinálními a plicními červy ze tříd Nematoda a Cestoda. Ve veterinární medicíně je užíván při léčbě prasat, drůbeže a lovného ptactva. Hlavními metabolickými cestami je hydrolýza karbamátové skupiny a redukce karbonylové skupiny (SPC Flumixan®).

2.3 Metabolismus xenobiotik u helmintů

Ve svém životním prostředí se parazité dostávají do kontaktu s celou řadou chemických látek. Některé sloučeniny využívají především pro růst a reprodukci. Velké množství látek nemá pro parazita fyziologickou hodnotu a mohou být pro něho i toxické. Tyto látky nazýváme xenobiotika. Pro helminty jsou xenobiotiky sekundární metabolity z potravy hostitele, polutanty z životního prostředí, látky z imunitního systému hostitele a anthelmintika.

Xenobiotikum může podléhat v těle parazita jednomu ze tří cest:

- Je odstraněno v nezměněné podobě.
- Dojde k neenzymatické přeměně na jinou látku. K tomuto dochází při kontaktu xenobiotika s reaktivní molekulou nebo je vystaveno určitým fyziologickým podmínkám, jako je nízké nebo vysoké pH.
- Xenobiotikum je enzymaticky metabolizováno.

Nejčastěji je ve tkáních pozorována poslední cesta a obvykle dochází k detoxikaci, jsou ale případy, kdy je látka naopak aktivována. Hlavním efektem je

přeměna lipofilní molekuly na hydrofilní. Tato změna vede ke snadnějšímu odstranění z organismu (Precious, Barrett 1989).

Parazitě, stejně jako savci, metabolizují xenobiotika ve třech fázích. V první dochází k odkrytí hydrofilních skupin nebo zavedení polárních substituentů, jako například hydroxylové skupiny, karbonylové skupiny, aminoskupiny nebo sulfátu. Tyto reakce katalyzují hydrolytické, redukční a oxidační enzymy. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci. Konjugována je sloučenina nízké molekulové hmotnosti. Jedná se především o aminokyselinu, cukr, glutathion, fosfát nebo acetát (Barret 1997). Za třetí fázi metabolismu xenobiotik se považuje aktivní transport substrátů, metabolitů nebo konjugátů přes membránu ven z těla parazita pomocí speciálních proteinových transportérů (Cvilink a kol. 2009a).

2.4 Biotransformační enzymy

Enzymy katalyzující biotransformaci léčiv a jiných cizorodých látek mají řadu zvláštností. Oproti enzymům intermediárního metabolismu nejsou strukturálně specifické. Výhodou nízké substrátové specifity je možnost podílet se na metabolizaci velkého počtu chemicky různorodých sloučenin, a to i zcela nových (Lincová, Farghalli 2007).

2.4.1 Enzymy fáze I biotransformace

2.4.1.1 Oxidační enzymy

Existence oxidačního metabolismu xenobiotik u červů byla dlouhou dobu popírána. Až v posledních letech se objevují nezvratné důkazy oxidace léčiv (ABZ) (Solana a kol. 2001). U většiny jiných organismů mají oxidační enzymy dominantní úlohu v biotransformaci xenobiotik, především cytochrom P450 (CYP) a flavinové monooxygenasy. Teprve nedávno byla dokázána existence genů CYP v genomu hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*) (Cvilink a kol. 2009a).

Cytochrom P450 může být u helmintů nahrazen peroxidasou. Stejně jako CYP je to hemoprotein. To znamená, že jsou si tyto enzymy strukturálně podobné. Peroxidasu byla nalezena například u *Ascaridia galli*, *Fasciola hepatica* a *Hymenolepis diminuta* (Precious, Barrett 1989). Peroxidasu helmintů byly nejčastěji studovány pouze z hlediska jejich antioxidační funkce. Přítomnost helminta v organismu hostitele vede k aktivaci imunitního systému a ke zvýšení produkce volných radikálů. Před těmito radikály chrání parazita například superoxid-dismutasa (SOD), katalasa,

glutathionperoxidasa, xantinoxidasa, cytochrom c peroxidasa a peroxiredoxiny (Cvilink a kol. 2009a).

2.4.1.2 Redukční enzymy

Na rozdíl od oxidas jsou redukční a hydrolytické enzymy považovány za důležité biotransformační enzymy cizorodých látek u helmintů již mnoho let (Precious, Barrett 1989). K nejdůležitějším reakcím patří: redukce dvojně vazby, chinonů, dusíkatých funkčních skupin, funkčních skupin obsahujících síru a selen, anorganických a organokovových sloučenin, karbonylové skupiny, dehalogenace a deoxygenace arenoxidů.

Významnou skupinou jsou enzymy účastníci se redukce karbonylové skupiny. Aldehydy a ketony jsou pro buňky škodlivé, protože se mohou kovalentně vázat se sekundárními aminoskupinami a thiolovými skupinami v proteinech. Díky schopnosti interagovat s DNA jsou některé aldehydy mutagenní. Ochranu proti reaktivním karbonylovým sloučeninám zajišťují právě některé redukční enzymy (např. aldo-ketoreduktasy, aldehyddehydrogenasy, alkoholdehydrogenasy), podílejí se tudíž na detoxikačních procesech (O'Connor a kol. 1999).

U červů byly nalezeny enzymové systémy schopné redukovat aldehydy a ketony a také spíše neobvyklé azoreduktasy a nitroreduktasy (Barrett 1997). Příkladem může být redukce glyceraldehydu, daunorubicinu, acenaphthenolu, metyraponu a oracinu u *H. contortus* nebo redukce azosloučenin a nitrosloučenin u *Ascaris lumbricoides* a *Moniezia expansa* (Cvilink a kol. 2009a). Karbonylové sloučeniny jsou u savců metabolizovány na odpovídající alkoholy NAD(P)H dependentními enzymy, které se řadí do tří nadrodin:

- Dehydrogenasy/ reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)
- Dehydrogenasy/ reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR)
- Aldo-keto reduktasy (AKR)

(Crosas a kol. 2001)

SDR nadrodina: Jsou to rozpustné bílkoviny. Většinou se jedná o dimery nebo tetramery obsahující přibližně 270 aminokyselin (Combourieu a kol. 2004). Charakteristickým znakem je Rossmannův záhyb s centrálním beta-skládaným listem a katalytická tetráda Asn-Ser-Tyr-Lys. Členy této nadrodiny jsou např. karbonylreduktasa (CBR1-3) nebo L-xylulosa reduktasa. CBR1-3 má důležitou roli v metabolismu endogenních sloučenin i xenobiotik (Matsunga a kol. 2006).

MDR nadrodina: Tato skupina zahrnuje skupinu alkoholdehydrogenas (ADH). Ta se dělí do několika tříd. Například ADH1 je enzym zodpovědný za metabolismus ethanolu v játrech. ADH2 je jaterní enzym podílející se na metabolismu ethanolu a retinoidů. ADH3 je glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (Crosas a kol. 2001).

AKR nadrodina: Jsou to NAD(P)H-dependentní oxido-reduktasy, které metabolizují prostaglandiny, uhlovodíky, steroidy a další endogenní aldehydy, ketony a xenobiotika (Matsunaga a kol 2006). Struktura aldo-ketoreduktas je charakteristická svým uspořádáním alfa-helixů a beta-skládaných listů do tzv. (alfa/beta)₈-soudků (Jez a kol. 1997).

2.4.1.3 Hydrolytické enzymy

Enzymové hydrolýze podléhají endogenní i exogenní látky, hlavně estery, thioestery, epoxidy, glykosidy, amidy, aminy, peptidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Nejčastěji se jedná o adici vody na estery, amidy a epoxidy. Také některé metabolity druhé fáze biotransformace (např. konjugáty s glutathionem, sulfátem, kyselinou glukuronovou) mohou být hydrolyzovány zpět na původní léčivo. Parazité jsou velmi dobře vybaveni esterasami, zahrnujícími také fosfatasy, které hydrolyzují nitrofenylfosfáty a organofosfáty (Cvilink a kol. 2009a).

2.4.2 Enzymy fáze II biotransformace

Při druhé fázi biotransformace dochází ke konjugačním reakcím. Enzymy katalyzující tyto reakce jsou nejčastěji transferasami, např. glutathion-S-transferasy (GST), UDP-glukuronosyltransferasy (UGT), sulfotransferasy, N-acetyltransferasy nebo methyltransferasy. Až na výjimky (methylace) jsou výsledné konjugáty hydrofilnější než původní látky, a tak mohou být rychleji vyloučeny z organismu (Jančová a kol. 2010). Narozdíl od savců je o druhé fázi detoxikace u helmintů zveřejněno jen pár článků, s výjimkou glutathion-S-transferasy. Ostatní enzymy jsou ve výzkumech zanedbávány (Cvilink a kol. 2009a).

2.4.2.1 Glutathion-S-transferasa

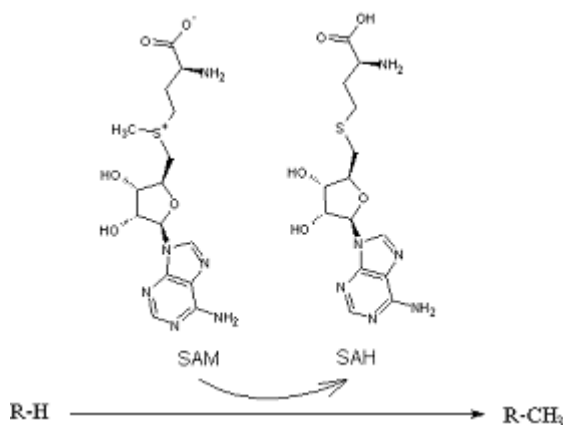
Tyto enzymy jsou dimery, kde každý monomer má vazebné místo pro glutathion (G-site) a vazebné místo pro vodík (H-site) (Barrett 1997). Ve srovnání s mikrosomy je u tasemnic 95% aktivity GST zaznamenáno v cytosolu (Brophy, Barrett

1990). Dle enzymatických vlastností a N-terminální aminokyselinové sekvence se GST dělí do osmi skupin: Alfa, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta a Omega. Všechny patří do nadrodiny rozpustných GST. Kromě této existuje ještě MAPEG nadrodina (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism). Enzymy z této skupiny jsou zapojené v metabolismu arachidonové kyseliny (Jančová a kol. 2010)

2.4.2.2 Methyltransferasa

Další konjugační činnost u některých zkoumaných druhů helmintů většinou není spojena s metabolismem cizorodých látek, ale spíše s metabolismem látek fyziologického charakteru (Cvilink a kol. 2009a).

Methylace jako jedna z možných metabolických cest xenobiotik u helmintů byla poprvé zaznamenána u motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*). V *ex vivo* experimentech byly u tohoto parazita ve druhé fázi biotransformace objeveny methylestery redukovaného FLU a redukovaného MBZ. Byla to hlavní a jediná metabolická cesta ve druhé fázi biotransformace. Enzymy účastníci se na methylaci se zdají být selektivními, protože ABZ methylován nebyl. Kromě toho oba nalezené deriváty nebyly methylovány stejným způsobem. Redukovaný FLU byl metabolizován na dva různé monomethylované deriváty s funkční skupinou v odlišných pozicích. U redukovaného MBZ byl nalezen jeden dimethylovaný metabolit. Monomethylované metabolity MBZ, stejně jako methylované deriváty parentních léčiv FLU a MBZ nalezeny nebyly. *D. dendriticum* má také pravděpodobně enzymatické systémy schopné syntetizovat S-adenosylmethionin, který se uplatňuje jako kofaktor při methylacích u savců (Cvilink a kol. 2009b).



Obr. 6. Schéma tvorby methylovaných derivátů za pomoci SAM (S-adenosylmethioninu), který se demethyluje na SAH (S-adenosylhomocystein)

2.4.3 Fáze III biotransformace

Za třetí fázi biotransformace se považuje transport xenobiotik a jejich metabolitů ven z buněk. Opačný jev, transport do buněk se nazývá fáze 0. Transportéry, membránové vázané proteiny přenášející látky přes membrány, jsou důležitým článkem v detoxikaci xenobiotik. Cílem výzkumu se častěji stávají přenašeče exportující cizorodé látky, protože hrají důležitou roli při vzniku rezistence.

Hlavní rodinou exportujících transportérů jsou ABC přenašeče (ATP-binding cassette). Tyto přenašeče se nacházejí ve všech buňkách, všech tříd organismů od mikrobů po člověka. ABC přenašeče zprostředkovávají aktivní přenos jak lipofilních, tak hydrofilních metabolitů a konjugátů ven z buňky. Nejznámějším transportérem je P-glykoprotein (Pgp, ABCB1), který je také nejdůležitější efluxní pumpou účastnící se metabolismu xenobiotik.

ABC transportéry byly nalezeny i u mnoha tříd červů. První popsáný Pgp u červů byl zjištěn u hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Dále pak byly nalezeny u několika motolic (*Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*) a také hlístic (*Haemonchus contortus*) (Cvilink a kol. 2009a). Přítomnost ABC transportérů u tasemnic popsána zatím není.

2.5 Metabolismus xenobiotik u *H. diminuta*

Redukční a hydrolytické reakce jsou jako u ostatních helmintů i u tasemnic těmi hlavními reakcemi v první fázi biotransformace xenobiotik. Přítomnost cytochromu P450 ani cytochromu b₅ potřebných k oxidačním funkcím se nepodařilo prokázat. Obecně se o oxidacích u tasemnic ví velmi málo.

Experimenty dokazují, že je *H. diminuta* schopna redukovat celou řadu organických substrátů. Jako kofaktor redukčních reakcí bývá preferován NADPH před NADH. Enzymové extrakty *H. diminuta* redukují snadno aldehydy na alkoholy (acetaldehyd, glyceraldehyd, p-nitrobenzaldehyd). U ketonů (aceton, butanon) za účasti kofaktoru NADPH i NADH nebyla zaznamenána u tasemnice žádná redukce. V homogenátech byl také redukován azobenzen, čímž se potvrdila aktivita azoreduktasy. Aktivita nitroreduktasy nebyla na substrátech p-nitrosoanisolu a-nitrobenzoové kyseliny prokázána. Ale při pokusu se tímto způsobem prokázala aktivita nitroreduktasy v potkaních játrech. Redukce disulfidické vazby proběhla u oxidovaného glutathionu. U cystinu byla redukce negativní (Munir, Barrett 1985).

Z hydrolytických enzymů byla zaznamenána aktivita fosfatas, N-deacetylasy a esteras. U O-deacetylasy a sulfatas nebyla zjištěna žádná aktivita. Pomocí α -glykosidasy a β -glykosidasy je schopná *H. diminuta* hydrolyzovat alfa a beta glykosidy. Aktivita β -glukuronidasy zaznamenána nebyla (Munir, Barrett 1985).

U druhé fáze biotransformace jsou hlavní skupinou enzymů glutathion-S-transferasy. Z helmintů je právě u tasemnic popsána jejich největší aktivita (Barrett 1997). Nejvíce GST je v cytosolu. V porovnání s mikrosomy je v cytosolu zaznamenána 95% aktivita GST. Z cytosolu byly izolovány čtyři formy. Žádná z nich nevykazuje aktivitu ke kumenhydroperoxidu, substrátu savčí rodiny GST Alfa. A také vůči ethakrynové kyselině, substrátu Alfa a Pi rodin. Experimenty však ukázaly nízkou aktivitu enzymu *H. diminuta* vůči substrátu Mu rodiny, trans-4-fenylbuten-2-onu. Zdá se, že existuje podobnost mezi GST tasemnice *H. diminuta* a savčí rodinou GST Mu (Brophy, Barrett 1990).

2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metod, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Dělená směs se rozpustí ve vhodném rozpouštědle a absorbuje se na stacionární fázi, nejčastěji oxid hlinitý nebo silikagel. Mobilní fáze (MF) poté postupně vymývá jednotlivé složky s různým časovým odstupem. Čas potřebný k eluci sloučeniny je závislý na její polaritě. HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek. K dalším výhodám patří citlivost (v závislosti na použitém detektoru), potřeba minimálního množství vzorku, možnost automatizace a univerzální použití. Lze takto analyzovat látky polární, nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní, látky o velké molekulové hmotnosti nebo molekuly s nábojem. Mezi výhody můžeme počítat i možnost změny složení mobilní fáze a tím zlepšení separace. Tento proces nazýváme gradientová eluce (Klimeš a kol. 2008).

Metodu HPLC můžeme realizovat na tzv. normálních fázích, kdy je stacionární fáze polárnější než mobilní, nebo na reverzních fázích (RP HPLC), kde je tomu naopak. Strukturální změny vyvolané při biotransformaci ve většině případů vedou ke zvýšení polaritě metabolitů, proto se využívá častěji RP HPLC (Holčápek a kol. 2008).

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R . Je to čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Shoda t_R píku

léčiva ve vzorku a t_R standardu je důkazem totožnosti. Kvantitativní charakteristikou v HPLC je plocha chromatografického píku (Klimeš a kol. 2008).

Před vlastní HPLC analýzou je zpravidla nutné léčivo a jeho metabolity izolovat a to nejčastěji extrakcí do vhodného organického rozpouštědla. Extrakční metody, které jsem používal při experimentech, jsou popsány v experimentální části.

2.6.1 Detektory

Existuje mnoho způsobů detekce látek. Následuje popis nejběžnějších detektorů. Hlavními požadavky na HPLC detektory jsou vysoká citlivost, rychlá odezva, nízká hladina šumu. Detekce by měla být co nejméně ovlivnitelná vnějšími vlivy jako je změna teploty nebo typu rozpouštědla (Niessen 2006).

Spektrofotometrický detektor

Je to nejčastěji používaný detektor při HPLC analýze léčiv. Proměřuje absorpenci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci se využívá především UV oblast spektra. V praxi se tedy využívají především UV detektory s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv). Tento typ se vyznačuje citlivostí $10^{-9} - 10^{-10} \text{ g.ml}^{-1}$ a lze jej použít i při gradientové eluci.

Fluorimetrický detektor

S výhodou se využívá, když analyzovaná látka (rozkladný produkt nebo metabolit) vykazuje fluorescenci. Látky, které tuto vlastnost nemají, lze vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Detektor je tedy méně univerzální, ale citlivější ($10^{-9} - 10^{-12} \text{ g.ml}^{-1}$).

Refraktometrický detektor

Je prakticky univerzální, vyhodnotí jakoukoliv látku. Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Nevýhodou je nízká citlivost ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$), nutnost termostátování (odezva detektoru je závislá na teplotě) a nelze jej použít při gradientové eluci.

Elektrochemické detektory

Tento typ detektoru nachází uplatnění při hodnocení léčiv u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda – eluent. Elektrochemická veličina je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Dělí se na voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Jsou značně citlivé, ale nelze je použít při gradientové eluci (Klimeš a kol. 2008).

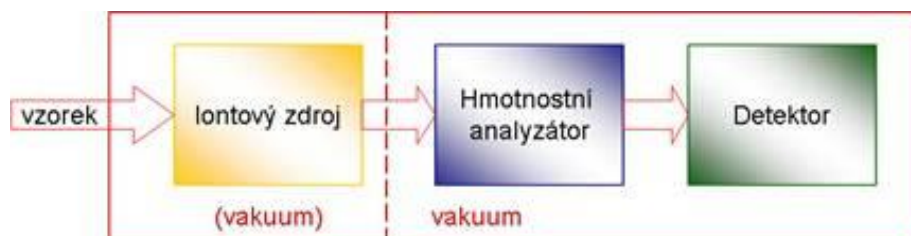
Hmotnostní spektrometr

V poslední době je velmi často využíván jako detektor hmotnostní spektrometr (MS). Více o tomto detektoru v kapitole hmotnostní spektrometrie (2.7)

2.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty a jejich rozlišení dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů (hmotnostní spektrum) (Niessen 2006).

MS se skládá ze tří základních částí a to z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Minimálně poslední dvě jmenované části jsou umístěny ve vysokém vakuu, které zajišťuje vysokou přesnost měření. Mezi další součásti patří vakuový systém, sonda pro zavádění vzorků, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat a porovnání spekter (Holčapek 2012a).



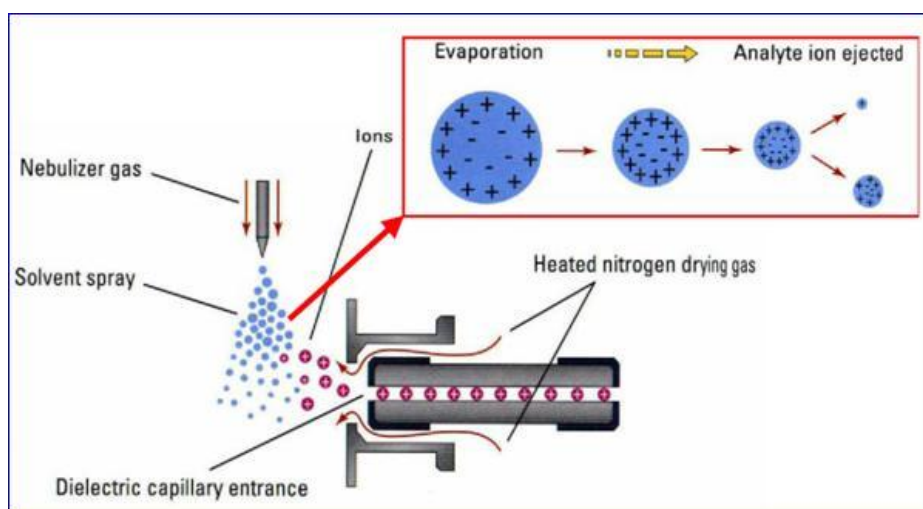
Obr. 7. Schéma hmotnostního spektrometru (Holčapek 2012a)

Následuje podrobnější popis základních částí MS, který jsem používal při svých pokusech.

2.7.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabité částice. Existují následující ionizační techniky: chemická ionizace (CI), ionizace polem (FI), elektronová ionizace (EI), ionizace urychlenými atomy (FAB), ionizace termosprejem (TSI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace elektrosprejem (ESI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace za účasti matrice (MALDI).

Hmotnostní spektrometr, na kterém jsem pracoval, využíval ionizaci elektrosprejem. Jedná se o šetrnou ionizační techniku. ESI probíhá za atmosférického tlaku. Je vhodná k analýze biomakromolekul i malých molekul. Průběh ionizace je naznačen na obrázku 8. Analyt, který je rozpuštěn ve vhodném eluentu, se přivede kovovou kapilárou do iontového zdroje. Vznikající kapičky po rozprášení za pomoci zmlžujícího plynu (N_2) nesou na výstupu z kapiláry na povrchu velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění protonované či deprotonované molekuly z jejího povrchu. ESI je nejčastěji užívaná pro spojení HPLC-MS (Holčapek 2012b).



Obr. 8. Schéma ionizace elektrosprejem (Holčapek 2012b)

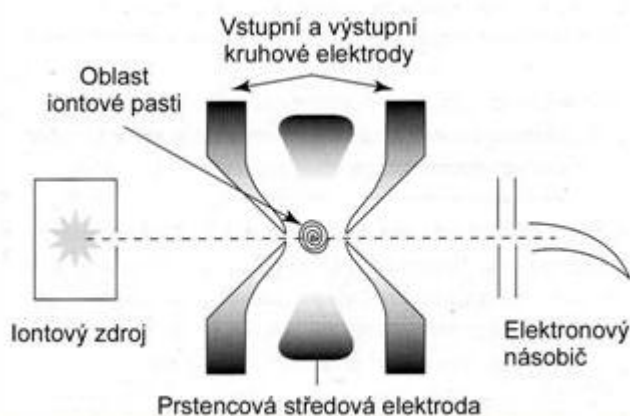
2.7.2 Hmotnostní analyzátor

Funkcí hmotnostního analyzátoru je rozdělení iontů podle jejich m/z . Umístěný je za iontovým zdrojem. Molekuly jsou již převedeny na ionty. Rozlišujeme tyto druhy:

magnetické analyzátory, kvadrupóly, iontové pasti, analyzátory doby letu a iontovou cyklotronovou rezonanci.

Iontová past (IT) se skládá ze dvou koncových a jedné kruhové elektrody. Ionty jsou pulzně přiváděny do pasti a vhodnými poměry střídavého a stejnosměrného napětí vloženými na elektrody jsou v pasti zadrženy. Postupná změna těchto napětí je poté podle jejich m/z vypudí výstupním otvorem na detektor. Při využití IT jsou do analyzátoru dodávány dva plyny. Dusík jako nosný plyn se zavádí do zdroje. Helium jako tlumící plyn se zavádí přímo do pasti, kde stabilizuje trajektorii iontů. Schéma IT je zobrazeno na obrázku 9 (Holčapek 2012c, Niessen 2006).

Velkou výhodou je možnost tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n). Vybraný iont je zadržen v pasti a všechny ostatní jsou odstraněny. Poté dojde ke kolizní aktivaci s atomy helia přítomnými v pasti a tím i fragmentaci iontu (MS^2). Fragmenty jsou následně zaznamenány. Stejným způsobem můžeme dále pokračovat na MS^3 . Citlivost detekce a životnost iontů nás omezuje na analýzu MS^5 , což pro strukturní analýzu plně postačuje. Proces je automatizován (Holčapek 2012c).



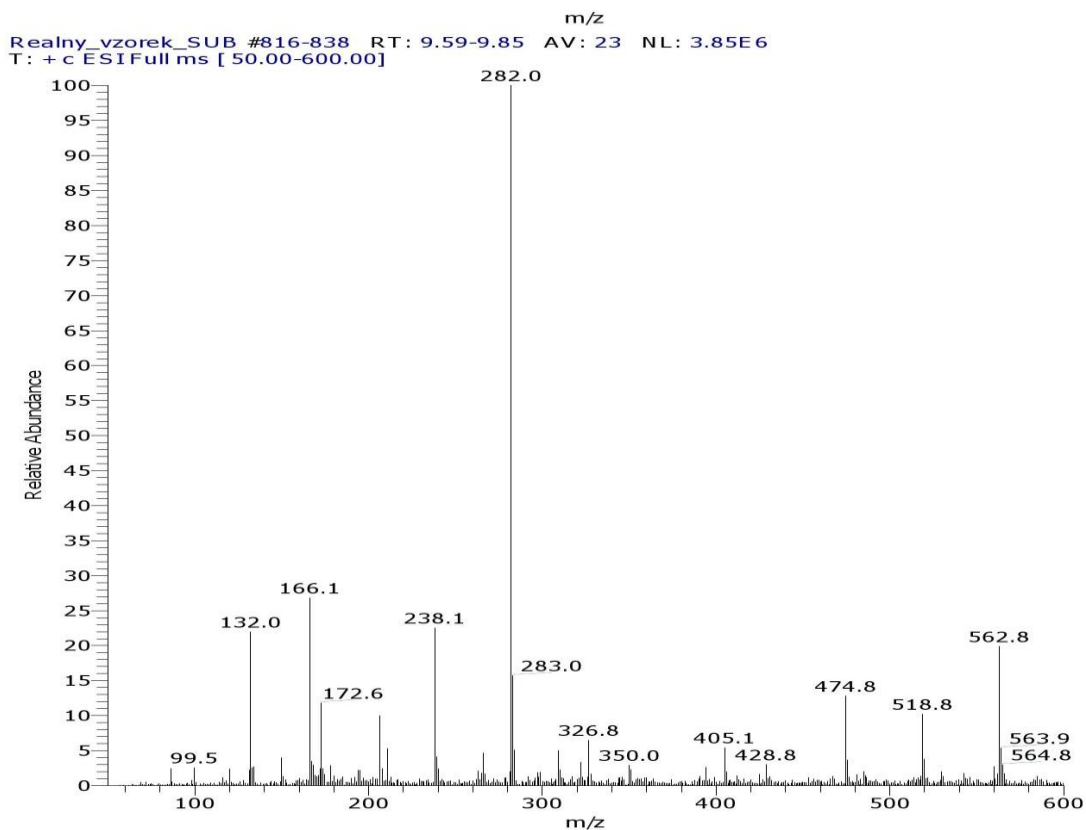
Obr. 9. Schéma iontové pasti (Holčapek 2012c)

2.7.3 Detektor

Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Nejpoužívanějšími jsou Faradayova klec, elektronový násobič a fotonásobič.

Pro zpracování dat byly vyvinuty speciální softwary pro identifikaci metabolitů. Analýzy by měly být provedeny v pozitivním i negativním módu pro zjištění detekce kyselých a bazických metabolitů. Hmotnostní spektra jsou uváděna v normalizovaném stavu, tzn. nejintenzivnější pík spektra má relativní intenzitu 100% a intenzity ostatních

se dopočítají. Příklad spektra je uveden na obrázku 10. Osa y značí relativní intenzitu v %, osa x pak poměr hmotnosti a náboje (Holčapek kol. 2008).



Obr. 10. Hmotnostní spektrum v retenčním čase 9,59-9,85. Dominantní ion o m/z 282 patří ABZ.SO. Na ose x poměr hmotnosti a náboje, na ose y relativní intenzita.

2.8 Spojení LC/MS

Předpokladem pro úspěšné spojení kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru je odstranění mobilní fáze. Zpočátku se izolovaly jednotlivé frakce z HPLC kolony, následovalo odstranění MF a poté se analyt přenesl do MS. Tento proces byl nahrazen přímým spojením, kdy se MF odstraní proudem sušícího plynu a vysokou teplotou kapiláry (Holčapek kol. 2008). LC/MS se stává rutinní analytickou metodou s obrovským polem působnosti (identifikace reakčních produktů a nečistot, strukturální analýza organických látek ve směsích atd.). Významná je také možnost s vysokou citlivostí a selektivitou stanovit obsah léčiva v biologickém materiálu. Rozpouštědla pro LC/MS musí být vždy v nejvyšší možné kvalitě. Nejpoužívanější bývají vodný methanol, acetonitril a ethanol. Jako aditiva mají přednost těkavá činidla v co nejnížší koncentraci jako je kyselina mravenčí, octová nebo amoniak (Niessen 2006).

Spektra není možné porovnávat s knihovnou, protože knihovny pro LC/MS spektra většinou neexistují. Výsledky se liší podle použité ionizační techniky, pracovních podmínek i typu přístroje. Spektra je tak nutné interpretovat manuálně (Holčapek 2008).



Obr. 11. Kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem

Foto: Mgr. Ivan Vokřál

2.8.1 LC/MS při studiu metabolismu léčiv

LC/MS je důležitým nástrojem v identifikaci metabolitů léčiv. Umožňuje nejprůkaznější potvrzení totožnosti na základě shody retenčních časů, molekulových hmotností, případně spekter MS^2 (Klimeš 2007). Metabolity cizorodých látek mají, až na výjimky, vyšší polaritu a proto se s výhodou při analýze léčiv jako chromatografický systém využívá reverzní fáze. K ionizaci se nejčastěji využívají šetrné ionizační techniky, například ESI nebo APCI (Niessen 2006). Pro tyto typy ionizace jsou v pozitivním módu charakteristická spektra iontů $[M+H]^+$ doprovázena méně častými adukty alkalických kovů $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$. Zatímco v negativním režimu detekujeme deprotonované molekuly iontů $[M-H]^-$ (Holčapek a kol. 2008).

V tabulce 1 a 2 jsou uvedeny příklady možných reakcí ve fázi I a II metabolismu cizorodých látek.

Tab. 1. Možné reakce I. fáze biotransformace

Reakce ve fázi I metabolismu xenobiotik		
Reakce	$\Delta(\text{Da}^*)$	Δ složení skupiny
Demethylace	-14	-CH ₂
Dehydrogenace (Alkohol > aldehyd/keton)	-2	-H ₂
Hydrogenace (Aldehyd/keton > alkohol)	+2	+H ₂
Oxidace (alkohol > karboxylová kyselina)	+14	+O-H ₂
Oxidace (aldehyd > karboxylová kyselina)	+16	+O

*Da – Dalton (atomová hmotnostní jednotka)

Tab. 2. Možné reakce II. fáze biotransformace

Reakce ve fázi II biotransformace xenobiotik		
Konjugační reakce	$\Delta(\text{Da})$	Δ složení skupiny
Methylace	+14	+CH ₂
Konjugace s glycinem	+57	+C ₂ H ₃ ON
Sulfatace	+80	+SO ₃
Konjugace s glutathionem	+309	+C ₁₀ H ₁₆ O ₆ N ₃ S

*Da – Dalton (atomová hmotnostní jednotka)

Identifikační přístupy jsou založeny na skutečnosti, že si metabolity zachovávají podstatnou část mateřské struktury. Jelikož strukturu podávaného léčiva zpravidla známe, můžeme tak některé metabolity očekávat.

3 CÍL PRÁCE

Tato práce je součástí grantového projektu „Vývoj lékové rezistence u helmintů – možné mechanismy a obrana“ (GAČR P502/10/0217). Cílem mé diplomové práce bylo identifikovat a kvantifikovat metabolity vybraných anthelmintik u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Hlavní cíle vystihují tyto body:

- Získání jedinců tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) z konečného hostitele potkana laboratorního (*Rattus norvegicus* var. Alba, kmen Wistar)
- Sledování metabolismu vybraných anthelmintik pomocí *in vitro* inkubace subcelulárních frakcí (mikrosomy, mitochondrie, cytosol) tasemnice krysí s anthelmintiky a vyhodnocení výsledků metodou HPLC a LC/MS
- Sledování metabolismu vybraných anthelmintik pomocí *ex vivo* kultivace jedinců *H. diminuta* v CO₂ inkubátoru v médiu s anthelmintiky a následné vyhodnocení metodou LC/MS
- Porovnání *in vitro* a *ex vivo* metabolismu anthelmintik u *H. diminuta*

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Acetonitril – Sigma-Aldrich (SA), for LC-MS CHROMASOLV[®]

Acetonitril – SA, CHROMASOLV[®] gradient grade, for HPLC, $\geq 99.9\%$

Albendazol – SA

Albendazolsulfoxid – Toronto Research Chemicals TRC

DMSO - Fluka

Flubendazol – Janssen Pharmaceutica (JP)

Mebendazol – JP

Medium RPMI-1640 – SA

Methanol – SA, for LC-MS

Methanol – SA, gradient grade, for HPLC, $\geq 99.9\%$

NADPH – Merck

NADH – Merck

Redukovaný a hydrolyzovaný flubendazol – JP

Redukovaný a hydrolyzovaný mebendazol – JP

Běžné chemikálie čistoty p.a. – Penta, Lachema

4.2 Přístroje

Analytické váhy Scaltec SBS 22

Centrifuga Heraeus Biofuge Stratos

Concentrator Eppendorf 5301

Čtečka Biorad, Microplate Reader, model 550

Digitální pH-metr Jenway LTD 3020

Laboratorní magnetická míchačka IKA Color Squid Hytrel HTR 8068

Thermoblok s nástavcem Thermomixer Eppendorf

Třepačka IKA MS2 Minishaker

Ultrazvuková lázeň Tesla UC OO5 AJ 1

Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus Bandelin HD 2070

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu 10 AVP

4.3 Biologický materiál

Životní cyklus tasemnice krysí je celkem složitý a obsahuje mezihostitele. Pro tento experiment byl použit potemník moučný (*Tenebrio molitor*). Brouci byli chováni ve skleněných nádobách s víkem s přístupem vzduchu. V nádobách, kde přežívaly i larvy brouka, byla jako krmivo použita hrubozrnná špaldová mouka a krmivo pro potkany. Do nádoby bylo broukům také přidáno několik větších kusů buničiny, které se jednou za dva až tři dny navlhčovaly. 24 hodin před infikací byli odebráni 4 brouci do baňky bez potravy a vody. Následující den byl k broukům přidán trus od infikovaného potkana. Nejvhodnější je trus čerstvý, aby nebyla vajíčka vyschlá. Z toho důvodu byl trus průběžně vlhčen. Po čtrnácti dnech, kdy byl předpoklad, že se vyvinulo dostatek cysticerkoidů, byla provedena na jednom broukovi pitva. Obsah pitvaného brouka se rozptýlil preparační jehlou v 5 mM roztoku glukózy. Jelikož infekce proběhla přirozeně, byly pod stereolupou pozorovány desítky cysticerkoidů.

Byla vyzkoušena i jiná cesta infekce než trusem nakažených potkanů. Nakažení bylo provedeno malými kousky článků z konce těla tasemnice, která byla získána z tenkého střeva potkana. Kousky byly přidány do baňky ke čtyřem broukům, kteří byli předtím ponecháni den bez potravy a vody. Pitva po čtrnácti dnech jednoho brouka prokázala úspěšnou infekci. Pod stereolupou bylo objeveno několik desítek cysticerkoidů. Obě metody infekce jsou tedy prakticky rovnocenné.

Získanými cysticerkoidy byli infikováni dva potkani (*Rattus norvegicus*, var. Alba, kmen Wistar). Oba potkani byli samci a vážili kolem 110 g. Nejprve byli uspáni v exsikátoru nasyceném éterem a poté nakaženi pomocí žaludeční sondy, která obsahovala 8 cysticerkoidů v 1 ml glukózového roztoku. Po aplikaci je potřeba se přesvědčit, zda-li některý z cysticerkoidů neulpěl na stěně sondy. Po třech týdnech se vyšetřil trus obou potkanů. V troše vody byl trus rozptýlen a pozorován pod stereolupou. V obou vzorcích byla pozorována vajíčka tasemnice. Vyšetření proběhlo ještě před pitvou pro potvrzení přítomnosti tasemnic.

Před pitvou byli potkani necháni 24 hodin bez potravy. Potkani byli nejprve uspáni v exsikátoru nasyceném éterem. Usmrcení bylo provedeno dekapitací nůžkami. Byla vypreparována tenká střeva a propláchnuta pomocí pipety fosfátovým roztokem až do úplného vyprázdnění. Tasemnice byly třikrát opláchnuty fosfátovým pufrem s fyziologickým roztokem (Phosphate Buffered Saline, PBS) s antibiotiky a v laminárním boxu přendány do kádinky s RPMI. Potom byly tasemnice jednotlivě

umístěny do lahvíček s 5 ml média. Celkem bylo získáno 10 tasemnic. Některé byly použity okamžitě k *ex vivo* pokusu. Zbylé byly zmraženy v mrazáku (-80°C) a poté použity pro získání subcelulárních frakcí.

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Příprava pufrů, médií a roztoků

Draselnofosfátový pufr

Bylo připraveno 500 ml 0,025 M roztoku hydrogenfosforečnanu draselného (navážka 1,7 g byla rozpuštěna v redestilované vodě). Za stálého míchání a kontroly pH byla přidána koncentrovaná kyselina mravenčí a pH upraveno na hodnotu 3. Poté byl roztok přefiltrován.

Sodnofosfátový pufr

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

Živné médium

K médiu RPMI 1640 (Sigma, R 7388) o objemu 500 ml byl v laminárním boxu sterilně přidán 1 g hydrogenuhlčitanu sodného a 5 ml roztoku antibiotik. Médium bylo 7 minut sterilně probubláváno pneumoxidem (směs 95% O_2 a 5% CO_2), aby bylo dosaženo pH 7,4.

Fosfátový pufr s fyziologickým roztokem (PBS)

Rozpuštěním jedné tablety Phosphate Buffered Saline ve 200 ml redestilované vody vznikne roztok o koncentraci PBS 0,01 mol/l. Bylo připraveno 800 ml PBS.

Roztok antibiotik

Do sterilní kádinky bylo naváženo 120 mg penicilinu a 200 mg streptomycinu. V laminárním boxu byla antibiotika rozpuštěna ve 20 ml sterilní redestilované vody. Roztok byl přefiltrován přes bakteriální filtr.

PBS s antibiotiky

K 200 ml PBS byly přidány 4 ml roztoku antibiotik.

Médium s léčivem

K získání koncentrace 10 μ M FLU a MBZ bylo v plastové zkumavce k 15 μ l zásobního roztoku přidáno 15 ml média RPMI. Slepý biologický vzorek byl připraven smícháním 15 μ l DMSO a 15 ml média RPMI.

Roztoky pro *ex vivo* inkubaci

10 mM FLU – Bylo připraveno 500 μ l roztoku rozpuštěním 0,00157 g FLU v 500 μ l DMSO

10 mM MBZ – Bylo připraveno 500 μ l roztoku rozpuštěním 0,00147 g MBZ v 500 μ l DMSO

Roztoky pro *in vitro* inkubaci

1 mM ABZ.SO - K 1,4067 mg ABZ bylo přidáno 5ml methanolu a pomocí ultrazvuku rozpuštěno

1 mM FLU - K 1,5664 mg FLU bylo přidáno 5 ml DMSO a pomocí ultrazvuku rozpuštěno

0,7 mM FLU - K 1,0965 mg FLU bylo přidáno 5 ml DMSO a pomocí ultrazvuku rozpuštěno

0,5 mM FLU - 500 μ l 1 mM FLU bylo smícháno s 500 μ l DMSO

0,3 mM FLU - 99 μ l 0,5 mM FLU bylo smícháno s 66 μ l DMSO

0,2 mM FLU - 66 μ l 0,5 mM FLU bylo smícháno s 99 μ l DMSO

0,1 mM FLU - 50 μ l 0,2 mM FLU bylo smícháno s 50 μ l DMSO

1 mM MEB - K 1,4764 mg MBZ bylo přidáno 5 ml DMSO a pomocí ultrazvuku rozpuštěno

0,7 mM MBZ - K 1,0335 mg MBZ bylo přidáno 5 ml DMSO a pomocí ultrazvuku rozpuštěno

0,5 mM MBZ - 500 μ l 1 mM MBZ bylo smícháno s 500 μ l DMSO

0,3 mM MBZ - 99 μ l 0,5 mM MBZ bylo smícháno s 66 μ l DMSO

0,2 mM MBZ - 66 μ l 0,5 mM MBZ bylo smícháno s 99 μ l DMSO

0,1 mM MBZ - 50 μ l 0,2 mM MBZ bylo smícháno s 50 μ l DMSO

3 mM NADPH – 3,75 mg bylo rozpuštěno v 1,5 ml redestilované vody. $M_r=833,35$ g.mol⁻¹

3 mM NADH – 3,19 mg bylo rozpuštěno v 1,5 ml redestilované vody. $M_r=709,43$ g.mol⁻¹

4.4.2 Stanovení koncentrace bílkovin s využitím BCA

Princip metody stanovení koncentrace bílkovin v cytosolu je založen na reakci proteinů s měďnatými ionty (Cu^{2+}) v alkalickém prostředí. V tomto prostředí přechází měď na Cu^+ ionty, které tvoří s kyselinou bicinchoninovou (BCA) modrofialový komplex. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny. Absorbance komplexu byla proměřována na čtečce při vlnové délce 562 nm. Koncentrace bílkovin ve vzorku byla získána z kalibrační přímky. Před stanovením byl připraven pracovní roztok C, který byl smíchán z roztoků A a B v poměru 50:1. Roztok A obsahoval NaHCO_3 , Na_2CO_3 a BCA v 0,1 M NaOH. Roztok B obsahoval 4% roztok $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Ke stanovení kalibrační křivky byl použit hovězí sérový albumin (BSA) v 1% koncentraci. Z tohoto základního roztoku a redestilované vody se udělalo šest roztoků o známé koncentraci (viz. tabulka 3). Roztoky byly připraveny ve dvou ředěních. Z každého ředění byly připraveny čtyři paralelní vzorky, tzn. osm paralelních vzorků pro každou koncentraci bílkovin. Pro stanovení koncentrace bílkovin v CYT byly frakce naředěny destilovanou vodou. Celkově se připravilo 500 μl obsahující 50 μl CYT a 450 μl redestilované vody. Opět byla připravena dvě ředění, ze kterých byly připraveny čtyři paralelní vzorky.

Stanovení proběhlo v mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo nanášeno 10 μl vzorku bílkovin (roztoky BSA nebo cytosolová frakce) a 200 μl roztoku C. Do slepých vzorků bylo místo bílkovin napipetováno 10 μl redestilované vody. Roztok C byl nanášen multikanálovou pipetou. Inkubační směs byla promíchána a inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Hodnoty absorbance byly změřeny při 562 nm na čtečce Biorad. Výsledná hodnota absorbance jednotlivých koncentrací a vzorku byla průměrem z 8 naměřených hodnot, od nichž se odečetl průměr absorbance slepých vzorků. Z kalibrační přímky byla odečtena koncentrace bílkovin v cytosolu.

Tab. 3. Složení roztoků pro kalibrační přímku

	Koncentrace BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Roztok 1% BSA [μl]	Destilovaná voda [μl]
1	0	0	500
2	200	10	490
3	400	20	480
4	600	30	470
5	800	40	460
6	1000	50	450

4.4.3 *In vitro* biotransformace anthelmintik u *H.diminuta*

4.4.3.1 Inkubace subcelulárních frakcí s ABZ.SO

Subcelulární frakce byly inkubovány s ABZ.SO. Jako koenzym byl použit NADPH. Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala 3 μl zásobního roztoku 1 mM ABZ v methanolu, 100 μl subcelulárních frakcí (CYT, MIT, MIK), 100 μl koenzymu NADPH a 97 μl 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4. Slepé biologické vzorky obsahovaly místo anthelmintika 3 μl čistého rozpouštědla a slepé chemické vzorky obsahovaly místo biologických frakcí 100 μl sodnofosfátového pufru. Všechny vzorky byly připraveny ve třech paralelních směsích. Vzorky byly před přidáním biologických vzorků umístěny do ledu. Poté byly protřepány a inkubovány 30 minut při teplotě 37°C. Ukončení inkubace bylo provedeno ochlazením reakční směsi v ledu na 0°C a přidáním 30 μl koncentrovaného amoniaku.

Ke vzorkům bylo přidáno 0,7 ml octanu ethylnatého a byla provedena extrakce kapalina-kapalina (L/L) do organického rozpouštědla třepáním na třepačce po 2 minuty. Vzorky byly přesunuty do centrifugy a při rychlosti 5000 otáček za minutu se po třech minutách oddělila organická vrstva. Pomocí pipety byla odebrána horní vrstva a přenesena do čisté mikroskopické kumavky. Octan ethylnatý byl odpařen v koncentrátoru (45°C). Suché vzorky byly uchovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí HPLC.

Pokus byl proveden i s extrakcí na pevné fázi (solid phase extraction, SPE). Extrakce byla provedena dvěma metodami. Metoda A pro extrakci možných kationtů, metoda B pro případné metabolity ve formě aniontů. V metodě A byl nejprve vzorek okyselen. Na 1 ml vzorku bylo přidáno 1 μl 98% kyseliny mravenčí. Poté byl vzorek odstředěn při 3000 otáčkách za minutu po 3 minuty. Extrakční SPE-kolona (Oasis MCX

Extraction Cartridges 1cc/30 mg) byla aktivována promytím 1 ml ACN a 1 ml vody. Poté byl na kolonu nanesen vzorek a byla promyta 1 ml 2% kyseliny mravenčí. Nakonec byla kolona vymyta 1ml 4% vodného amoniaku v 80% ACN (v/v). U metody B byla u vzorku zvýšena bazicita. Na 1 ml vzorku bylo přidáno 4 μ l 25% amoniaku. SPE-kolony (Oasis MAX Extraction Cartridges 1cc/30mg) byly aktivovány stejným způsobem jako v metodě B a poté byl nanesen vzorek. Kolona byla promyta 1 ml 2% vodným roztokem amoniaku a na konec byla vymyta 1 ml 2% kyseliny mravenčí v 80% ACN (v/v). Všechny vzorky byly při 45°C odpařeny, uchovány v chladu a temnu a poté vyhodnoceny pomocí metody LC/MS.

4.4.3.2 Inkubace FLU v cytosolu s různými koenzymy

Abychom získali co největší množství metabolitů, byl pro kinetickou studii FLU a MBZ nejprve určen vhodnější koenzym. Pro porovnání byl použit koenzym NADH a NADPH. Jako anthelmintikum byl použit FLU v koncentraci 10 μ M. Vzorky byly provedeny ve čtyřech paralelách. Slepé vzorky chemické i biologické byly provedeny ve třech paralelách. Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala 3 μ l zásobního roztoku 1 mM FLU v DMSO, 100 μ l CYT, 100 μ l koenzymu NADPH nebo NADH a 97 μ l 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4. Slepé biologické vzorky obsahovaly místo anthelmintika 3 μ l čistého rozpouštědla a slepé chemické vzorky obsahovaly místo CYT 100 μ l sodnofosfátového pufru pH 7,4. Vzorky byly před přidáním biologických frakcí umístěny do ledu. Poté byly protřepány a inkubovány 30 minut při teplotě 37°C. Ukončení inkubace bylo provedeno ochlazením reakční směsi v ledu na 0°C a přidáním 30 μ l koncentrovaného amoniaku.

Extrakční metodou byla extrakce L/L do organického rozpouštědla (kapitola 4.4.3.1). Vzorky byly odpařeny při 45°C. Suché odparky byly poté uchovány v chladu a změřeny na HPLC.

4.4.3.3 Inkubace cytosolu s FLU a MBZ

Cytosolová frakce byla inkubována s FLU a MBZ v různých koncentracích (1, 2, 3, 5, 7, 10 μ M). Jako koenzym byl použit NADPH. Inkubační směs o celkovém objemu 0,3 ml obsahovala 100 μ l cytosolu, 100 μ l koenzymu NADPH, 97 μ l 0,1 M sodnofosfátového pufru pH 7,4 a 3 μ l různých koncentrací FLU a MBZ. Slepé biologické vzorky obsahovaly místo anthelmintika 3 μ l rozpouštědla DMSO a slepé chemické vzorky obsahovaly místo biologických frakcí 100 μ l sodnofosfátového pufru

pH 7,4. Slepé chemické vzorky byly provedeny ve dvou paralelních směsích, ostatní vzorky byly provedeny ve čtyřech paralelách. Vzorky byly před přidáním frakcí umístěny do ledu. Poté byly protřepány a inkubovány 30 minut při teplotě 37°C. Ukončení inkubace se provedlo ochlazením reakční směsi v ledu na 0°C a přidáním 30 µl koncentrovaného amoniaku.

Ke vzorkům bylo přidáno 0,7 ml octanu ethylnatého a byla provedena extrakce L/L do organického rozpouštědla, třepáním na třepáče po 2 minuty. Vzorky byly přesunuty do centrifugy při rychlosti 5000 otáček za minutu po 3 minuty, aby se oddělila organická složka. Pomocí pipety byla horní vrstva odebrána a přenesena do čisté mikrozkušavky. Octan ethylnatý byl odpařen v koncentrátoru (45°C). Suché vzorky byly uchovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí HPLC.

4.4.4 *Ex vivo* biotransformace anthelmintik u *H. diminuta*

4.4.4.1 Inkubace živých tasemnic s MBZ a FLU

Pro inkubaci byla připravena média RPMI s léčivou 10 µM FLU, 10 µM MBZ a médium pro slepý biologický vzorek.

Po očištění (kapitola 4.3.) a hodinové inkubaci *H. diminuta* v prostředí CO₂ v médiu při 37°C bylo v laminárním boxu odstraněno médium. Ke dvěma tasemnicím bylo přidáno 10 ml roztoku s léčivou, k dvěma byl přidán jen roztok média a DMSO pro slepý biologický vzorek. Každý z biologických vzorků byl přiřazen k jednomu léčivu. Lahvičky s tasemnicemi byly umístěny do CO₂ inkubátoru, kde byly v prostředí 5 % CO₂ při 37°C inkubovány. Jako chemické vzorky byly za stejných podmínek inkubovány zkumavky se zbylými médii. Inkubace trvala 24 hodin. Po 24 hodinách byly odebrány z každé zkumavky a lahvičky tři vzorky po 1 ml. Vzorky byly zmrazeny v mrazáku při -24°C. Tasemnice byly třikrát opláchnuty v PBS, zváženy, umístěny do zkumavek a zmrazeny.

Extrakce vzniklých metabolitů byla provedena z vodné fáze do organického rozpouštědla. Vzorky i tasemnice byly rozmrazeny. K tasemnicím byla přidána voda odpovídající trojnásobku jejich váhy a byly zhomogenizovány ultrazvukovým homogenizátorem. Od každého vzorku a homogenátu byly odebrány tři paralelní vzorky po 300 µl. Ke vzorkům bylo postupně přidáno 30 µl koncentrovaného amoniaku a 700 µl octanu ethylnatého. Následně byly intenzivně třepány na třepáče 10 minut. Poté byly vzorky přendány do centrifugy a odstředěny při rychlosti 5000 otáček za

minutu 3 minuty. U homogenátu byly vzorky v centrifuze ještě dalších 5 minut o rychlosti 10 000 otáček za minutu. Horní vrstva byla přenesena do čisté mikrozkušavky a obsah byl odpařen v koncentrátoru při 45°C. Kromě homogenátů z tasemnic byly vzorky zakoncentrovány. To znamená, že horní vrstvy ze tří paralel byly odebrány do jedné mikrozkušavky, ve které byly postupně odpařeny. Vzorky byly uschovány v chladu a temnu a později vyhodnoceny pomocí LC/MS.

4.4.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

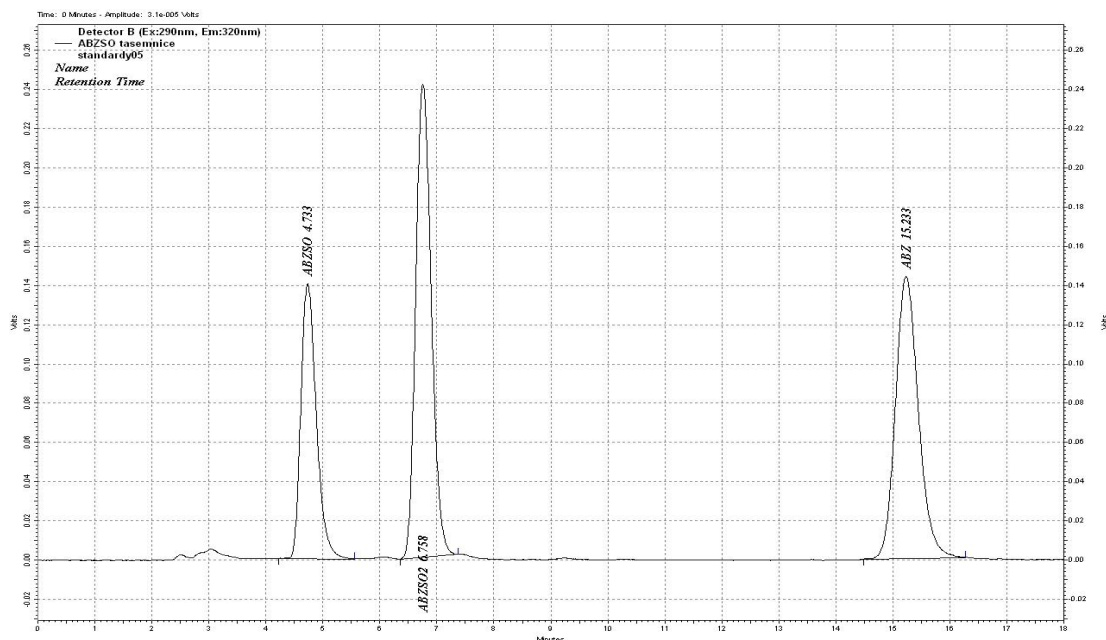
4.4.5.1 Podmínky HPLC pro stanovení metabolitů ABZ.SO

Ke stanovení byl použit chromatograf Shimadzu 10 AVP, který se skládá z vysokoúčinného čerpadla LC-10ADvp, autosampleru SIL-10ADvp, degaséru GT-154, kolonového termostatu CTO-10Avp, spektrofluorimetrického detektoru RF-10AXL ($\lambda_{EX}=286$ nm, $\lambda_{EM}=306$ nm), diode array detektoru SPD-M10Avp, řídicí jednotky SCL-10Avp.

Vzorky byly pro stanovení rozpuštěny v mobilní fázi o složení ACN : 0,025M draselnofosfátový pufr (pH=3) v poměru 35:65 (v/v). Pro stanovení byla použita kolona LiChroCART 250x3 mm s náplní LiChrospher 60 RP-select B (5 μ m). Teplota při měření byla 25°C, tlak byl 14,4 MPa. Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. Standardy ABZ, ABZ.SO a ABZ.SOO byly zakoupeny u firem Janssen a Toronto Research Chemicals. Nástřik na kolonu byl 20 μ l. Pro ověření totožnosti je důležitá shoda retenčních časů a spekter standardu a zkoušeného léčiva. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru. Retenční časy, limity detekce a limity kvantifikace jsou uvedeny v tabulce 4. Dělení jednotlivých léčiv je vidět na obrázku 10.

Tab. 4. Retenční časy (R_t), limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) albendazolu a jeho metabolitů

Léčivo	R_t	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
ABZ	15,2	35,9	108,9
ABZ.SO	4,7	6,3	19,2
ABZ.SOO	6,7	0,1	0,5



Obr. 12. Chromatografický záznam dělení ABZ, ABZ.SO a ABZ.SOO.

4.4.5.2 Podmínky HPLC pro kinetickou studii

Ke stanovení koncentrace redukováného FLU (FLU-R) a redukováného MBZ (MBZ-R) byl také použit chromatograf Shimadzu. Vzorky byly rozpuštěny v MF o složení ACN : 0,025M draselnofosfátový pufr (pH=3) v poměru 3:7 (v/v). Využita byla kolona LiChroCART 250x3 mm s náplní LiChrospher 60 RP-select B (5 μ m). Rychlost průtoku MF byla 0,7 ml/min. Měření probíhalo při 25°C a tlaku 18,1 MPa. Nástřik na kolonu byl 50 μ l. Parentní látky byly detekovány UV detektorem, redukové metabolity fluorescenčním detektorem.

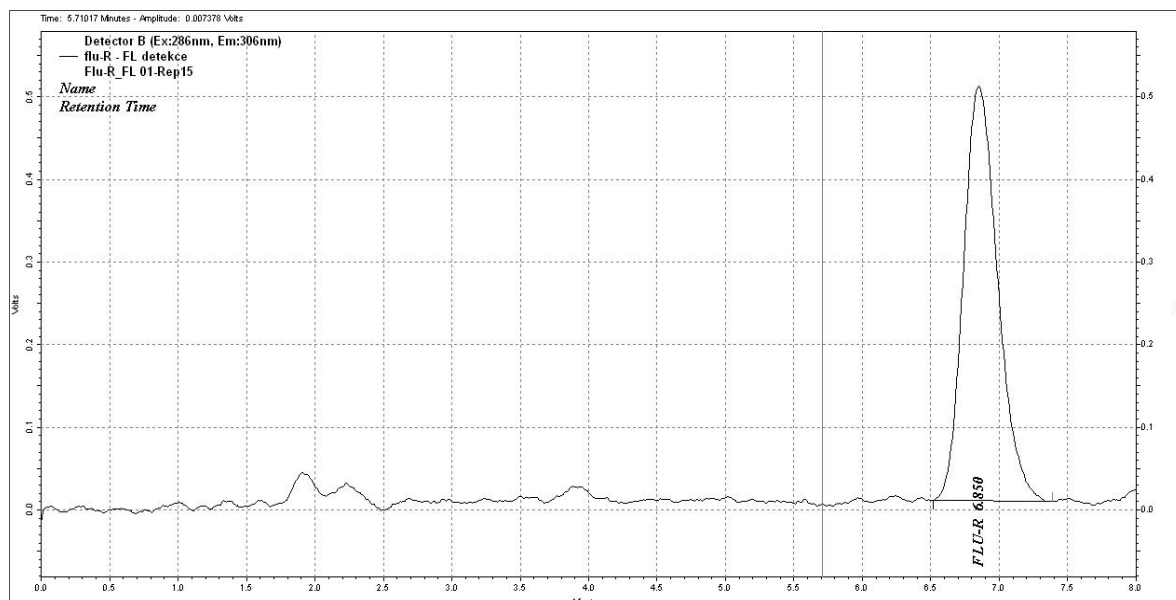
Pomocí standardů o známé koncentraci byla sestrojena pětibodová kalibrace. FLU, MBZ, FLU-R, MBZ-R a hydrolyzované deriváty obou léčiv (MBZ-H a FLU-H) byly kalibrovány na UV detektoru. Kvůli nižším koncentracím byl FLU-R a MBZ-R kalibrován i na fluorescenčním detektoru. Počáteční koncentrace standardů měřených na UV detektoru byla 3 μ g/ml, na fluorescenčním 50 ng/ml. Různými nástřiky (50, 25, 20, 10, 5 μ l) bylo docíleno různých koncentrací. Odezva byla u obou detektorů lineární. Retenční časy, LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Tab. 5. Retenční časy, limity detekce a kvantifikace redukováných metabolitů FLU a MBZ na fluorescenčním detektoru

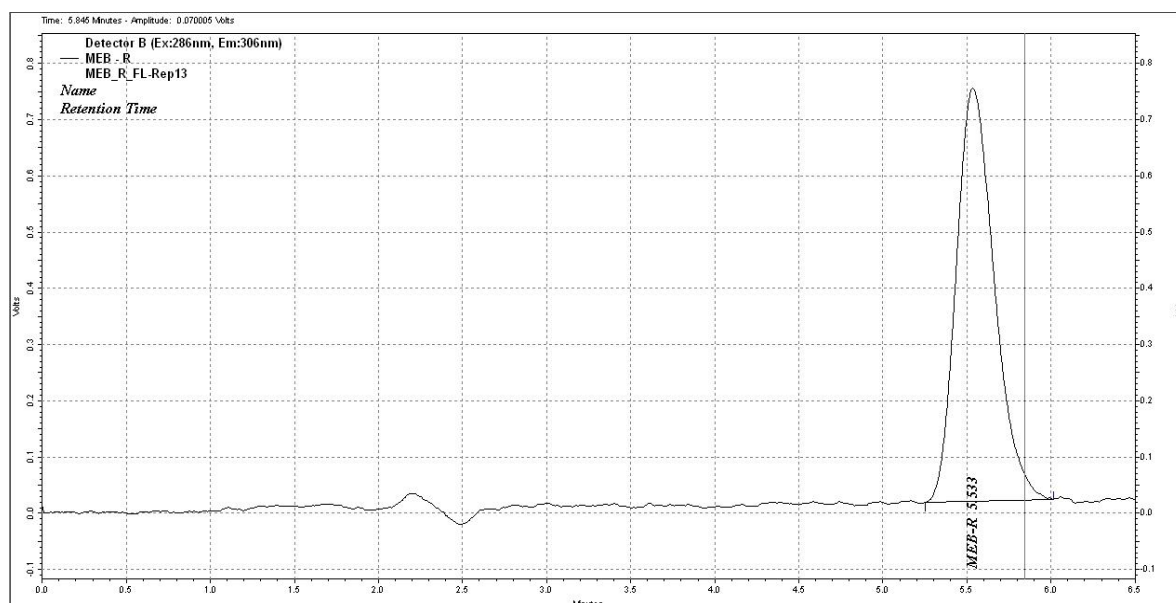
Léčivo	R _t (min)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
FLU-R	6,8	51,95	157,44
MBZ-R	5,5	53,93	163,43

Tab. 6. Retenční časy, limity detekce a kvantifikace FLU a MBZ a jejich metabolitů na UV detektoru

Léčivo	R _t (min)	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
FLU	20,6	51,95	157,44
FLU-R	6,1	53,93	163,43
FLU-H	5,1	16,38	49,50
MBZ	17,7	30,87	93,56
MBZ-R	5,4	11,71	35,48
MBZ-H	4,3	11,59	35,12



Obr. 13. Chromatograf - dělení redukovaného FLU na fluorescenčním detektoru



Obr. 14. Chromatograf - dělení redukovaného MBZ na fluorescenčním detektoru

4.4.6 LC/MS

4.4.6.1 Podmínky LC/MS pro stanovení metabolitů FLU, MBZ a ABZ.SO

LC systém se skládal z pumpy Surveyor MS, autosampleru Surveyor, kolony SymmetryShield RP 18 (2,1·100 mm, 3,5 µm). Složení mobilní fáze se v pozitivním módu skládalo z 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí (v/v) a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu (v/v) v poměru 9:1. Pro analýzu v negativním módu se MF skládala z 0,1% vodného roztoku amoniaku (v/v) a 0,1% roztoku amoniaku v acetonitrilu (v/v) v poměru 9:1. Toková rychlost MF byla 120 µl·min⁻¹, měření trvalo 25 minut, teplota kolony byla nastavena na 40°C.

Připojený hmotnostní spektrometr využíval k ionizaci metodu elektrospreje, jako analyzátor obsahoval iontovou past. Ochranným a pomocným plynem byl dusík, tlumícím plynem bylo helium. V tabulkách 7 a 8 jsou uvedeny optimalizované parametry iontového zdroje a iontové optiky pro analýzu studovaných BZD. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v pozitivním i negativním módu. Zpracování získaných dat bylo provedeno pomocí softwaru Xcalibur (verze 1.2).

Tab. 7. Nastavení parametrů iontového zdroje

	Pozitivní mód	Negativní mód
Spray voltage	5,3 kV	-3,6 kV
Capillary voltage	3,0 kV	-7,0 kV
Heated capillary temperature	200°C	200°C
Tube lens offset voltage	40 V	-15 V
Sheath gas flow rate	20 arbitrary units	20 arbitrary units
Auxiliary gas flow rate	10 arbitrary units	10 arbitrary units

Tab. 8. Nastavení parametrů iontové optiky

	Pozitivní mód	Negativní mód
Multipole 1 offset voltage	-2,0 V	0,5 V
Lens voltage	-16,0 V	18,0 V
Multipole 2 offset voltage	-6,5 V	10,0 V
Multipole RF amplitude	550 V	400 V

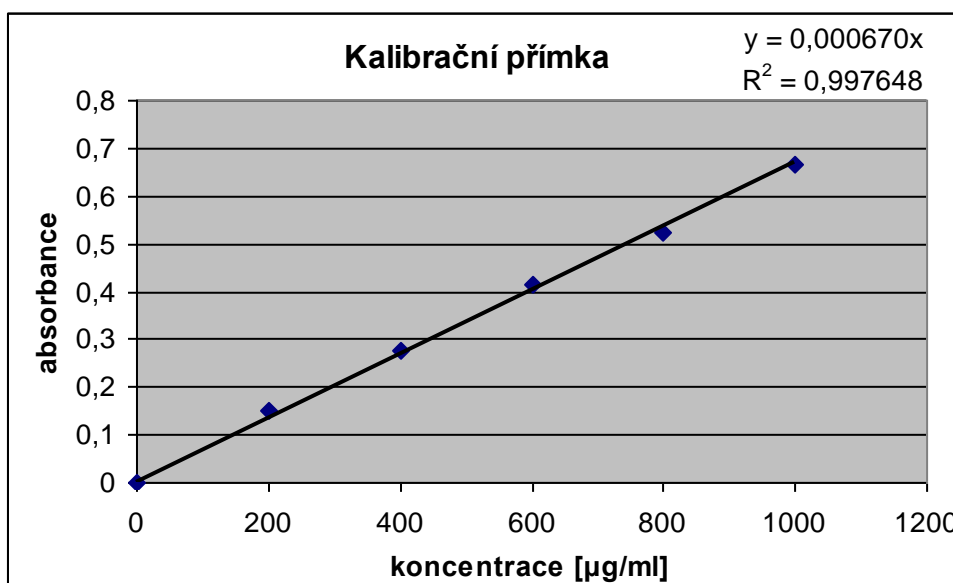
Standardy parentních látek byly rozpuštěny a vpraveny do hmotnostního spektrometru průtokovou rychlostí $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Koncentrace standardního roztoku byla $1 \mu\text{g}$ anthelmintika na 1 ml . Studované vzorky byly připraveny zředěním $100 \mu\text{l}$ MF. Spektra byla při MS analýze zaznamenána v rozmezí m/z 50-600, u MS^n pokusů byla rozmezí různá. MS^n spektra byla měřena, abychom získali fragmentační vlastnosti parentních látek a tím si usnadnili interpretaci nových metabolitů. Nástřik na kolonu byl $20 \mu\text{l}$ u všech prováděných analýz.

Data byla zpracována pomocí programu Metabolite I.D. software. Metabolity byly hledány porovnáním analyzovaných vzorků s jejich chemickými a biologickými vzorky. Píky, které byly přítomné v analytech, ale chyběly ve slepých vzorcích, byly podrobeny MS^n analýze. Tato získaná spektra byla porovnána z dostupnými standardy nebo s fragmentačními spektry z výsledků jiných publikací.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení bílkovin

Koncentrace bílkoviny v CYT byla stanovena pomocí metody BCA. Od absorbancí naměřených u standardů se odečetla průměrná absorbance slepého vzorku. Z průměrných hodnot byla sestrojena kalibrační přímka (viz. obrázek 15) vyjadřující závislost absorbance na koncentraci bílkoviny. Od absorbancí vzorků byla odečtena průměrná absorbance slepého vzorku a pomocí kalibrační přímky byla vypočítána koncentrace proteinu. Výsledná koncentrace bílkoviny v cytosolu *H. diminuta* byla stanovena na 3,13 mg/ml.



Obr. 15. Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkovin v cytosolu

5.2 *In vitro* biotransformace anthelmintik u *H. diminuta*

5.2.1 Inkubace subcelulárních frakcí s ABZ.SO

Inkubovány byly subcelulární frakce (CYT, MIT, MIK) s ABZ.SO o koncentraci 10 μM . Po skončení inkubace a L/L extrakci do organického rozpouštědla byly vzorky analyzovány na HPLC. Po odečtení slepých vzorků nebyly nalezeny žádné metabolity ABZ.SO.

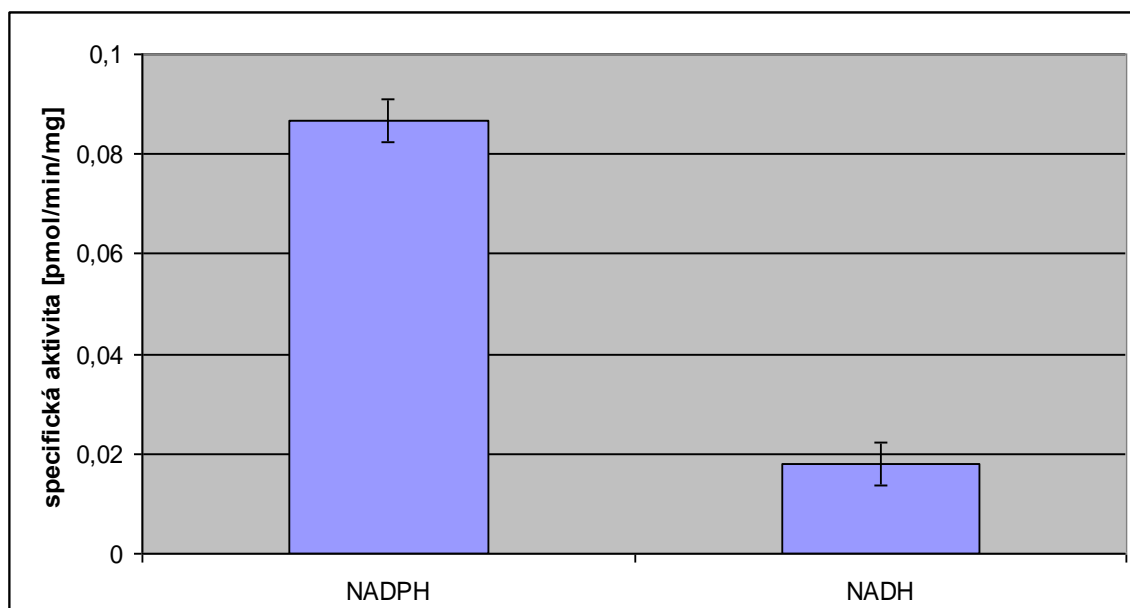
Inkubace byla opakována s extrakcí SPE a vzorky byly analyzovány na LC/MS. ABZ.SO byl pozorován při m/z 282 a retenčním čase 9,6 min. Po vyhodnocení spekter

všech vzorků nebyly nalezeny žádné metabolity fáze I a II biotransformace. Oba experimenty tedy ukázaly, že aktivní metabolit albendazolu ABZ.SO se ani v jedné subcelulární frakci dále neoxiduje na ABZ.SOO, ani se zpětně neredukuje na ABZ.

5.2.2 Inkubace FLU v cytosolu s různými koenzymy

Inkubován byl CYT s FLU o koncentraci 10 μM . Jako koenzymy dehydrogenas/reduktas byly použity NADH a NADPH. Po skončení inkubace a extrakci L/L do organického rozpouštědla byla provedena analýza na HPLC.

Flubendazol byl pozorován v retenčním čase 20,6 min a redukovaný flubendazol v čase 6,1 min. Hodnoty z HPLC byly převedeny na aktivitu enzymu a výsledek byl vztažen na jednotku bílkoviny. Tím jsme dostali specifickou aktivitu. Porovnání těchto aktivit je na obrázku 16.



Obr. 16. Specifická aktivita koenzymů NADPH a NADH

5.2.3 Inkubace cytosolu s FLU a MBZ

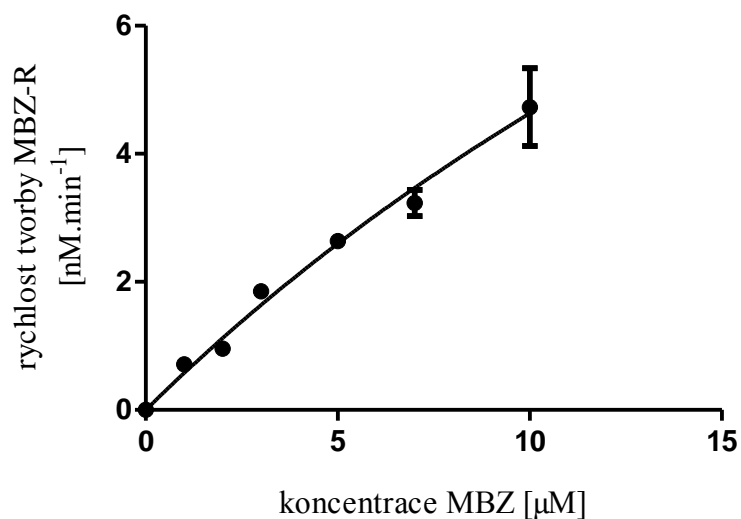
Anthelmintika FLU a MBZ byla inkubována s cytoelem v různých koncentracích (1, 2, 3, 5, 7, 10 μM). K měření byla použita metoda HPLC. Data z HPLC byla převedena na aktivitu (nmol/l/min). Na interpretaci výsledků byla použita rovnice dle Michaelise-Mentenové. Z této rovnice vyplývají základní kinetické parametry zdánlivá maximální rychlost (V'_{\max}) a zdánlivá Michaelisova konstanta (K'_m). V'_{\max} určuje rychlost tvorby produktu při maximální saturaci substrátu enzymem. K'_m je definována jako konstanta poloviční saturace enzymu a vyjadřuje koncentraci substrátu,

při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti. Poměrem těchto parametrů dostaneme enzymatickou účinnost (Cl_{int}) tzv. vnitřní clearance. Hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v tabulce 9.

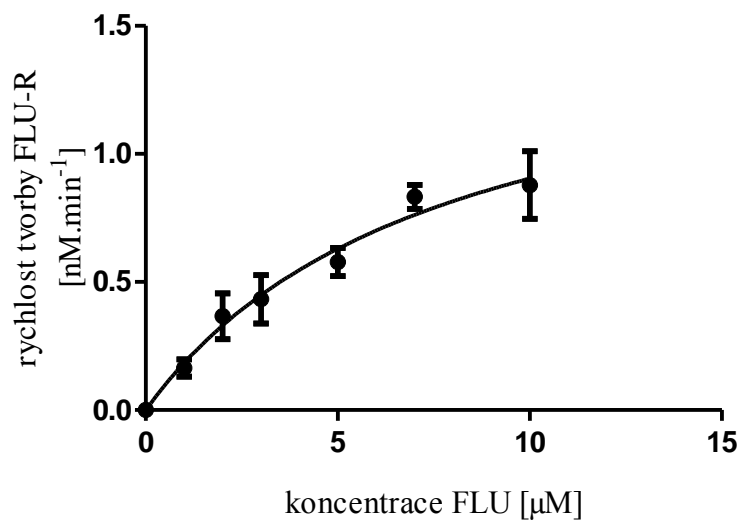
Tab. 9. Kinetické parametry při redukci MBZ a FLU

Léčivo	V_{max} (nM·min ⁻¹)	K_m (μM)	Cl_{int} (min ⁻¹)
FLU-R	1,6 ± 0,2	7,72 ± 2,1	0,0021
MBZ-R	32,46 ± 8,1	57,52 ± 16,6	0,00056

V_{max} – zdánlivá maximální rychlost, K_m – zdánlivá Michaelisova konstanta, Cl_{int} – vnitřní clearance.



Obr. 17. Graf kinetiky redukce MBZ v cytosolu u *H. diminuta*



Obr. 18. Graf kinetiky redukce FLU v cytosolu u *H. diminuta*

5.3 *Ex vivo* biotransformace anthelmintik u *H. diminuta*

Měření byla provedena s využitím LC/MS v pozitivním i negativním módu. V pozitivním módu byla síla signálu přibližně čtyřikrát vyšší než u módu negativního, ve kterém nebyly zjištěny žádné aniontové metabolity. Všechny výsledky měření zmiňované níže jsou z módu pozitivního. Retenční časy, m/z a fragmenty metabolitů zjištěny analýzou MSⁿ jsou shrnuty v tabulce 10.

Tab. 10. MSⁿ spektra a retenční časy (R_t) detekovaných metabolitů FLU a MBZ

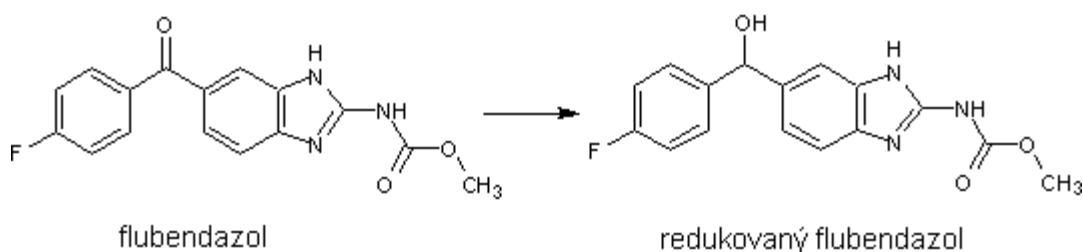
Metabolit	R _t (min)	m/z	MS ⁿ	Vzniklé ionty (m/z, relativní intenzita %)	Kolizní energie (%)
FLU-R	10,2	316	MS ²	284(100), 160(1), 125(1)	40
MFLU-R1	11,2	330	MS ²	298(100)	40
		298	MS ³	97(2), 123(2), 125(4), 174(20), 280 (4), 298 (100)	40
MFLU-R2	12,2	330	MS ²	270(100), 273(6), 298(62), 330(15)	40
		298	MS ³	270(100)	40
		270	MS ⁴	97(16), 146(87), 252(16), 270(100)	40
MBZ-R	9,6	298	MS ²	266(100), 160(1)	40

5.3.1 LC-MSⁿ analýza metabolitů FLU

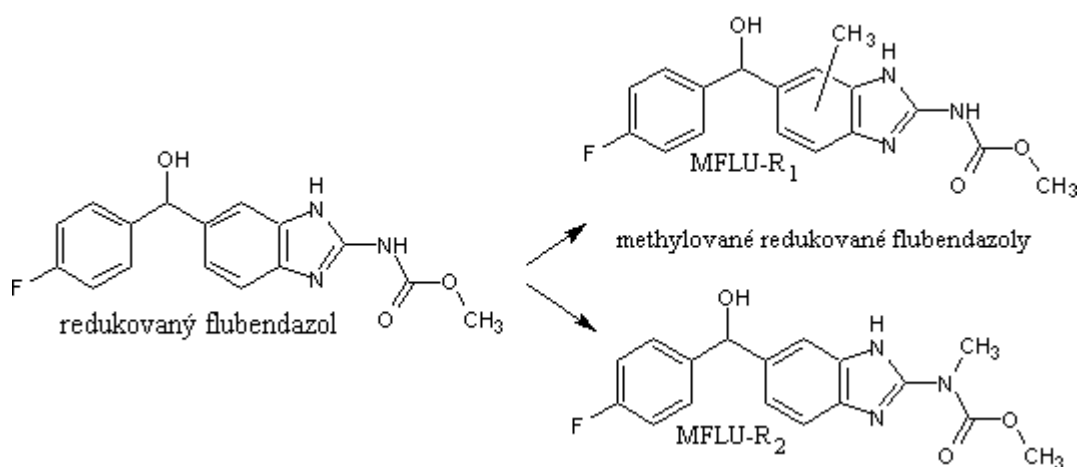
FLU jako parentní látka měl retenční čas 14,4 min a m/z 314. Při analýze jeho metabolitů byl objeven jediný metabolit fáze I biotransformace. Zjištěná látka měla R_t 10,2 min a m/z 316. Na základě porovnání retenčních časů a spekter MS² se standardem byl metabolit identifikován jako redukovaný flubendazol (FLU-R). Typickým produktem při MS² spektru byl fragment s m/z 284.

Dalšími objevenými metabolity byly dva ionty s m/z 330 v retenčních časech 11,2 min a 12,2 min. V obou případech byl po provedení MS² získán iont s m/z 298, původní iont tedy ztratil 32 jednotek (methanol). Toto štěpení je pro BZD charakteristické. Porovnáním spekter MS³ a MS⁴ s fragmentačními schémata methylovaného FLU-R publikovaných Cvilinkem a kol. (2009b) bylo předpokládáno, že

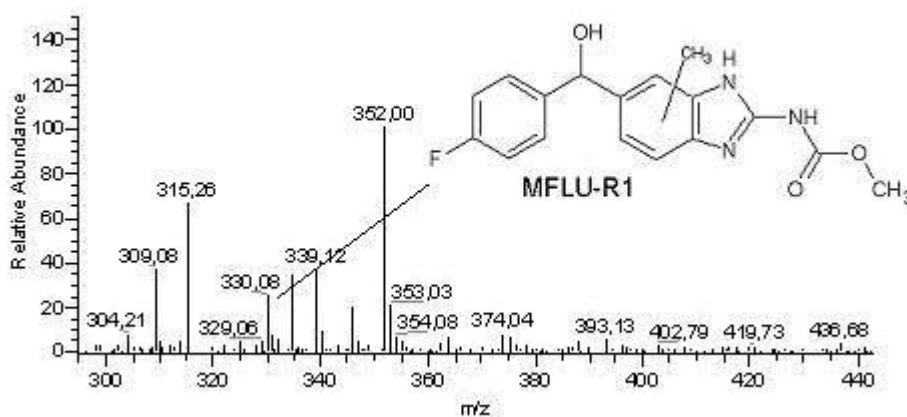
jde o stejné látky. Vznikají tedy dva methylované metabolity fáze II biotransformace. Metabolity se od sebe liší methylovaným místem. V jednom případě jde o methylaci na benzimidazolovém jádře (C-methylace), u druhého metabolitu dochází k methylaci karbamoylové části molekuly (N-methylace). Všechny vznikající metabolity FLU jsou zobrazeny na obrázcích 19 a 20.



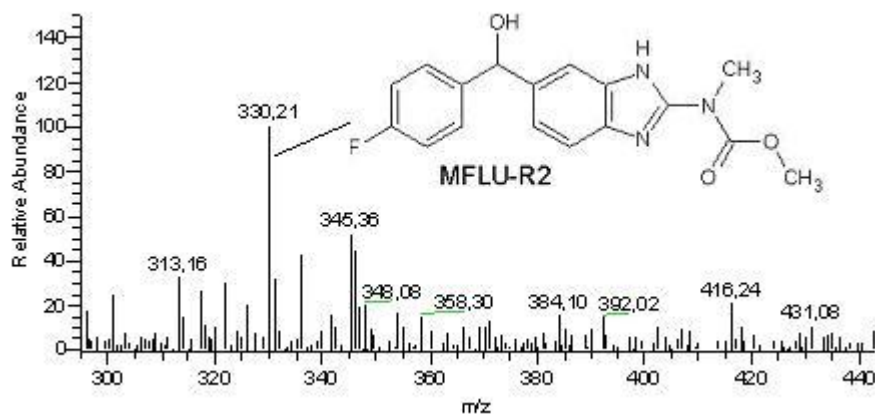
Obr. 19. Flubendazol a jeho redukováný metabolit



Obr. 20. Redukovaný flubendazol a dva methylované metabolity



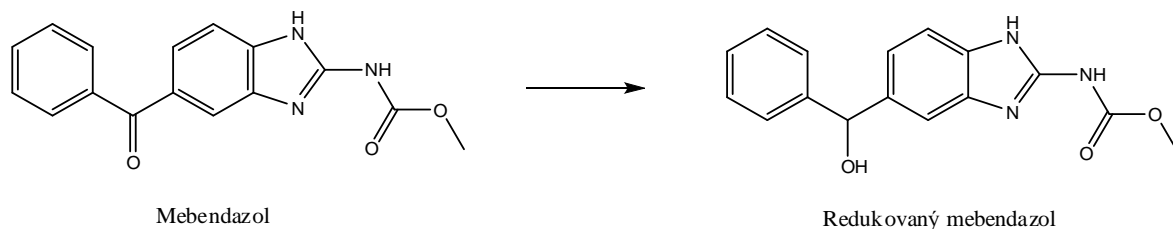
Obr. 21. Hmotnostní spektrum v retenčním čase 11,05-11,43. Ionť s m/z 330 patří methylovanému redukovánému flubendazolu. Na ose x poměr hmotnosti a náboje, na ose y relativní intenzita



Obr. 22. Hmotnostní spektrum v retenčním čase 12,03-12,41. Iont s m/z 330 patří methylovanému redukovanému flubendazolu. Na ose x poměr hmotnosti a náboje, na ose y relativní intenzita

5.3.2 LC-MSⁿ analýza metabolitů MBZ

Mebendazol je strukturně velmi podobný flubendazolu. Liší se pouze absencí fluoru na benzenovém jádře. Při identifikaci byla tudíž očekávána podobná metabolizace. MBZ s m/z 296 se jako parentní látka eluoval v čase 13,8 min. Metabolitem fáze I biotransformace byl zjištěn iont o m/z 298 a retenčním časem 9,6 min, který byl identifikován jako redukovaný mebendazol (MBZ-R). Identita byla potvrzena shodou retenčního času a spekter MS² standardu MBZ-R. Hlavní iont při analýze MS² byl pozorován při m/z 266, stejně jako v případě flubendazolu se jedná o ztrátu 32 jednotek. Redukovaný metabolit je znázorněn na obrázku 23.



Obr. 23. Mebendazol a jeho redukovaný metabolit

6 DISKUSE

Helmintózy, nemoci způsobené parazitujícími červy, představují jednu z nejrozšířenějších příčin ohrožení zdravotního stavu hospodářských, domácích i volně žijících zvířat. Chovatelům hospodářských zvířat působí tyto nemoci značné ekonomické ztráty, samotným zvířatům pak velké zdravotní problémy a předčasnou smrt. Jediným doposud všeobecně dostupným prostředkem v boji s helminty je farmakoterapie a farmakoprolaxe s využitím vhodných anthelmintik. Situaci však komplikuje skutečnost, že počet dostupných léčiv je relativně velmi malý a během uplynulých desetiletí se značně snížila jejich účinnost. Parazité si totiž postupně vytvořili mechanismy, kterými se úspěšně brání toxickému působení anthelmintik a tak se v posledních desetiletích léková rezistence mnohých druhů červů stala celosvětovým problémem (Sangster 1999).

V mé diplomové práci byl sledován metabolismus vybraných anthelmintik u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*). Práce je zaměřena na identifikaci metabolitů FLU, MBZ a ABZ.SO za pomoci inkubace *in vitro* s různými subcelulárními frakcemi a kultivaci tasemnic *ex vivo* v CO₂ inkubátoru v médiu s FLU a MBZ. Jelikož detoxikace není u tohoto helminta příliš prozkoumána, bylo snahou v této práci některé informace o detoxikaci doplnit.

Součástí práce byl také chov tasemnic a jejich získávání z konečného hostitele. Jako mezihostitel byl při chovu tasemnic použit dospělý brouk potemník moučný (*Tenebrio molitor*). Larvy nejsou k infikaci vhodné, protože onkosféry tasemnice špatně pronikají stěnou střeva (Voge, Graiwer 1964). Na infikaci byly použity dvě metody. Nejprve byli brouci infikováni potkaním trusem s vajíčky *H. diminuta*. Druhou možností bylo podání malých článků z konce těla tasemnice, která byla získána z tenkého střeva potkana. Zralé cysticerkoidy se v broucích vyvíjejí po 10 dnech (Andreassen a kol. 1999). Za čtrnáct dní se z vybraných jedinců potemníků podařilo získat desítky cysticerkoidů. Obě metody jsou tedy vhodné k infikaci. Potkani byli infikováni osmi cysticerkoidy. Tím se zajistila dostatečná výtěžnost a přiměřená velikost tasemnic. Při infikaci 1-20 cysticerkoidy je průměrná výtěžnost 100-65%. Čím je počet cysticerkoidů větší, tím se snižuje výtěžnost, ale i produkce vajíček jednotlivých tasemnic (Hesselberg, Andreassen 1975). Po třech týdnech byl vyšetřen trus potkanů. Nalezení vajíček potvrdilo úspěšné nakažení. Dospělé tasemnice tak bylo možné izolovat ze střev a použít je k experimentům.

Nejprve byla provedena *in vitro* inkubace s 10 μM ABZ.SO se subcelulárními frakcemi (CYT, MIT, MIK). Detekce metabolitů byla provedena na HPLC s UV detektorem nebo s hmotnostním spektrometrem. ABZ.SO jako aktivní metabolit ABZ vzniká u řady helmintů např. *Ascaris suum*, *Moniezia expansa*, *Fasciola hepatica*. Oxidace ABZ byla u těchto helmintů pozorována především v MIK (Solana a kol. 2001). U *F. hepatica* byla zaznamenána i další oxidace na ABZ.SOO (Robinson a kol. 2004). U tasemnice ovčí (*Moniezia expansa*) se ABZ.SO, za použití jako parentní látky, redukuje zpět na ABZ (Solana a kol. 2001). U *H. diminuta* v mých experimentech nebyl při použití analytické metody HPLC a velmi citlivé LC/MS nalezen žádný oxidovaný (ABZ.SOO) nebo redukovaný (ABZ) metabolit. Také u *F. hepatica* a *D. dendriticum* nebyla prokázána redukce ABZ.SO na ABZ (Solana a kol. 2001) Detoxikace ABZ je tedy u helmintů různá.

Hlavní cestou metabolismu cizorodých látek u helmintů je redukce. Redukce karbonylové skupiny je obecně považována za jednu z cest deaktivace léčiva, která chrání organismus před toxickým účinkem reaktivních aldehydů a ketonů. Redukovaný MBZ nevykazuje již žádnou anthelmintickou aktivitu. Redukovaný FLU je zřejmě také anthelminticky neúčinný, přesné informace o jeho účinnosti ale nejsou k dispozici (Dayan 2003, Prieto a kol. 1991). U *H. diminuta* dochází k redukcí v cytosolu za účasti NADPH a NADH jako koenzymů. Při použití NADPH je však aktivita reduktas několikrát větší. To se potvrdilo při inkubaci FLU v cytosolu, kdy aktivita enzymů při použití NADPH byla asi 5krát větší než u NADH. Abychom mohli naměřená data převést na specifickou aktivitu, byla v cytosolu tasemnice stanovena koncentrace bílkovin (3,13 mg/ml). Redukce FLU a MBZ byla již pozorována u vlasovky slézové (*Haemonchus contortus*) (Cvilink a kol. 2008), motolice kopinaté (*D. dendriticum*) a tasemnice ovčí (*M. expansa*) (Moreno a kol. 2004). Redukce u *H. diminuta* byla při *in vitro* experimentech potvrzena, žádné jiné metabolity ale nalezeny nebyly.

Výsledky sloužily především ke stanovení základních kinetických parametrů při vzniku redukovaných metabolitů FLU a MBZ. Kinetické parametry byly stanoveny pomocí *in vitro* inkubace cytosolu s FLU a MBZ v koncentracích 1, 2, 3, 5, 7 a 10 μM . K interpretaci výsledků byla použita rovnice dle Michaelise-Mentenové, ze které byla určena zdánlivá maximální rychlost a Michaelisova konstanta. Poměrem těchto parametrů (V'_{max}/K'_m) byla stanovena enzymatická účinnost (Cl_{int}). Hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v tabulce 9, grafy kinetik FLU a MBZ na obrázcích 17 a 18. Maximální rychlost byla u MBZ asi 20krát větší než u FLU, ale

afinita reduktas je u FLU asi 7krát vyšší než u MBZ. Všeobecně jsou tyto hodnoty nízké a ukazují na pomalý průběh redukce. V porovnání s metabolizací FLU u *H. contortus* (Cvilink a kol. 2008) je redukce u *H. diminuta* asi 25krát pomalejší a afinita enzymu k substrátu je asi 5krát menší.

Při *ex vivo* experimentu byly tasemnice kultivovány s 10 μM FLU a MBZ. Analýza proběhla metodou LC/MS. Potvrdily se redukované metabolity fáze I biotransformace, které jsou u helmintů běžné. Při metodě LC/MS se očekávala také identifikace některých metabolitů z druhé fáze biotransformace. Z konjugačních enzymů je u helmintů nejdůležitější GST (Barett 1997). Ačkoliv byl i u *H. diminuta* tento enzym prokázán (Firbasová 2011), nebyl žádný konjugát s glutathionem detekován. Objeveny byly dva metabolity s m/z 330. Retenční časy iontů byly 11,2 min a 12,2 min. Po provedení MS^2 byl získán iont o m/z 298, ztráta 32 jednotek (methanol) je pro BZD charakteristické. Porovnáním MS^3 a MS^4 spekter s již získanými spektry methylovaných metabolitů FLU u *D. dendriticum* (Cvilink a kol 2009b) byly látky identifikovány jako methylované deriváty redukovaného FLU. První z nich byl methylován na aromatickém kruhu (C-methylace), druhý na postraním řetězci (N-methylace). Methylace jako reakce fáze II biotransformace byla u helmintů poprvé popsána teprve nedávno (Cvilink a kol. 2009b). Výsledky poukazují na to, že *H. diminuta* je pravděpodobně schopná tvořit S-adenosylmethionin, který je základním kofaktorem methylací u savců. Methyltransferasy u *H. diminuta* budou mít zřejmě vysokou substrátovou specifitu, protože methylované metabolity u MBZ ani u ABZ detekovány nebyly. Narozdíl od *D. dendriticum*, u které byl nalezen methylovaný derivát i u MBZ (Cvilink a kol. 2009b). Zdá se tedy, že by methylace mohla být u helmintů jednou z dalších metabolických cest při biotransformaci xenobiotik.

Jako analytická metoda ke sledování metabolismu byla použita LC/MS. Spojení kapalinového chromatografu s hmotnostní spektrometrií se v posledních letech stává rutinní analytickou metodou např. při identifikaci reakčních produktů a při jejich strukturní analýze (Niessen 2006). Hmotnostní spektrometr, se kterým jsem pracoval, používal k ionizaci elektrosprej. Jednu ze šetrných metod, která probíhá za normálního tlaku. Ionty byly analyzovány na iontové pasti. Výhodou tohoto analyzátoru, který byl při identifikaci metabolitů využit, je možnost tandemové hmotnostní spektrometrie, při které dochází k rozpadu iontu na charakteristické fragmenty. Porovnání MS^n spekter a retenčních časů se standardem nám dává jednoznačnou identifikaci dané látky.

Při porovnání *ex vivo* a *in vitro* experimentů jsme došli ke stejným výsledkům, které ukazují, že *H. diminuta* metabolizuje vybraná anthelmintika pomocí redukce (FLU, MBZ) či methylace (FLU). Oxidované (ABZ.SO, ABZ.SOO) ani hydrolyzované (FLU, MBZ) metabolity nalezeny nebyly. Zjištěné metabolické dráhy se liší od dříve popsaných drah tasemnice *M. expansa* a u helmintů jiných tříd. To naznačuje, že existují jak mezidruhové rozdíly mezi helminty, tak i rozdíly v biotransformaci mezi blízkými příbuznými. Proto není *H. diminuta* ideální model pro studium metabolismu léčiv u tasemnic člověka a přežvýkavců.

7 ZÁVĚR

Tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*) byly získány pomocí mezihostitele brouka potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) z konečného hostitele potkana. Z celkového počtu 16 cysticerkoidů, kterými byly infikováni dva potkani, se získalo 10 dospělých jedinců *H. diminuta*.

Výsledky z *in vitro* inkubací ukázaly, že ABZ.SO, aktivní metabolit ABZ, se již dále neoxiduje na ABZ.SOO, ani se neredukuje zpět na ABZ. U FLU a MBZ vznikaly při první fázi biotransformace redukované metabolity. Kinetická studie těchto dvou anthelmintik ukázala, že se MBZ metabolizuje 20krát rychleji než FLU, ale má 7krát menší afinitu k substrátu.

Při *ex vivo* kultivaci tasemnice byly objeveny u helmintů nepříliš časté methylované metabolity redukovaného FLU. Methylace probíhala u jednoho metabolitu na benzenovém jádře, u druhého metabolitu na dusíku v postraním řetězci. MBZ byl pouze redukován.

Při studiích *in vitro* i *ex vivo* bylo dosaženo obdobných výsledků, u FLU a MBZ byly nalezeny jejich redukované metabolity, při *ex vivo* inkubaci navíc methylované metabolity redukovaného FLU.

Závěrem mohu konstatovat, že se podařilo naplnit cíle mé diplomové práce a byly identifikovány a kvantifikovány metabolity vybraných anthelmintik u tasemnice krysí (*Hymenolepis diminuta*).

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ABZ – albendazol
ABZ.SO – albendazolsulfoxid
ABZ.SOO – albendazolsulfon
ACN – acetonitril
ADH – alkoholdehydrogenasa
AKR – aldo-ketoreduktasy
APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATC – anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv
BCA – bicinchoninová kyselina
BZD – benzimidazoly
CYP – cytochrom P450
CYT – cytosol
DMSO – dimethylsulfoxid
ESI – ionizace elektrosprejem
FLU – flubendazol
FLU-H – hydrolyzovaný flubendazol
FLU-R – redukovaný flubendazol
GST – glutathion-S-transferasa
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IT – iontová past
LC/MS – spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru
L/L – extrakce kapalina/kapalina
LOD – limit detekce
LOQ – limit kvantifikace
MBZ – mebendazol
MBZ-H – hydrolyzovaný mebendazol
MBZ-R – redukovaný mebendazol
MF – mobilní fáze
MFLU-R1, MFLU-R2 – methylované redukované flubendazoly
MIK – mikrosomy
MIT – mitochondrie
MS – hmotnostní spektrometrie

MSⁿ – tandemová hmotnostní spektrometrie

M/Z – poměr hmotnosti a náboje

NADH - redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidu

NADPH - redukovaná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu

R_t – retenční čas

SPC – souhrn údajů o přípravku

SPE – extrakce na pevných fázích

9 SEZNAM LITERATURY

ANDREASSEN J., BENNET-JENKINS E. M., BRYANT C. (1999): Immunology and biochemistry of *Hymenolepis diminuta*. *Advances in Parasitology*, 42, 223-275.

BARRETT J. (1997): Helminth detoxification mechanisms. *Journal of Helminthology*, 71(2), 85-89.

BODEČEK Š., KOUDELA B. (2009): Veterinární a chovatelská opatření proti vnitřním parazitům u koní. [online]. [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: <http://cehis.cz/publik_syst/files11/Veterinari%20a%20chovatelska%20opatreni%20pro%20vnitrnim%20parazitum%20u%20koni.pdf>.

BROPHY P. M., BARRETT J. (1990): Blocking factors and the isolation of glutathione transferases from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology*, 100, 137-141.

COMBOURIEU B. a kol. (2004) Evidence of metyrapone reduction by two Mycobacterium strains shown by ¹H NMR. *Biodegradation*, 15(2), 125–132.

COOK R. L., ROBERTS L. S. (1991): In vivo effects of putative crowding factors on development of *Hymenolepis diminuta*. *The Journal of Parasitology*, 77(1), 21-25.

CROSAS B. a kol. (2001): A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19132–19140.

CVILINK V., LAMKA J., SKÁLOVÁ L. (2009a): Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*, 41(8), 8-26.

CVILINK V. a kol. (2009b) Liquid chromatography/mass spectrometric identification of benzimidazole anthelmintics metabolites formed *ex vivo* by *Dicrocoelium dendriticum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(17), 2679-2684.

CVILINK V. (2008): Biotransformation of flubendazole and selected model xenobiotics in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 151, 242–248.

DAYAN A.D. (2003): Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86(2-3), 141-159.

DEWEY S. (2001): *Hymenolepis diminuta*. Animal Diversity Web. [online]. [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Hymenolepis_diminuta.html>.

DPDx – Hymenolepiasis [online]. [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/hymenolepiasis.htm>>.

EVANS W. S. a kol. (1998): Evidence that the factor used by the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, to direct the foraging of its intermediate host, *Tribolium confusum*, is a volatile attractant. *The Journal of Parasitology*, 84(6), 1098-1101.

FLEGR J., HAVLÍČEK J. (1999): Ukaž mi své parazity a já ti povím, kdo jsi. *Vesmír*, 78, 667–669.

FÖRSTL M., BUCHTA V., KOLÁŘOVÁ L. (2004): Přehled diagnostiky a terapie střevních parazitóz. *Interní medicína pro praxi*, 4, 205–210.

HESSELBERG C. A., ANDREASSEN J. (1975): Some influences of population density on *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitology*, 71, 517-523.

HOLČAPEK M. (2012a): Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS01_Uvod.pdf>.

HOLČAPEK M. (2012b): Ionizační techniky. [online]. [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS02_03_Ionizacni_techiky.pdf>.

HOLČAPEK M. (2012c): Hmotnostní analyzátory. [online]. [cit. 2012-04-09].
Dostupné z:

<http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS045_Hmotnostni_analyzatory.pdf>.

HOLČAPEK M., KOLÁŘOVÁ L., NOBILIS M. (2008): High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 59-78.

JANČOVÁ P., ANZENBACHER P., ANZENBACHEROVÁ E. (2010): Phase II drug metabolising enzymes. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, 154(2), 103-16.

JEZ J.M., FLYN T.G., PENNING T.M. (1997): The new nomenclature for the aldoketo reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 54(6), 639-647.

KLIMEŠ J. a kol. (2008): Kontrola léčiv I. Karolinum, Praha, 149 s. ISBN 978-80-246-1613-1.

KLIMEŠ J. a kol. (2007): Kontrola léčiv II. Karolinum, Praha, 94 s. ISBN 978-80-246-1460-1.

KÖHLER P. (2001): The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Internatiol Journal for Parasitology*, 31(4), 336–345.

LAMKA J., DUCHÁČEK L. (1998): Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Karolinum, Praha, 164 s. ISBN 80-7184-723-2.

LETHBRIDGE R. C. (1971): The hatching of *Hymenolepis diminuta* eggs and penetration of the hexacanth in *Tenebrio molitor* beetles. *Parasitology*, 62, 445-456.

LINCOVÁ D., FARGHALLI H. a kol. (2007): Základní a aplikovaná farmakologie. 2. vydání, Galen, Praha, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.

- MATSUNGA T., SHINTANI S., HARA A. (2006): Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug metabolism and Pharmacokinetics*, 21(1), 1–18.
- MENCL K. (2001): Problematika parazitárních infekcí v pediatrii. *Vox paediatricae*, 1(6), 13–19.
- MORENO L. a kol. (2004). Integrated pharmacological assessment of flubendazole potential for use in sheep: disposition kinetics, liver metabolism and parasite diffusion ability. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(5), 299–308.
- MUNIR W. A., BARRETT J. (1985): The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology*, 91, 145-156.
- NIESSEN W.M.A. (2006): Liquid Chromatography-Mass Spektrometry. 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, 632 s. ISBN 0-8247-4082-3.
- O'CONNOR T. a kol. (1999): Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochemical Journal*, 343(2), 487–504.
- PAPPAS P.W., WARDROP S.M. (1997): Preliminary biochemical characterization of faeces from uninfected rats and rats infected with the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Helminthology*, 71, 57-60.
- PRECIOUS W.Y., BARRETT J. (1989): Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today*, 5(5), 156–160.
- PRIETO J.G. a kol. (1991): Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100(3), 397–400.
- ROBINSON M.W. a kol.(2004): The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, 92, 205–210.

SANGSTER N.C. (1999): Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*, 29, 115-124.

SHEA J. F. (2007): Lack of preference for infective faeces in *Hymenolepis diminuta*-infected beetles (*Tenebrio molitor*). *Journal of Helminthology*, 81(3), 293-299.

SHEIMAN I. M., SHKUTIN M. F., TERENINA N. B. (2006): A behavioral study of the beetle *Tenebrio molitor* infected with cysticercoids of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Naturwissenschaften*, 93(6), 305-308.

SOLANA H.D., RODRIGUEZ J.A., LANUSSE C. E. (2001): Comparative metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by different helminth parasites. *Parasitology Research*, 87, 275-280.

SPC FLUMIXAN® (2011): [online]. [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <[www.uskvbl.cz/ attachments/spc/0910f7c780119411.doc](http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780119411.doc)>.

SPC VERMOX® (2009): [online]. [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <http://m.olecich.cz/leky/vermox_por-tbl-nob-6x100mg_kod-0122198?tab=texts>.

SPC ZENTEL® (2007): [online]. [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <<http://farmaceutika.info/zentel#spc>>.

STEJSKAL F. (2005): Současná léčba helmintóz. *Klinická farmakologie a farmacie*, 19(2), 14-19.

TENA D. a kol. (1998): Human Infection with *Hymenolepis diminuta*: Case Report from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8), 2375–2376.

VELÍK J. a kol. (2004): Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. *Research in Veterinary Science*, 76(2), 95-108.

VOGE M., GRAIWER M. (1964): Development of Oncospheres of *Hymenolepis diminuta*, hatched *in vivo* and *in vitro*, in the larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Parasitology*, 50, 267-270.

VOLF P., HORÁK P. a kol. (2007): Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha, 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.